

Ilmari Lehtonen

HAMPAAN JA LEUKALUUN KOVAKUDOSTEN UUDISKASVU

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2020

Ilmari Lehtonen

HAMPAAN JA LEUKALUUN KOVAKUDOSTEN UUDISKASVU

Hammaslääketieteen laitos

Kevätlukukausi 2020

Vastuhenkilö: Dosentti Kristiina Heikinheimo

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen laitos

Ilmari Lehtonen, Hampaan ja leukaluun kovakudosten uudiskasvu

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 29 s.

Suu- ja leukakirurgia

Kevätlukukausi 2020

Tämä syventävien opintojen kirjallinen työ on kirjallisuuskatsaus hampaan ja leukaluun kovakudosten ohjatusta uudiskasvusta. Käsikirjoituksessa käsitellään erityisesti kliinisessä mielessä kiinnostavia mahdollisuuksia käyttää ohjattua uudiskasvua hyödyksi kovakudospuutosten hoidossa.

Luonnollinen uudiskasvu määrittää yhdessä yleisen kehitysbiologian tuntemuksen kanssa rajat kliinisille sovelluksille. Jotta ihmiskudoksen normaalia paranemista voidaan edistää tai ohjata korjaavan hoidon yhteydessä, on ymmärrettävä siihen liittyvät monimutkaiset molekyylien viestijärjestelmät ja -reitit.

Luun uudiskasvua tarvitaan hammashoidossa erityisesti, kun oma hammas menetetään. Puutosaukko paranee luun kantasolujen avulla, mutta luun määrä ja muoto jää monesti puutteelliseksi. Tätä ongelmaa pyritään korjaamaan käyttämällä erilaisia keinoluumateriaaleja ja luun muodostusta edistäviä materiaaleja.

Hammas menettää suurimman osan kasvumahdollisuuksista puhkeamisen jälkeen. Hammasluulla on rajallinen ja kliinisesti yleensä riittämätön kyky uusiutua. Hampaan puhkeamisen jälkeen kiillettä tuottavat ameloblastisolut sitä vastoin kuolevat eikä kiille uusiudu. Hampaan kantasolujen ominaisuuksia hyödyntämällä, voidaan mahdollisesti tulevaisuudessa saada kasvamaan uutta kovakudosta aikuisen hampaalle. Haasteena on sopivien kantasolujen eristäminen ja uudelleenohjelmointi.

Viime vuosina kokonaisten kantasoluista kasvavien uudishampaiden tutkimus on ottanut mielenkiintoisia edistysaskeleita. Menetelmä voisi poistaa useita nykyään käytössä olevien proteettisten rakenteiden haittapuolia menetetyin hampaan korvaamisessa.

Avainsanat: Hammas, luu, kantasolu, uudiskasvu

Sisällys

1. Johdanto	1
2. Kovakudosten uudistaminen	2
3. Kantasolut	3
3.1 Maitohampaasta eristetyt kantasolut	3
3.2 Aikuisen hammasytimen kantasolut	4
3.3 Hammaspapillan juuren puoleisen osan (apikaaliosan) kantasolut	4
3.4 Hammasfollikkelin kantasolut	4
3.5 Hampaan kiinnityskudossäikeiden kantasolut	5
3.6 Luuytimen mesenkymaaliset kantasolut	5
4. Kasvutekijät	5
5. Luu	6
5.1 Luuhaavan paraneminen ja uudiskasvu	6
5.2 Verihiutalevalmisteet	8
5.2.1 Kasvutekijöitä sisältävät verihiutalevalmisteet	9
5.3 Luun morfogeeniset proteiinit	9
6. Hammas	11
6.1 Kiille	11
6.1.1 Kiilteen uudismuodostuksen mahdollisuudet	12
6.2 Hammasluu	12
6.2.1 Luun morfogeeniset proteiinit ja hammasluu	13
6.2.2 Tertiärihammasluun muodostus	13
6.2.3 Hammasytimen kattaminen	14
6.3 WNT/ β -kateniini-viestinsiirto hammasvauriossa	15
6.3.1 <i>AXIN2</i> -geenin ilmeneminen hammasvauriossa	16
6.3.2 GSK-3-vastavaikuttajat hammasvauriossa	17
7. Tulevaisuuden näkymiä	18
7.1 Uudishampaan kasvattaminen	18
7.2 Leukaluun uudiskasvu	19
8. Yhteenveto	20

Lähteet

1. Johdanto

Suuri osa hammaslääketieteellistä hoitoa on menetetyn kudoksen korvaamista muun muassa toimivan purennan säilyttämiseksi. Reikiintynyt hammas paikataan erilaisiin kiinnitystekniikoihin perustuvalla paikkauksella ja menetetty hammas korvataan esimerkiksi luukantoisella implantilla. Ymmärryksen lisääntyessä ihmisen kehityksestä ja sen molekyylibiologiasta, on alettu tutkia yhä enemmän tämän tiedon hyödyntämistä nykyisten hoitomuotojen kehittämiseksi.

Nykyisin käytössä olevat materiaalit ovat tyypillisesti mahdollisimman inertejä, eli reaktiokyvyttömiä. Toisaalta bioaktiivinen materiaali voi olla esimerkiksi bakteereja tuhoavan tai hammaskiillettä remineralisoivien ominaisuuksien ansiosta hyödyllinen. (Zhang ym. 2017.) Implanttikirurgiassa voidaan tarvita alveoliluun lisäystä, mikäli alveoliharjanteen korkeus tai paksuus ei ole hoidon kannalta riittävä.

Luunmuodostusta säätelevien mekanismien ymmärrys edistää uusien kovakudosta lisäävien hoitomuotojen kehitystä.

Ihmissolujen rajat tulevat kuitenkin vääjäämättä vastaan, eikä prosesseja voida venyttää biologisten rajoitusten ylitse. Nykyiset kasvutekijöiden käytöllä saadut kokeelliset tulokset eivät ole kliinisesti suoraan sovellettavissa. Kasvutekijöiden vaikutus kantasolujen erilaistumiseen lisää myös riskiä karsinogeenisiin muutoksiin. (Draenert ym. 2014.) Kliinisen käytön yksi ongelma on ”liukoisten ja paikallisesti vaikuttavien valkuaisaineiden nopea inaktivoituminen ja kulkeutuminen pois hoidettavasta kudoksesta” (Heikinheimo ym. 2004).

Työ keskittyy solutasoisten vaikutusmekanismien mahdollisuuksiin. Työssä ei käsitellä kaupallisten materiaalien eroja tai etuja.

2. Kovakudosten uudistaminen

Erilaisten patologisten prosessien, kuten esimerkiksi hammaskarieksen, seurauksena parentaelimen kuvakudoksia menetetään. Toiminnan säilyttämisen vuoksi kovakudospuutokset on syytä korvata. Hampaan tapauksessa kyse on yksinkertaistettuna yhdistävän kiinnityspinnan aikaansaamisesta esimerkiksi lasikeraamisen rakenteen ja hammaskudoksen välillä. Materiaalitieteessä tästä käytetään termiä "bioaktiivisuus".

Uudistavilla keinomateriaaleilla on kaikilla heikkoutensa. Keinojuurihoidon onnistuminen edellyttää titaaniruuvin yhdentymistä leukaluuhun eli osseointegraatiota sekä riittävää luun määrää ja laatua. Vastauksena keinomateriaalien ongelmiin voisi olla kantasolujen käyttö (Shilpa ym. 2013). Perustutkimus voi mahdollistaa kantasolujen manipulaation *in situ* käyttäen tarkoituksen mukaisia viestimolekyylejä. Uudiskasvuun perustuva ja jopa puuttuvien elinten korvaamiseen tähtäävä lääketiede asettaa valtavat haasteet (Bluteau ym. 2008).

Mutta mitä ovat biomateriaalit ja bioaktiiviset materiaalit? Bioaktiivisuuden voidaan tulkita tarkoittavan elimistön oman kudoksen ja vierasmateriaalin vuorovaikutusta. Laveasti kaikki paikkausmateriaalit voidaan luokitella biomateriaaliksi, koska ne ovat hampaaseen kiinnittyneenä yhteydessä ihmisen omaan kudokseen. (Vallittu ym. 2018.) Bioaktiivisuus voidaan saavuttaa materiaalin tietyllä kemiallisella koostumuksella, rakenteella tai molemmilla. Esimerkiksi paranevassa luukudoksessa osteogeneesiä edistävän luun muodostusta tukevan materiaalin tulisi olla sopivan huokoinen, mikä antaa angiogeneesissä muodostuvalle uudelle verisuonitukselle otollisemman kasvualustan. Luun muodostusta tukevat materiaalit edistävät paranemista. (Kan ym. 2019.) Toisaalta myös biomateriaalin kemiallinen koostumus voi osaltaan edistää kovakudoksen muodostusta (Vallittu ym. 2018).

Kaikissa tutkituissa laajojen luupuutosten hoitomenetelmissä on vielä huomattavia puutteita (Kan ym. 2019).

3. Kantasolut

Kantasolu pystyy jakautumaan itse toistuvasti tai tuottamaan erilaistumaan alkavan solun, jolla on kyky erilaistua joksikin solutyypiksi. Kantasolut jaetaan alkion ja aikuisen kantasoluihin, joista jälkimmäisillä on rajoittuneempi kyky erilaistua. Aikuisen kantasolut ovat peräisin joko verenkierrosta (hematopoieettisia) tai sidekudoksesta (mesenkymaalisia). (Shilpa ym. 2013.)

Hampaan ytimen mesenkymaaliset solut eroavat kasvumahdollisuuksiltaan muiden kudosten mesenkymaalisista kantasoluista. Niillä on todettu olevan hammasluuta ja luuta muodostavia ominaisuuksia, mutta ne eivät kykene erilaistumaan rusto- tai rasvasoluiksi. Niiden potentiaali myös heikkenee huomattavasti hampaan puhkeamisen jälkeen. (Balic ym. 2010.) Hampaan kantasoluja on voitu eristää hammasytimen lisäksi maitohampaista, hammaspapillan apikaaliosasta, hammasfollikkelista, hampaan kiinnityskudossäikeistä sekä luuytimeistä erilaistuneista mesenkymaalisista kantasolulinjoista (Shilpa ym. 2013, Bluteau ym. 2008).

3.1. Maitohampaasta eristetyt kantasolut

Maitohampaista saadaan eristettyä multipotentteja/monikykyisiä kantasoluja. Julkaisuissa näistä käytetään termiä Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED). Maitohammas on kantasolulähteenä hyvä, koska niitä on helposti saatavilla. Tämä tekisi mahdollisesta kliinisestä käytöstä helppoa. Nämä solut pystyvät erilaistumaan neuroneiksi, adiposyyteiksi, osteoblasteiksi ja odontoblasteiksi. Saatavuutensa ja plastisuutensa ansiosta ihmisen maitohampaasta eristetyt kantasolut voivat olla avuksi vahingoittuneen hampaan hoidossa, luun uudiskasvun ohjaamisessa sekä hermovaurion tai rappeuttavien sairauksien hoidossa. (Miura ym. 2003, Bluteau ym. 2008.)

3.2. Aikuisen hammasytimen kantasolut

Aikuisen hammasytimen kantasolut aktivoituvat, kun hammasluu vaurioituu. Tämä näkyy kliinisessä hammashoidossa tertiärihammasluun muodostuksena. Hammasytimen kantasoluilla on odontogeenistä potentiaalia ja niitä voidaan hyödyntää hammaskudosten uudiskasvussa (Yu ym. 2007).

3.3. Hammaspapillan juuren puoleisen osan (apikaaliosan) kantasolut

Eräässä tutkimuksessa on havaittu hammaspapillan apikaaliosan mesenkymaalisten kantasolujen olevan parempia hammasluun uudiskasvun suhteen kuin hammasytimen kantasolut. Näitä soluja on mahdollista kerätä viisaudenhampaista eli ihmisen kolmansista poskihampaista. (Sonoyama ym. 2006, Bluteau ym. 2008.)

3.4. Hammasfollikkelin kantasolut

Hammasfollikkeli on alkuperältään ektomesenkymaalinen hermostopienajohdannainen rakenne kehittyvän hampaan ympärillä. Sen uskotaan sisältävän esiasteita sementoblasteille sekä osteoblasteille. Hammasfollikkeli muodostaa myös kiinnityskudossäikeet. Hammasfollikkelin kantasoluja voidaan myös eristää viisaudenhampaista. (Volponi ym. 2010.)

3.5. Hampaan kiinnityskudossäikeiden kantasolut

Hampaan kiinnityskudossäikeiden kantasolut pystyvät erilaistumaan sementoblastin kaltaisiksi soluiksi, rasvasoluiksi ja kollageenia tuottaviksi soluiksi. Tutkimukset viittaavat siihen, että kiinnityskudossäikeiden solut pystyvät tuottamaan sementtiä/kiinnityskudossäikeiden kaltaista kudosta *in vivo*. Näitä kantasoluja saadaan kerättyä aikuiselta ihmiseltä poistetuista viisaudenhampaista. (Seo ym. 2004, 2005.)

3.6. Luuytimen mesenkymaaliset kantasolut

Luuytimen mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat lähinnä osteoblasteiksi (Musina ym. 2006). Näillä soluilla on myös odontogeenistä potentiaalia mutta vähemmän kuin hammasytimen kantasoluilla (Yu ym. 2007). Tämä tukee oletusta, että mesenkymaalisilla kantasoluilla on erilaiset ominaisuudet riippuen niiden alkuperästä (Musina ym. 2006, Bluteau ym. 2008).

4. Kasvutekijät

Solujen toimintaa, erityisesti jakaantumista ja erilaistumista, ohjaavat monet tekijät. Kasvutekijät ovat valkuaisaineita, joilla on monia tehtäviä kudosten uudiskasvussa ja kehityksessä. Näitä ovat mm. transformoiva kasvutekijä beeta (TGF- β) -geeniperheen jäsenet, epidermaalinen kasvutekijä (EGF), fibroblastikasvutekijä (FGF), insuliininkaltainen kasvutekijä (IGF), verihituleista johdettu kasvutekijä (PDGF), vaskulaariendoteelinen kasvutekijä (VEGF). (Heikinheimo ym. 2004, Zarei ja Soleimannejad, 2018.)

Inaktiivisia TGF- β -geeniperheen kasvutekijöitä on ”runsaasti varastoituneena mm. luussa ja hammasluussa, josta sitä vapautuu esimerkiksi trauman yhteydessä, kun elimistö tarvitsee kasvutekijöitä korjaamaan kudonvauriota” (Heikinheimo ym. 2004).

5. Luu

Luu on metabolisesti aktiivisista soluista koostuva kudos, jossa solut muodostavat jäykän kehikon. Luun paranemiseen vaikuttavat useat biokemialliset, biomekaaniset, hormonaaliset sekä solutason mekanismit. Solutasolla luun rakenneosia ovat osteoblastit, osteoklastit, osteosyytit sekä luuytimen hematopoieettiset kantasolut. (Kalfas 2001.)

Luu kehittyy kahdella tavalla: endokondraalisesti tai intramembranoottisesti luutumalla. Kallon ja kasvojen luut muodostuvat pääasiassa intramembranoottisesti luutumalla, missä mesenkymaaliset solut erilaistuvat suoraan osteoblasteiksi. Osteoblastit tuottavat angiogeneesiä edistäviä tekijöitä, jotka edesauttavat verisuonituksen muodostusta ja sitä kautta mahdollistavat luun muodostumisen. (Stegen ja Carmeliet 2018.)

5.1. Luuhaavan paraneminen ja uudiskasvu

Luu on maksan ohella ihmisen ainoa kudos, joka kykenee uudiskasvuun ilman huomattavaa arvenmuodostusta (Loeffler ym. 2018). Luun paraneminen on perinteisesti jaettu kolmeen vaiheeseen: tulehdus ja solujen vaeltaminen, solujen erilaistuminen ja luukudoksen järjestäytyminen sekä luun uudelleenjärjestäytyminen. Luuhaavojen paraneminen jaetaan endokondraaliseen ja intramembranoottiseen paranemiseen. (Dumic-Cule ym. 2018.)

Luukudoksen hyvä kyky uudistua johtuu solutason ja molekylaaristen toimintojen yhteistyöstä. Luuhaavan paraneminen alkaa verihiutaleiden tai yleisen immuunivasteen komplementtijärjestelmän aktivoimasta tapahtumaketjusta. Tämä aktivoi primaarisen tulehdusreaktion, joka aiheuttaa vasoaktiivisten säätelytekijöiden ja kemotaksiksen tekijöiden houkuttelemien neutrofiilien, makrofagien ja fibroblastien saapumisen vaurioalueelle. Tulehdusvaihe on voimakkaimmillaan 24 tuntia haavan syntymisen jälkeen. Vaurioalueen fibriinihiyytymä toimii paikalle saapuvien solujen

tukiverkkona helpottaen laajaa paranemisvastetta. Makrofagit toimivat paranemisprosessin ajan erilaisissa tehtävissä mm. erittäin tulehduksellisia ja kemotaksisia säätelytekijöitä, kuten TNF- α , IL-1 β . (Haumer ym. 2018.)

Makrofagit ovat osoittautuneet hyvin monipuolisiksi soluiksi. Niiden rooli on suuri luun uudismuodostuksessa, jonka aikana ne voivat erilaistua tulehdusta edistäviksi M1- tai kudosisregeneratiivisiksi M2-fenotyypin soluiksi. Makrofagit ovat päävastuussa luumuodostuksen vastekaskadin toteutumisessa ja onnistumisessa. Niiden erityisen plastisuuden vuoksi voidaan olettaa, että paranevan luukudoksen mikroympäristö, eli paikalliset tekijät, vaikuttaa huomattavasti tapahtuvaan vasteeseen ja luun paranemisen lopputulokseen. (Bohner ja Miron 2019.) Näiden tekijöiden tiedetään olevan välttämättömiä luukudoksen paranemisessa, vaikka niiden krooninen ilmeneminen (ekspressio) onkin haitallista. Ylipäättänsä makrofagien toimintaa säätelevät monet tekijät liian suurina annoksina ohjaavat prosessia väärille urille. Välittäjäaineiden oikeanlainen toiminta on hienovaraisen tasapainon tulos. Tasapainon järkkyyessä tuloksena voi olla laadullisesti epätäydellinen luutuminen.

Luuhaavan verenkierto ja alueen hapensaanti heikkenevät vaurion seurauksena. Tämä johtaa verisuonten uudismuodostusta edistävien tekijöiden vapautumiseen ja uusien kapillaarien muodostukseen. Tapahtumaa edesauttaa muodostunut fibriiniverkosto, jonka varaan uuden kudoksen on helpompi rakentua. Tapahtumaa ohjaa mm. VEGF-kasvutekijä, joka toimii angiogeneesin lisäksi luun esisolujen erilaistumisessa. PDGF edistää prosessia sekä vahvistamalla angiogeenisiä että osteogeenisiä viestinsiirtoketjuja. Se edistää osteoblastien järjestäytymistä myös epäsuorasti lisäämällä VEGF-ilmentymisen säätelyä. (Haumer ym. 2018.)

Verenkierron parantuessa haava-alueen happipitoisuus kasvaa ja normalisoituu. Tästä alkaa luun uudistaminen. Luuhaavan paranemisessa ovat suuressa osassa luun morfogeeniset proteiinit (BMP) sekä WNT-viestinsiirto. Verenkierron mukana paikalle kulkeutuu mesenkymaalisia kantasoluja sekä monosyyttejä, jotka erilaistuvat osteoblasteiksi sekä osteoklasteiksi alkaen uudelleenmuotoilla rustoisesta kalluksesta luuta. (Udagawa ym. 1990.)

Leukaluiden luusiirteillä parhaat lopputulokset on tutkitusti saatu käyttämällä intramembranoottista luusiirrettä. Yhteinen kehityksellinen ektomesenkymaalinen alkuperä edistää luuhaavan paranemista. (D'Addona ja Nowzari, 2001.) Erot intramembranoottisten ja endokondraalisten luiden luusiirteiden käyttäytymisessä vieraassa luukudoksessa on yhdistetty *HOX*-geenien ilmentymiseen (Leucht ym. 2008).

5.2. Verihiutalevalmisteet

Luun uudiskasvua säätelee suuri määrä solun sisäisiä ja solun ulkoisia toimintoja. Verihiutalevalmisteita käytetään kliinisesti kova- ja pehmytkudosten hoidossa (Wang ym. 2019). Verihiutalevalmisteet ovat autologeja, eli ne valmistetaan potilaan omasta verestä. Verihiutalevalmisteita ovat verihiutalepitoinen plasma (platelet-rich plasma, PRP), verihiutalepitoinen fibriini (platelet-rich fibrin, PRF) ja kasvutekijöitä sisältävät verihiutalevalmisteet (concentrated growth factors, CGF). Nämä kolme ovat ominaisuuksiltaan hieman erilaisia. (Al-Hamed ym. 2019.) Verihiutalevalmisteet voidaan edellä listatun järjestyksen perusteella luokitella ensimmäiseen, toiseen ja kolmanteen sukupolveen (Chen ym. 2018).

Verihiutaleet sisältävät useita kasvutekijöitä, joita ovat muun muassa: TGF- β , VEGF, PDGF, EGF. Näiden on osoitettu nopeuttavan haavan paranemista ja kudosten uudiskasvua. (Park ym. 2016.) Edellä mainitut kasvutekijät ovat tärkeitä myös luonnollisessa luuhaavan paranemisprosessissa.

5.2.1. Kasvutekijöitä sisältävät verihiutalevalmisteet

Chen ym. (2018) osoittivat rottakokeessaan kasvutekijöitä sisältävien verihiutalevalmisteiden (CGF) parantavan luuytimen strooman mesenkymaalisten kantasolujen osteoinduktiivista aktiivisuutta luunmuodostuksen yhteydessä. Tutkimuksessa verrattiin kantasoluja ja kasvutekijäverihiutalevalmistetta sisältävän siirteen käyttöä kontrolleihin.

Mathew ym. (2020) saivat lupaavia tuloksia kasvutekijöitä sisältävien verihiutalevalmisteiden käytöstä 13-vuotiaan lapsipotilaan alaleukaluussa. Kuitenkin menetelmän luotettava arvioiminen vaatii lisää kliinisiä kokeita.

5.3. Luun morfogeeniset proteiinit

Luun morfogeeniset proteiinit (BMP) ovat kasvu- ja erilaistumistekijöitä, jotka kuuluvat muuntuvan kasvutekijä- β :n (TGF- β) perheeseen. Niiden on tutkitusti osoitettu olevan avainroolissa luun muodostuksessa normaalin alkionkehityksen aikana. BMP-proteiinit signaloivat luun esisolujen kemotaksista jakaantumista ja erilaistumista ohjaten luunmuodostusta. BMP-proteiinien molekylaariset mekanismit ovat vielä tuntemattomia. (Krishnakumar ym. 2017.)

Rekombinanttiproteiinit ovat geenitekniikan keinoin tuotettuja proteiineja. RhBMP2:n (Recombinant Human BMP2) käyttö alveoliluun kasvatuksessa on parantanut luun laatua ja korottanut luurajaa joissakin kliinisissä kokeissa (Shim ym. 2018, Fiorellini ym. 2005, Lee ym. 2015). Toinen tutkimuksissa käytetty proteiini on rhBMP-7, mutta kummastakaan ei löydy tarpeeksi laadukasta tutkimusta, jonka perusteella BMP-perheen proteiinien käytöstä luuhaavojen ja vaurioiden hoidossa voitaisiin vetää johtopäätöksiä (Dumic-Cule ym. 2018).

BMP-proteiinien kuljettaminen vaurioalueelle on vielä ratkaisematta ja annostelun eri keinoja on syytä vielä kehittää (Krishnakumar ym. 2017). Kantajamateriaalin tulee olla ”elävään kudokseen sopiva (bioyhteensopiva) ja vapauttaa liukoista kasvutekijämolekyyliä riittävän hitaasti, jotta uuden kudoksen muodostuminen käynnistyy” (Heikinheimo ym. 2004). Käytännössä kaikki kantajamateriaalit voidaan luokitella neljään ryhmään: epäorgaaniset materiaalit, synteettiset polymeerit, luonnolliset polymeerit ja komposiitit. Näistä esimerkiksi tyypin I kollageenin etu on erinomainen bioyhteensopivuus. Komposiittimateriaaleilla voidaan puolestaan yhdistellä useiden eri materiaalien hyviä puolia. (Li ja Wozney, 2001.)

Luukudoksen korjaamiseen etsitään yhä parempia hoitomenetelmiä. Hammasytimen kantasolut ovat mesenkymaalisten kantasolujen lähde. Näillä soluilla on samoja ominaisuuksia kuin hermostopienan soluilla, joista ne ovat lähtöisin. Muilla aikuisen mesenkymijohdannaisilla kantasoluilla on ”muisti” alkuperästään, mikä voi vaikuttaa niiden käyttäytymiseen erilaistuessa. Tämä on erityisen tärkeää luukudosten suhteen. (Leucht ym. 2008.) Hammasytimen mesenkymaalisten kantasolujen käyttö luukudoksen muodostamiseen muualla kuin kallon ja kasvojen alueella riippuu mahdollisuuksista manipuloida paikallista mikroympäristöä tai soluohjelmoinnin onnistumisesta (Sharpe 2016).

Luun uudiskasvua ajatellen on pystyttävä huomioimaan hyvin suuria kokonaisuuksia, eikä ajatella yksittäisten tekijöiden olevan oikotie parempiin tuloksiin (Kan ym. 2019).

6. Hammas

Hammas koostuu neljästä eri kudoksesta: kiilteestä, hammasluusta, sementistä sekä hammasytimestä. Näistä kolme ensimmäistä ovat kovakudoksia (Brand ja Isselhard, 2013).

Odontogeneesissä suun epiteeli ja hermostopienajohdannainen mesenkyymi kehittyvät vuorovaikutuksessa keskenään. Hammassilmut, joissa hammasaiheet muodostuvat, syntyvät suun epiteelin kuroutuessa mesenkyymien sisään. Epiteeliset solut jakaantuvat ja muodostavat hermostopienajohdannaisen mesenkyymien sisään nappuvaiheelle tyypillisen nupun. (Juuri ja Balic 2017.) Kehityksen aikana tärkeitä kasvutekijöitä ovat TGF- β -perheen proteiinit BMP2, BMP4 ja BMP7 (Bluteau ym. 2008). FGF-perheen proteiinien FGF4, FGF8 ja FGF9 on osoitettu toimivan epiteelissä viestinsiirtäjinä säädellen mesenkymaalista geenien ilmenemistä sekä solujen jakaantumista kehityksen initiaatiovaiheessa. FGF-proteiinit vaikuttavat myös kasvavan hampaan muotoon morfogeneesivaiheen aikana. (Kettunen ym. 2000.) Morfogeneesin alussa ilmenevät erityisesti *SHH*, *BMP2*, *WNT10A* sekä *WNT10B* (Dassule ym. 1998). *SHH*-geenin ilmenemisen puuttuminen aiheuttaa hampaan muodon kehityksen häiriön, mutta se ei kuitenkaan vaikuta hammaskudosten erilaistumiseen kehitysvaiheessa (Dassule ym. 2000).

6.1. Kiille

Kiille on hampaan kudoksista mineralisoituneinta. Se on kemialliselta rakenteeltaan 96 % epäorgaanista ja loput 4 % vettä sekä orgaanista ainetta. Kiille on ihmiskehon kovinta ainetta ja suojaa hampaan kruunua. (Brand ja Isselhard, 2013.)

6.1.1. Kiilteen uudismuodostuksen mahdollisuudet

Kiillettä tuottavat ameloblastit menetetään hampaan puhjettua. Vaurioitunutta kiillettä ei pystytä uudismuodostamaan puhjenneen hampaan solujen avulla. (Sharpe 2016, Balic 2018.)

Kehittyvien viisaudenhampaiden epiteliaalisia soluja on käytetty eläinkokeissa onnistuneesti kiillekudoksen muodostuksessa. Jotta kiillettä muodostuu, menetelmä edellyttää hammasperäisten mesenkymaalisten kantasolujen läsnäoloa, mikä johtaa myös hammasluun muodostumiseen. Kokeessa muodostunut kiillettä muistuttava kudos ei kuitenkaan vastaa normaalia aikuisen ihmisen kiillettä. (Honda ym. 2007.) Myös Shinmura ym. (2008) saivat muodostettua kiillettä muistuttavaa kudosta Malassez'n epiteelijäänteiden sekä hammasytimen solujen avulla.

6.2. Hammasluu

Hammasluu (dentiini) on odontoblastien tuottama kovakudos, joka muodostaa suurimman osan hampaasta. Hammasluu on hammaskruunun osalta kiillekerroksen alla, kun taas juurten alueella sitä ympäröi hammassementti. Hammasluun koostumus on 70 % epäorgaanista sekä 30 % orgaanista ainesta ja vettä. (Brand ja Isselhard, 2013.) Erilaistuttuaan odontoblastit erittävät mineralisoitumatonta esihammasluuta, joka on luun osteoidin kaltaista. Esihammasluu koostuu pitkälti tyypin I kollageenista. Tästä muodostuu matriksi, joka mineralisoitumisen jälkeen muodostaa hammasluun. (Balic ym. 2010.)

Hampaan (ekto)mesenkymaaliset kantasolut ovat tärkeässä roolissa hampaan homeostaasissa sekä korjauksessa. Hammasydin on aikuisella luuytimen kaltainen kantasolujen lähde. Nämä solut kykenevät erilaistumaan mineralisoiviksi soluiksi – luussa osteoblasteiksi ja hampaassa odontoblasteiksi. Hammasytimen kantasoluilla on luuytimen soluja huonompi erilaistumispotentiaali. Ektomesenkymaalisia kantasoluja löytyy lisäksi hampaan kiinnityskudossäikeistä. (Sharpe 2016.)

6.2.1. Luun morfogeeniset proteiinit ja hammasluu

Odontoblastit ovat erikoistuneita hammasluuta tuottavia pitkäikäisiä postmitoottisia soluja, jotka sijaitsevat hammasytimen ja hammasluun rajapinnalla. Hampaan kehityksen aikana odontoblastit erikoistuvat perifeerisistä hammaspapillan soluista, jotka ovat ektomesenkymaalista alkuperää. Erikoistumiseen vaikuttavat kiille-epiteelin viestimolekyylit.

Täsmällistä mekanismia odontoblastien erilaistumisessa ei tunneta. BMP-perheen kasvutekijät ovat odontoblastien, kuten myös osteoblastien, kehityksen ohjaukseen osallistuva ryhmä. BMP2:n, BMP4:n ja BMP7:n on todettu ohjaavan odontoblastien erilaistumista. Prosessi on kokonaisuudessaan monimutkainen ja siihen osallistuu myös paljon muita tekijöitä. Tarkkaa mekanismia ei tälle tunneta. (Kawashima ja Okiji 2016.)

6.2.2. Tertiärihammasluun muodostus

Terve hammasluu toimii hammasytimen suojana esimerkiksi bakteereja vastaan. Hammasluun tuhoutuminen, esimerkiksi kariuksen seurauksena, aiheuttaa hampaan ydintä suojaavan tertiärihammasluun muodostuksen. Selkokielellä tällaisessa tilanteessa hampaassa on syvä reikä. Tertiärihammasluu jaetaan kahteen ryhmään, jotka ovat reaktiivinen hammasluu ja korjaava hammasluu.

Reaktiivinen hammasluu on hampaan kehityksen aikana erilaistuneiden odontoblastien muodostamaa. Odontoblasteja on tervessä hampaassa hammasytimen ja hammasluun rajapinnalla. Korjaava hammasluu on odontoblastien kaltaisten solujen muodostamaa. Tarkkaa mekanismia tälle ei tunneta, vaikka erilaisia tekijöitä odontoblastien erilaistumisessa onkin pystytty tunnistamaan. Hammasytimen ja hammasluun rajapinnalle ulottuva ärsyke, kuten kariesleesio, vahingoittaa hampaan odontoblasteja. Tämä käynnistää odontoblastien kaltaisten solujen syntymisen hammasytimen kantasoluista. Paraneminen ja

tertiärihammasluun muodostus edellyttää hammasytimen kantasolujen vaeltamisen, määrän lisääntymisen sekä odontogeenisen erilaistumisen. (Song ym. 2017.)

Hammasytimen kantasolut saadaan erilaistumaan odontoblastien kaltaisiksi soluiksi *in vitro*. On myös osoitettu, että solujen käsittely ja siirtäminen uudelle kasvatusmaljalle ei juuri vaikuttanut niiden toimintaan. Tämä voi mahdollistaa viljeltyjen odontoblastien kaltaisten solujen käytön kudosten kasvattamisessa sekä biomateriaalitutkimuksessa. (Baldi3n ym. 2018.)

6.2.3. Hammasytimen kattaminen

Kalsiumhydroksidin sekä hydraulisen kalsiumsilikaatin, esimerkiksi MTA, ovat hammasytimen kattamisessa käytettyjä materiaaleja. Kattaminen tehdään, kun kudospuutos yltyy joko hyvin lähelle hammasydintä tai hammasluu on kokonaan menetetty. Kalsiumsilikaatit muodostavat hammasytimen kantasolujen yhteydessä hammasluun muodostusta edistävän mikroympäristön (Tomás-Catalá ym. 2018).

Hammasytimen kattamiseen on tutkittu myös vaihtoehtoisia bioaktiivisia materiaaleja. Eri kasvutekijät, kuten esimerkiksi BMP-proteiinit, voisivat edistää korjaavan hammasluun muodostusta jopa kalsiumhydroksidia paremmin. Ongelmaksi on muodostunut oikeanlaisen annostelumuodon löytäminen. Menetelmä vaatisi myös useita annoksia ollakseen tehokas. (Song ym. 2017.)

Kattaminen jaetaan välilliseen sekä välittömään. Termien välinen ero on, että välittömässä kattamisessa on olemassa yhteys hammasydinonteloon, kun taas välillinen kattaminen tehdään vielä paljastumattomalle ytimelle. Molemmissa tapauksissa tavoitteena on saada hammasluuvaurioon muodostumaan tertiäristä hammasluuta, jotta hampaan vitaliteetti olisi mahdollista säilyttää.

Hammasytimen kattamiseen käytetyillä kliinisesti toimiviksi todetuilla materiaaleilla on kolme yhteistä ominaisuutta: korkea pH, antibakteerisuus ja kalsiumionien vapautuminen. Emäksinen ympäristö edesauttaa hammassolujen erilaistumista. (Song ym. 2017.)

Hiirikokeissa alkalisen fosfataasin isoentsyymi ALPL:n havaittiin toimivan odontoblasteissa sekä erilaistuvissa odontoblasteissa juurenmuodostuksen yhteydessä (Kim ym. 2013). Kalsiumhydroksidin, kuten myös MTA:n, vapauttama emäksinen hydroksidi-ioni (OH⁻) nostaa kudoksen pH:ta luoden samankaltaisen olosuhteen kudokseen. Toisaalta liian suuren pH-arvon tiedetään inhiboivan mineralisaatiota. Hydroksidi-ioneiden täsmällisistä vaikutuksista ei voida olla varmoja erityisesti siksi, että ilmiön tarkka tutkiminen ja mittaaminen on vähintäänkin haastavaa. (Song ym. 2017.)

Chang ym. (2017) osoittivat *in vitro* -kokeessaan MTA:n parantavan immuunisolujen vaeltamista aktivoimalla kalsiumia aistivia reseptoreita (CaSR). CaSR-reseptorit vaikuttivat erillisin viestinsiirtoketjuin immuunisolujen vaeltamista edistävään kemotaksikseen sekä nopeutta lisäävään kemokineesiin.

6.3. WNT/ β -kateniini-viestinsiirto hammasvauriossa

WNT/ β -kateniini-viestinsiirto on tärkeässä tehtävässä useassa eri kehitysvaiheessa hampaan morfogeneesissä. Viestinsiirtoon osallistuvat molekyylit ilmenevät hammasepiteelissä sekä mesenkyymissä. Mutaatiot WNT-viestinsiirron tekijöissä on yhdistetty joihinkin hampaan puutoksiin ja myös tiettyihin oireyhtymiin liittyviin hampaan puutoksiin. Hampaan kehityksen silmuvaiheessa WNT-viestiketjua säädellään rajoittamalla *MSX1*- ja *BMP4*-geenien ilmenemistä. (Tamura ja Nemoto 2016.) WNT-viestinnän voimakkuuden aktiivisuutta säätelevät tekijät ovat tärkeitä hampaan normaalin kehityksen onnistumisessa. Aktiivisuuden oikea-aikainen säätely on tämän vuoksi välttämätöntä hampaan uudiskasvua ajatellen. (Liu ym. 2008.)

WNT/ β -kateniini-viestinsiirron tiedetään olevan tärkeä useissa hampaan morfogeneesin vaiheissa, ja eri tutkimustulokset viittaavat sen vaikuttavan suuresti odontoblastien erilaistumiseen. Kuitenkin odontoblastien erilaistumisen tarkat molekulaariset tapahtumat ovat toistaiseksi tuntemattomia. (Kim ym. 2013.)

6.3.1. *AXIN2*-geenin ilmeneminen hammasvauriossa

WNT/ β -kateniini-signaaliketju on merkittävässä osassa vaurioituneen hammasluun uudiskasvussa. WNT:n kohdegeeni *AXIN2*-geenin ilmeneminen hampaan kudostuhon yhteydessä kasvaa nopeasti. *AXIN2*-ilmentävät solut erilaistuvat uusiksi odontoblastien kaltaisiksi soluiksi, jotka erittävät korjaavaa hammasluuta. Lisäksi nämä solut toimivat autokriiniseen tapaan vahvistaen WNT-viestiketjua. Tätä ei kuitenkaan tapahtunut primaarisissä hampaan odontoblasteissa. WNT/ β -kateniini-viestinsiirto näiden osalta onkin epäselvä. Tämä voi viitata siihen, että WNT/ β -kateniini-viestinsiirto toimii yhdessä muiden vaurion aktivoimien ketjureaktioiden kanssa. Toisaalta primaariset odontoblastit ovat postmitoottisia, kun taas odontoblastien kaltaisiksi erilaistuneilla soluilla saattaa olla vielä jäljellä kasvupotentiaalia niiden kantasolualkuperän vuoksi.

WNT/ β -kateniini-viestinsiirron vastavaikuttajan, GSK3-kinaasin estäjän, viemisen paljastuneeseen hammasyttimeen on todettu *in vivo* -kokeissa edistävän korjaavan hammasluun muodostusta. (Babb ym. 2017.)

6.3.2. GSK-3-vastavaikuttajat hammasvauriossa

GSK-3, eli glykogeenisyntaasikinaasi 3, on entsyymi, joka on avainasemassa WNT-viestinsiirron sytoplasmisessa transduktiossa. GSK-3 edesauttaa WNT-ligandi+reseptori-kompleksin puuttuessa β -kateniinetjureaktion pysähtymistä. WNT-ligandien avulla GSK-3-aktiivisuutta estetään, mikä mahdollistaa β -kateniinin toiminnan transkriptiotekijänä solun tumassa. *AXIN2*-ilmenemisen ja WNT/ β -kateniini-viestinsiirron on osoitettu kasvavan hampaan kovakudosvaurion yhteydessä. Tämän vuoksi voisi olla hyödyllistä edistää korjaavan hammasluun syntymistä käyttämällä WNT-viestinsiirron vastavaikuttajia korjaavan hoidon yhteydessä. Erilaisia GSK-3-vastavaikuttajia on kehitetty, esimerkiksi Alzheimerin taudin hoidossa klinisiin testeihin edennyt Tideglusib.

In vivo -hiirikokeessa GSK-3-estäjillä käsitellyt hampaat ilmensivät kolminkertaisesti *AXIN2*-proteiinia hammasydinvaurion yhteydessä verrattuna MTA:lla käsiteltyihin kontrolleihin. Koe tehtiin viemällä GSK-3-vastavaikuttajaa huokoisen kollageenisienen avulla hammasytimelle, minkä jälkeen vaurio katettiin lasi-ionomeerisementillä. Vertailu tehtiin MTA:lla ja lasi-ionomeerisementillä katettuihin hampaisiin ja hoitamattomiin vertailuhampaisiin.

AXIN2 ilmeni hammasytimen soluissa 24 tuntia kokeen jälkeen kolme kertaa enemmän GSK-3-vastavaikuttajilla hoidetuissa hampaissa verrattuna vertailuhampaisiin. Viisi päivää kokeen jälkeen *AXIN2* ilmeneminen oli laskenut MTA-käsiteltyjen hampaiden tasolle. Tämän voi olettaa johtuvan hammasvaurion seurauksena luonnollisesti muodostuvien odontoblastien kaltaisten solujen toiminnasta.

Koehiiriltä poistetuista hampaista tutkittiin korjaavan hammasluun muodostusta, jonka havaittiin olevan suurempaa GSK-3-estäjillä hoidetuista hampaista. Kokonaismineralisaation todettiin olevan kaksinkertainen verrattuna pelkällä ”tyhjällä” kollageenisienellä katettuun hampaaseen, ja 1,7-kertainen MTA:lla katettuun verrattuna. Kokeessa MTA:n ei havaittu aktivoivan WNT-viestinsiirtoa. Vaikka se

saattaa vaikuttaa jonkin muun signaalireitin aktivaattorina, voi olla syytä olettaa sen mineralisoivan vaikutuksen perustuvan lähinnä sen ominaisuuksiin toimia mineraali-ionien lähteenä. (Neves ym. 2017.)

7. Tulevaisuuden näkymiä

Hampaan kehitykseen liittyvä perustutkimus pyrkii ymmärtämään paremmin monimutkaisia kasvuun liittyviä tekijöitä. Hampaan kehitystä eri vaiheissa ohjaavat ainakin WNT/ β -kateniini-, BMP-, SHH- (sonic hedgehog), EDA- (ektodysplasiini) ja FGF-viestinsiirtojärjestelmät. Näiden järjestelmien ymmärtäminen on avain luonnollisen uudiskasvun hyödyntämiseen hammashoidossa.

Hammaskudospuutoksia korvataan hammashoidossa erilaisilla keinomateriaaleilla, mutta toiveikkaammat tutkimukset tähtäävät jo kokonaisen hampaan uudiskasvuun. Biologinen solulähtöinen korjaaminen oli ideaalinen hoitomuoto vaurioituneen hampaan hoitamiseen. (Li ym. 2019.) Perusajatus on nykyisen keinojuurikantoisen proteettisen hampaan sijasta kasvattaa uusi hammas asettamalla hammasaihe leukaluuhun.

Hampaan kehitykseen ja erityisesti syntymän jälkeiseen uudiskasvuun osallistuvat kantasolut on pystytty tunnistamaan. Molekylaaristen vuorovaikutusten ymmärtäminen voi mahdollistaa vaihtoehtoisten kantasolulähteiden löytymisen. (Balic 2018.)

7.1. Uudishampaan kasvattaminen

Hiirimalleilla on pystytty onnistuneesti kasvattamaan hammas, johon on kasvanut toimiva hermotus sekä hampaan kiinnityskudossäikeet. Tutkimuksessa kovakudoksen laatu oli kelvollinen normaalia parentatoimintaa varten ja hammas puhkesi puretaan. (Ikeda ym. 2009.) Metodi perustuu kolmiulotteisen hammasaiheen kasvattamiseen hiiren epiteliaalisista ja mesenkymaalisisista soluista. Tarvittava sikiövaiheessa tapahtuvaa hampaan kehitystä vastaava vuorovaikutus

epiteliaalisten ja mesenkymaalisten solujen välillä saavutettiin. Rakennettu hammasaihe ilmentää normaaliin kehitykseen liittyviä geenejä. (Nakao ym. 2007.) Uudishampaassa on kyettävä toistamaan "kehityksellinen ohjelma", kuten luonnollisen hampaan kasvun aikana tapahtuu. Kehityksen geneettinen säätely pystytään optimististen näkemysten mukaan selvittämään bioinformatiikan keinoin jopa lähitulevaisuudessa. (Li ym. 2019.)

Uudishampaan kasvattaminen ihmispotilaalle vaikuttaa ongelmalliselta sopivan kantasolulähteen puuttumisen vuoksi. Yksi esitetty vaihtoehto on ihmisen uudelleenohjatut pluripotentit/monikykyiset kantasolut (iPSC). Ennen ihmisellä toimivan hammasaiheen kehitystä on kuitenkin todennettava niille sopiva kasvuympäristö, jossa eri välittäjäaineet pystyvät toimimaan. (Li ym. 2019.)

Myös ihmisen maitohampaan kantasolujen käyttö uuden hammasytimen implantoinnissa vaurioituneeseen hampaaseen on tuottanut lupaavia tuloksia kliinisessä kokeessa (Xuan ym. 2018).

7.2. Leukaluun uudiskasvu

Leukaluun alveoliharjanteen madaltuminen asettaa haasteita irto- sekä implanttiprotetiikalle. Riittämätön luun määrä ja laatu voi heikentää implanttiruuvien ennustetta huomattavasti. Yhtä lailla matala alveoliharjanne voi heikentää irtoproteesin paikallaanpysymistä, mikä monesti vaikuttaa yleiseen elämänlaatuun sekä terveen purentatoiminnan ylläpitoon.

Luutumista edistävien materiaalien kehitys tulee luultavasti vaikuttamaan luun ohjattuun uudiskasvuun positiivisesti. Ominaisuuksiin vaikuttavat myös oleellisesti sopiva huokoisuus sekä bioaktiivisuus. (Bohner ja Miron 2019.) Luuytimestä aspiroituja soluja (Bone marrow aspirate concentrate, BMAC) on käytetty onnistuneesti alveoliluun muodostuksessa. Luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen tiedetään edistävän luun paranemista. Kuitenkaan nykyisillä

tutkimuksilla, ei ole riittävästi näyttöä menetelmän kliinisestä hyödystä. (Ting ym. 2018.)

”BMP-kasvutekijöiden odotetaan – – muodostuvan tulevaisuudessa tärkeäksi osaksi suu- ja leukakirurgisia sekä ortopedisia ja traumatologisia hoitoja”, toteavat Heikinheimo ym. (2004). Kasvutekijää lisäävien hoitojen osalta on kiinnitettävä paljon huomiota mahdollisiin systeemivaikutuksiin ja käytön turvallisuuteen. Vaikka BMP-proteiinien käytöstä on saatu lupaavia tuloksia, tarvitaan vielä lisää tutkimusnäyttöä ennen rutiininomaista käyttöä. Luotettavien tulosten saamiseksi on käytettävä myös laajempaa potilasaineistoa. (Heikinheimo ym. 2004.)

8. Yhteenveto

Alati kasvava ymmärrys kehitysbiologiasta sekä kasvua ohjaavien tekijöiden toiminnasta antaa mahdollisuuksia kehittää tehokkaampia hoitomuotoja. Ennen suuria läpimurtoja tarvitaan kuitenkin runsaasti perustutkimusta. Helppoja ratkaisuja on turha hakea, vaikka suuret lupaukset saisivat paljon huomiota tiedotusvälineissä.

Leukaluun ja hampaan uudiskasvua ohjaavat monimutkaiset signaalintijärjestelmät, jotka vaativat toimiakseen optimaalisen parakriinisen mikroympäristön. Yksittäisen kasvutekijän tarjoaminen kudospuutoksen hoitoon voi johtaa ei-toivottuihin lopputuloksiin. Jo normaalit biologiset kasvurajoitteet estävät nopeat ratkaisut uudiskasvun keinoin. Kudosten biologiaa ymmärtämällä uudiskasvua voidaan tapauskohtaisesti käyttää hyödyksi.

Lähteet

Al-Hamed FS, Mahri M, Al-Waeli H, Torres J, Badran Z, Tamimi F. Regenerative Effect of Platelet Concentrates in Oral and Craniofacial Regeneration. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:126. Published 2019 Sep 3. doi:10.3389/fcvm.2019.00126

Babb R, Chandrasekaran D, Carvalho Moreno Neves V, Sharpe PT. Axin2-expressing cells differentiate into reparative odontoblasts via autocrine Wnt/ β -catenin signaling in response to tooth damage. *Sci Rep*. 2017;7(1):3102. Published 2017 Jun 8. doi:10.1038/s41598-017-03145-6

Baldión PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int J Cell Biol*. 2018;2018:6853189. Published 2018 Feb 19. doi:10.1155/2018/6853189

Balic A. Biology Explaining Tooth Repair and Regeneration: A Mini-Review. *Gerontology*. 2018;64(4):382–388. doi:10.1159/000486592

Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP, Mina M. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone*. 2010;46(6):1639–1651. doi:10.1016/j.bone.2010.02.019

Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;16:1–9. Published 2008 Jul 31. doi:10.22203/ecm.v016a01

Bohner M, Miron RJ. A proposed mechanism for material-induced heterotopic ossification. *Materials Today*, Volume 22, 2019, Pages 132-141, ISSN 1369-7021, doi.org/10.1016/j.mattod.2018.10.036.

Brand RW, Isselhard DE. *Anatomy of Orofacial Structures*. 7th enhanced ed. St. Louis: Mosby, 2013. Print.

Chang F, Kim JM, Choi Y, Park K. MTA promotes chemotaxis and chemokinesis of immune cells through distinct calcium-sensing receptor signaling pathways. *Biomaterials*. 2018;150:14–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.10.009

Chen X, Wang J, Yu L, Zhou J, Zheng D, Zhang B. Effect of Concentrated Growth Factor (CGF) on the Promotion of Osteogenesis in Bone Marrow Stromal Cells (BMSC) in vivo. *Sci Rep*. 2018;8(1):5876. Published 2018 Apr 12. doi:10.1038/s41598-018-24364-5

D'Addona A, Nowzari H. Intramembranous autogenous osseous transplants in aesthetic treatment of alveolar atrophy. *Periodontol 2000*. 2001;27:148–161. doi:10.1034/j.1600-0757.2001.027001148.x

Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol*. 1998;202(2):215–227. doi:10.1006/dbio.1998.8992

Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*. 2000;127(22):4775–4785.

Draenert FG, Huetzen D, Neff A, Mueller WE. Vertical bone augmentation procedures: basics and techniques in dental implantology. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(5):1605–1613. doi:10.1002/jbm.a.34812

Dumic-Cule I, Peric M, Kucko L, Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. *Int Orthop*. 2018;42(11):2619–2626. doi:10.1007/s00264-018-4153-y

Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, et al. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol*. 2005;76(4):605–613. doi:10.1902/jop.2005.76.4.605

Haumer A, Bourguine PE, Occhetta P, Born G, Tasso R, Martin I. Delivery of cellular factors to regulate bone healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:285–294. doi:10.1016/j.addr.2018.01.010

Heikinheimo K, Kokkari A, Turunen T, Aro H. Kasvutekijöiden käyttömahdollisuuksia luupuutosten ja -sairauksien hoidossa. *Duodecim* 120:311–318, 2004.

Honda MJ, Shinohara Y, Hata KI, Ueda M. Subcultured odontogenic epithelial cells in combination with dental mesenchymal cells produce enamel-dentin-like complex structures. *Cell Transplant*. 2007;16(8):833–847. doi:10.3727/000000007783465208

Ikeda E, Morita R, Nakao K, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13475–13480. doi:10.1073/pnas.0902944106

Juuri E, Balic A. The Biology Underlying Abnormalities of Tooth Number in Humans. *J Dent Res*. 2017;96(11):1248–1256. doi:10.1177/0022034517720158

Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):E1. Published 2001 Apr 15. doi:10.3171/foc.2001.10.4.2

Kan C, Ding N, Yang J, et al. BMP-dependent, injury-induced stem cell niche as a mechanism of heterotopic ossification. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):14. Published 2019 Jan 11. doi:10.1186/s13287-018-1107-7

Kettunen P, Laurikkala J, Itäranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn.* 2000;219(3):322–332. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1062>3.0.CO;2-J

Kim TH, Bae CH, Lee JC, et al. β -catenin is required in odontoblasts for tooth root formation. *J Dent Res.* 2013;92(3):215–221. doi:10.1177/0022034512470137

Krishnakumar GS, Roffi A, Reale D, Kon E, Filardo G. Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. *Int Orthop.* 2017;41(6):1073–1083. doi:10.1007/s00264-017-3471-9

Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016;56(4):144–153. doi:10.1111/cga.12169

Lee JS, Jung JS, Im GI, Kim BS, Cho KS, Kim CS. Ridge regeneration of damaged extraction sockets using rhBMP-2: an experimental study in canine. *J Clin Periodontol.* 2015;42(7):678–687. doi:10.1111/jcpe.12414

Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development.* 2008;135(17):2845–2854. doi:10.1242/dev.023788

Li L, Tang Q, Wang A, Chen Y. Regrowing a tooth: in vitro and in vivo approaches. *Curr Opin Cell Biol.* 2019;61:126–131. doi:10.1016/j.ceb.2019.08.002

Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol.* 2001;19(7):255–265. doi:10.1016/s0167-7799(01)01665-1

Liu F, Chu EY, Watt B, et al. Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol.* 2008;313(1):210–224. doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.016

Loeffler J, Duda GN, Sass FA, Dienelt A. The Metabolic Microenvironment Steers Bone Tissue Regeneration. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(2):99–110. doi:10.1016/j.tem.2017.11.008

Mathew MG, Soni AJ, Khan MM, Kauser A. A novel approach to regenerate bone loss in an adolescent using concentrated growth factors: One-year follow-up. *J Family Med Prim Care.* 2020;9(1):428–431. Published 2020 Jan 28. doi:10.4103/jfmprc.jfmprc_919_19

Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807–5812. doi:10.1073/pnas.0937635100

Nakao K, Morita R, Saji Y, et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods.* 2007;4(3):227–230. doi:10.1038/nmeth1012

Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Sci Rep*. 2017;7:39654. Published 2017 Jan 9. doi:10.1038/srep39654

Park HC, Kim SG, Oh JS, et al. Early Bone Formation at a Femur Defect Using CGF and PRF Grafts in Adult Dogs: A Comparative Study. *Implant Dent*. 2016;25(3):387–393. doi:10.1097/ID.0000000000000423

Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149–155. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0

Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*. 2005;84(10):907–912. doi:10.1177/154405910508401007

Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016;143(13):2273–2280. doi:10.1242/dev.134189

Shilpa PS, Kaul R, Sultana N, Bhat S. Stem cells: Boon to dentistry and medicine. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013;10(2):149–154. doi:10.4103/1735-3327.113321

Shim JY, Lee Y, Lim JH, et al. Comparative Evaluation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2/Hydroxyapatite and Bovine Bone for New Bone Formation in Alveolar Ridge Preservation. *Implant Dent*. 2018;27(6):623–629. doi:10.1097/ID.0000000000000814

Shinmura Y, Tsuchiya S, Hata K, Honda MJ. Quiescent epithelial cell rests of Malassez can differentiate into ameloblast-like cells. *J Cell Physiol.* 2008;217(3):728–738. doi:10.1002/jcp.21546

Song M, Yu B, Kim S, et al. Clinical and Molecular Perspectives of Reparative Dentin Formation: Lessons Learned from Pulp-Capping Materials and the Emerging Roles of Calcium. *Dent Clin North Am.* 2017;61(1):93–110. doi:10.1016/j.cden.2016.08.008

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1(1):e79. Published 2006 Dec 20. doi:10.1371/journal.pone.0000079

Stegen S, Carmeliet G. The skeletal vascular system - Breathing life into bone tissue. *Bone.* 2018;115:50–58. doi:10.1016/j.bone.2017.08.022

Tamura M, Nemoto E. Role of the Wnt signaling molecules in the tooth. *Jpn Dent Sci Rev.* 2016;52(4):75–83. doi:10.1016/j.jdsr.2016.04.001

Ting M, Afshar P, Adhami A, Braid SM, Suzuki JB. Maxillary sinus augmentation using chairside bone marrow aspirate concentrates for implant site development: a systematic review of histomorphometric studies. *Int J Implant Dent.* 2018;4(1):25. Published 2018 Sep 3. doi:10.1186/s40729-018-0137-3

Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod.* 2018;44(1):126–132. doi:10.1016/j.joen.2017.07.017

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7260–7264. doi:10.1073/pnas.87.18.7260

Vallittu PK, Boccaccini AR, Hupa L, Watts DC. Bioactive dental materials-Do they exist and what does bioactivity mean?. *Dent Mater*. 2018;34(5):693–694. doi:10.1016/j.dental.2018.03.001

Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol*. 2010;20(12):715–722. doi:10.1016/j.tcb.2010.09.012

Wang L, Wan M, Li Z, Zhong N, Liang D, Ge L. A comparative study of the effects of concentrated growth factors in two different forms on osteogenesis in vitro. *Mol Med Rep*. 2019;20(2):1039–1048. doi:10.3892/mmr.2019.10313

Xuan K, Li B, Guo H, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Sci Transl Med*. 2018;10(455):eaaf3227. doi:10.1126/scitranslmed.aaf3227

Yu J, Wang Y, Deng Z, et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell*. 2007;99(8):465–474. doi:10.1042/BC20070013

Zarei F, Soleimaninejad M. Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup1):906–911. doi:10.1080/21691401.2018.1439836

Zhang K, Zhang N, Weir MD, Reynolds MA, Bai Y, Xu HHK. Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):669–687.
doi:10.1016/j.cden.2017.05.002