



Статья

Применение частиц дентина для регенерации костной ткани: исследование *in vitro*

Giulia Brunello^{1,2}, Federica Zanotti³, Gerard Scortecchi⁴, Lari Sapoznikov⁵, Stefano Sivoletta¹ и Barbara Zavan^{3,*}



Для цитирования: Brunello, G.; Zanotti, F.; Scortecchi, G.; Sapoznikov, L.; Sivoletta, S.; Zavan, B. Dentin Particulate for Bone Regeneration: An In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9283. <https://doi.org/10.3390/ijms23169283>

Научный редактор: Koroush Kabir

Получена: 10 июля 2022 г.

Принята в печать: 3 августа 2022 г.

Опубликована: 18 августа 2022 г.

Примечание издателя: MDPI сохраняет нейтралитет по отношению к заявлениям, связанным с юрисдикцией, и относящимся к опубликованным картам и сведениям о принадлежности учреждений.



Авторское право: © 2022, авторы. Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария. Эта статья находится в открытом доступе и распространяется в соответствии с условиями лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Кафедра неврологии, стоматологическое отделение, Падуанский университет, 35122 Падуа, Италия

² Отделение хирургической стоматологии, Университетская клиника Дюссельдорфа, 40225 Дюссельдорф, Германия

³ Кафедра трансляционной медицины, Университет Феррары, 44121 Феррара, Италия

⁴ Университетский институт заболеваний головы и шеи Ниццы и Центр Лакассань (IUF), 06100 Ницца, Франция

⁵ Независимый исследователь, Тель-Авив 6997801, Израиль

* Адрес для корреспонденции: barbara.zavan@unife.it

Аннотация. Целью данного исследования *in vitro* было изучение детерминации и поведения стволовых клеток пульпы зуба (СКПЗ) при посеве на два различных остеопластических материала: частицы дентина (ЧД) человека и депротенинизированный матрикс бычьей кости (МБК), по сравнению с клетками, посеянными на питательную среду без добавок. Для изучения одонтогенной и остеогенной дифференцировки и пролиферации клеток были проведены анализы экспрессии генов, а также эпигенетические и морфологические исследования. Также были проведены испытания прочности на сжатие остеопластических материалов, на которые был выполнен посев СКПЗ. Дифференцировку СКПЗ в одонтобластоподобные клетки обнаруживали на основании повышения уровня одонтогенных маркеров (DSPP и MSX) и остеогенных маркеров (RUNX2, щелочная фосфатаза, остеоонектин, остеокальцин, коллаген I типа, bmp2, smad5/8). Эпигенетические исследования подтвердили наличие микроРНК, участвующих в одонтогенной или остеогенной детерминации СКПЗ, культивируемых в течение 21 дня на ЧД. Значения прочности на сжатие, полученные для внеклеточного матрикса (ВКМ), синтезированного СКПЗ, были выше при посеве на ЧД по сравнению с посевом на МБК. Высокая экспрессия фактора VEGF, который связан с ангиогенезом, и дентинного сиалопротеина наблюдалась только в присутствии ЧД. Морфологический анализ подтвердил типичный фенотип одонтобластов взрослых. В заключение следует отметить, что одонтогенная и остеогенная детерминация СКПЗ и их соответствующие функции могут быть достигнуты на ЧД, что обеспечивает исключительное качество регенерации дентина и костной ткани.

Ключевые слова: одонтогенез; дентин; дентиногенез; эмбриональный; Ivory

1. Введение

Для устранения дефектов альвеолярной кости вследствие потери зубов, травм или заболеваний в рамках подготовки к реабилитации пациентов с помощью дентальных имплантатов применяют различные методы, такие как аугментация альвеолярного гребня или поднятие дна верхнечелюстной пазухи (синус-лифтинг). Выбор наиболее подходящего заменителя костной ткани среди множества аутологических, гомологичных, гетерологичных и синтетических остеопластических материалов является сложной задачей [1–5]. У пациентов, которым требуется удаление зуба, можно использовать остеопластический материал, полученный из зуба, с учетом его аутологичного происхождения и благоприятных клинических и гистологических результатов при применении подобных материалов. Сходство между органическими и неорганическими компонентами кости и зуба, а также наличие остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств у аутологических частиц зубов подтверждают целесообразность использования этого остеопластического материала [6–12].

В ряде опубликованных исследований *in vivo* на животных и людях, в которых изучали применение аутологических частиц дентина (ЧД), показана их эффективность с точки зрения минимальной резорбции трансплантата, ограниченного количества послеоперационных осложнений, легкости помещения в принимающее ложе и стабильности при наблюдении после установки дентальных имплантатов [13–21]. По данным гистологических исследований, рост образующейся костной ткани происходит непосредственно на поверхности трансплантата из ЧД, а между костью хозяина, новообразованной костью и материалом трансплантата образуется минерализованное матричное соединение (анкилоз) [15,16,18,19]. В процессе заживления относительная доля костной ткани увеличивается, а доля ЧД со временем уменьшается [13,15].

Показано, что мезенхимальные стволовые клетки взрослых, в частности стволовые клетки пульпы зуба (СКПЗ), культивируемые на биоинструктивном каркасе, полученном из дентина, могут дифференцироваться и секретировать внеклеточный матрикс (ВКМ), способный управлять остеогенезом и дентиногенезом как *in vitro*, так и *in vivo* [22]. Структурный и биохимический состав ЧД сопоставим с составом натуральной костной ткани. Это может способствовать механической индукции, которая положительно влияет на дифференцировку и пролиферацию клеток, а также на организацию ВКМ. Децеллюляризованные материалы ВКМ оказались идеальными вариантами для применения в тканевой инженерии [23].

В свете вышеизложенных данных аутологичный дентин из зубов, удаленных у того же пациента, может эффективно поддерживать регенерацию костной ткани. Аутологичный дентин применяют в качестве заменителя костной ткани по следующим причинам: отсутствие реакции отторжения трансплантата организмом хозяина; очень медленная резорбция (до 10 лет); быстрое и прочное сращение дентина с костью хозяина (в течение нескольких недель), что позволяет проводить последующее лечение; полное соответствие механических свойств аутологичного дентина и интрамембранозной кортикальной костной ткани челюсти [24,25]; и образование конгломерата «кость — дентин». С 1980-х гг. в нескольких клинических исследованиях изучали применение дентина в качестве биоматериала для индукции формирования костной ткани, и были получены многообещающие результаты [26–28].

Заменители костной ткани, такие как депротеинизированный матрикс бычьей кости, широко используются в клинической практике; однако присутствие коллагена и неколлагеновых белков (НКБ), включая факторы роста, в ЧД может привести к более высокой биоактивности [29–34].

Аутологичные дентинные трансплантаты можно получить в стоматологической клинике сразу после удаления зуба (клинический метод) [30,31]. В качестве альтернативы, удаленные зубы можно отправить в специализированные банки тканей, где их превратят в деминерализованные трансплантаты на основе дентинной матрицы и возвратят стоматологу для использования в клинических целях [32,33]. Последняя процедура занимает много времени, и остеопластический материал не может быть подготовлен немедленно, тогда как при клиническом методе трансплантат, полученный из удаленного зуба, можно подготовить без задержек и использовать сразу во время той же хирургической операции.

В свете всех этих соображений целью настоящего исследования было изучение того, как способность ЧД к механической индукции может повлиять на одонтогенные и остеогенные свойства СКПЗ по сравнению с депротеинизированной матрицей бычьей кости. Дополнительной целью была оценка механических свойств ВКМ частиц зубов *in vitro*.

2. Результаты

2.1. Характеристика СКПЗ методом проточной цитометрии

Характеристику поверхностных антигенов СКПЗ выполняли методом проточной цитометрии. Обнаружено, что СКПЗ являются положительными по маркерам мезенхимальных стволовых клеток (МСК) CD29, CD73, CD90 и CD105 и отрицательными по гемопоэтическим маркерам CD14 и CD45 (рисунок 1).

2.2. Пролиферация клеток

Способность к пролиферации на ЧД исследовали методом посева СКПЗ. Пролиферацию клеток на ЧД оценивали с использованием значения ОП, полученного при посеве на МБК; значимых различий между двумя типами гранул ни в одной временной точке не наблюдалось (рисунок 2); таким образом, как МБК, так и ЧД одинаково хорошо поддерживали пролиферацию клеток.

2.3. Экспрессия генов маркеров одонтобластов и остеобластов

Способность остеопластических материалов поддерживать одонтогенную и/или остеогенную детерминацию устанавливали путем измерения экспрессии генов через 21 день культивирования (рисунок 3). При культивировании СКПЗ на ЧД, отмечалась сверхэкспрессия предшественника сиалопротеина дентина (DSPP) — гена, связанного с одонтогенной линией — тогда как при посеве клеток на МБК он не был обнаружен ($p < 0,001$). Также обнаружена сходная экспрессия генов из семейства гомеобокса мышечного сегмента (MSX), которые участвуют в процессе кальцификации. Напротив, экспрессия генов, связанных с остеогенной детерминацией, таких как фактор транскрипции 2, связанный с карликовостью (RUNX2), остеокальцин (OC), остеонектин (ON), щелочная фосфатаза (ALP) и коллаген типа I (COL1A1), отмечалась на обоих остеопластических материалах.

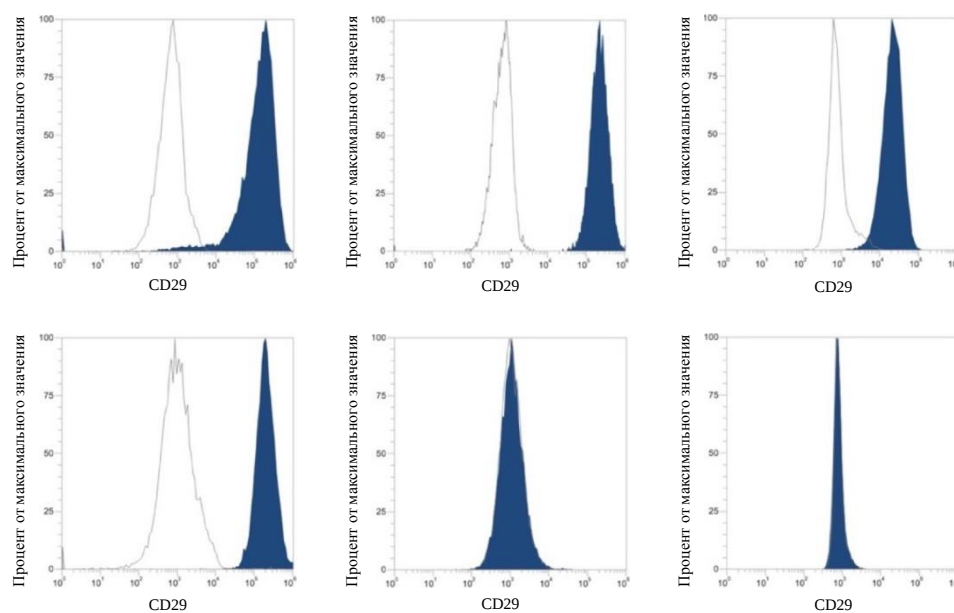


Рисунок 1. Характеристика поверхностных клеточных маркеров СКПЗ на 3-м пассаже методом проточной цитометрии. Стволовые клетки, выделенные из пульпы зуба, положительны по специфическим маркерам MCK CD29, CD73, CD90 и CD105 и отрицательны по гемопоэтическим маркерам CD14 и CD45. Белый цвет — отрицательный результат, синий цвет — положительный результат.

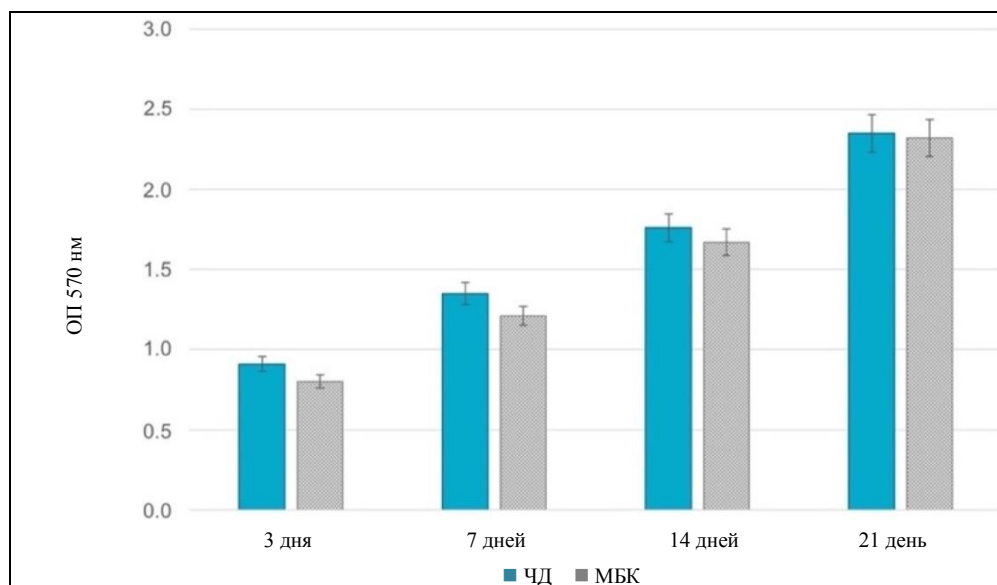


Рисунок 2. МТТ-тест на гранулах ЧД (голубые столбики) и МБК (серые столбики). Испытания проводились с дня 3 по день 21 культивирования. На графике показаны средние значения $\pm$ SD, полученные в трех различных экспериментах.

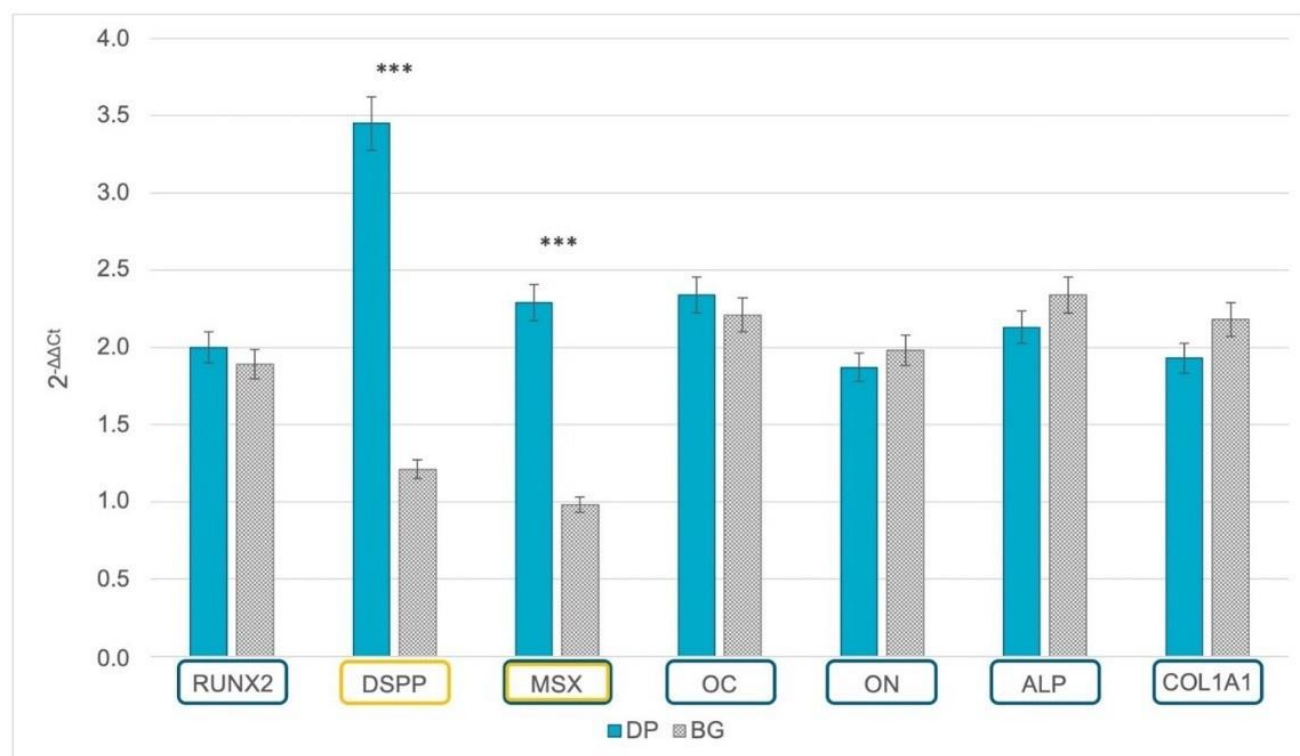


Рисунок 3. ПЦР в режиме реального времени для определения одонтогенных и остеогенных маркеров (выделены соответственно оранжевым и синим цветом). Уровни экспрессии генов выбранных маркеров сравниваются между образцами, полученными из гранул ЧД (голубые столбики) и МБК (серые столбики) после 21 дня культивирования. На графике показаны средние значения $\pm$ SD, полученные в трех различных экспериментах. *** $p < 0,001$. Полученное значение кратности сравнивают с соответствующим значением для клеток, культивируемых на пластиковых подложках. Продолжительность культивирования составила 21 день.

2.4. Эпигенетика

Влияние внеклеточной среды на конечное направление дифференцировки СКПЗ изучали с помощью экспрессии генов эпигенетических маркеров, связанных с одонтогенезом и остеогенезом. Для образцов были отобраны две группы генов, вовлеченных в определенные пути, способные повлиять на окончательную детерминацию стволовых клеток, а именно гены одонтобластов и остеобластов. В формировании фенотипа одонтобластов участвовали гены CREB и SMAD1. Белки, способные индуцировать формирование фенотипа остеобластов, кодировались генами WNT, RAC, CTNNB1, TGF, SMAD4, SMAD5, SMAD8, BMP2 и p38MAPK. Как показано на рисунке 4А, СКПЗ могли экспрессировать гены, связанные с фенотипом одонтобластов, только после культивирования на ЧД, и они характеризовались сильной экспрессией SMAD1. Если клетки высевали на МБК, экспрессия того же гена была значимо ниже. Что касается остеогенной линии, клетки были способны экспрессировать гены, связанные с остеогенно-подобным фенотипом, в большей степени на ЧД, чем на МБК.

Вторая группа рассматриваемых генов связана с эпигенетической регуляцией (рисунок 4 В, С), например, микроРНК 26/27/32/586/885-5/smad5 и smad8 для линии остеобластов, а также микроРНК 218 и микроРНК 200 для одонтогенной линии. В этом случае ЧД поддерживали экспрессию микроРНК, участвующих в одонтогенезе и остеогенезе, тогда как МБК поддерживал только остеобластическую детерминацию, причем в меньшей степени. Увеличение bmp2 и smad5/8 является дополнительным доказательством того, что 3D-скаффолды в любом случае поддерживают остеогенную детерминацию.

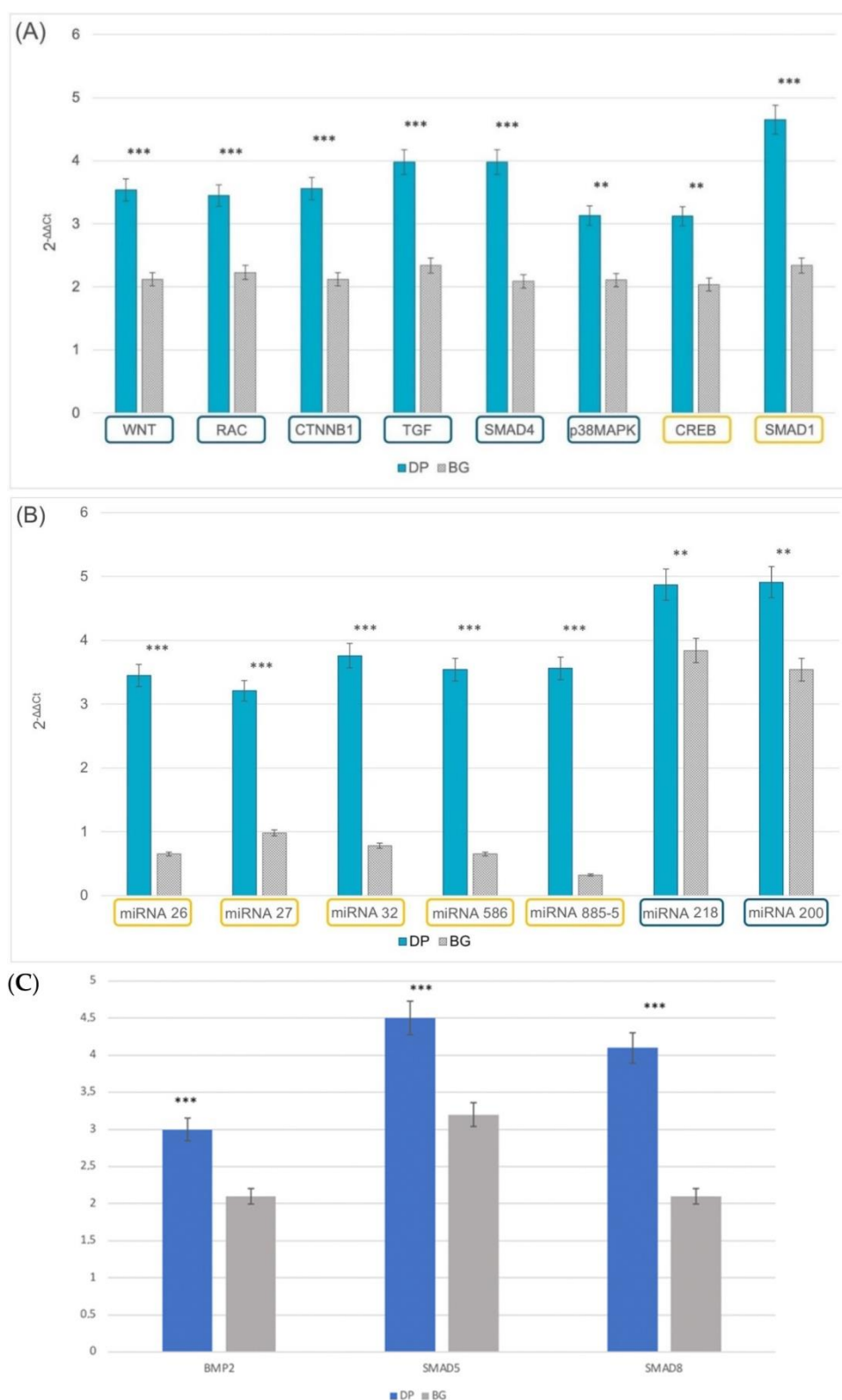
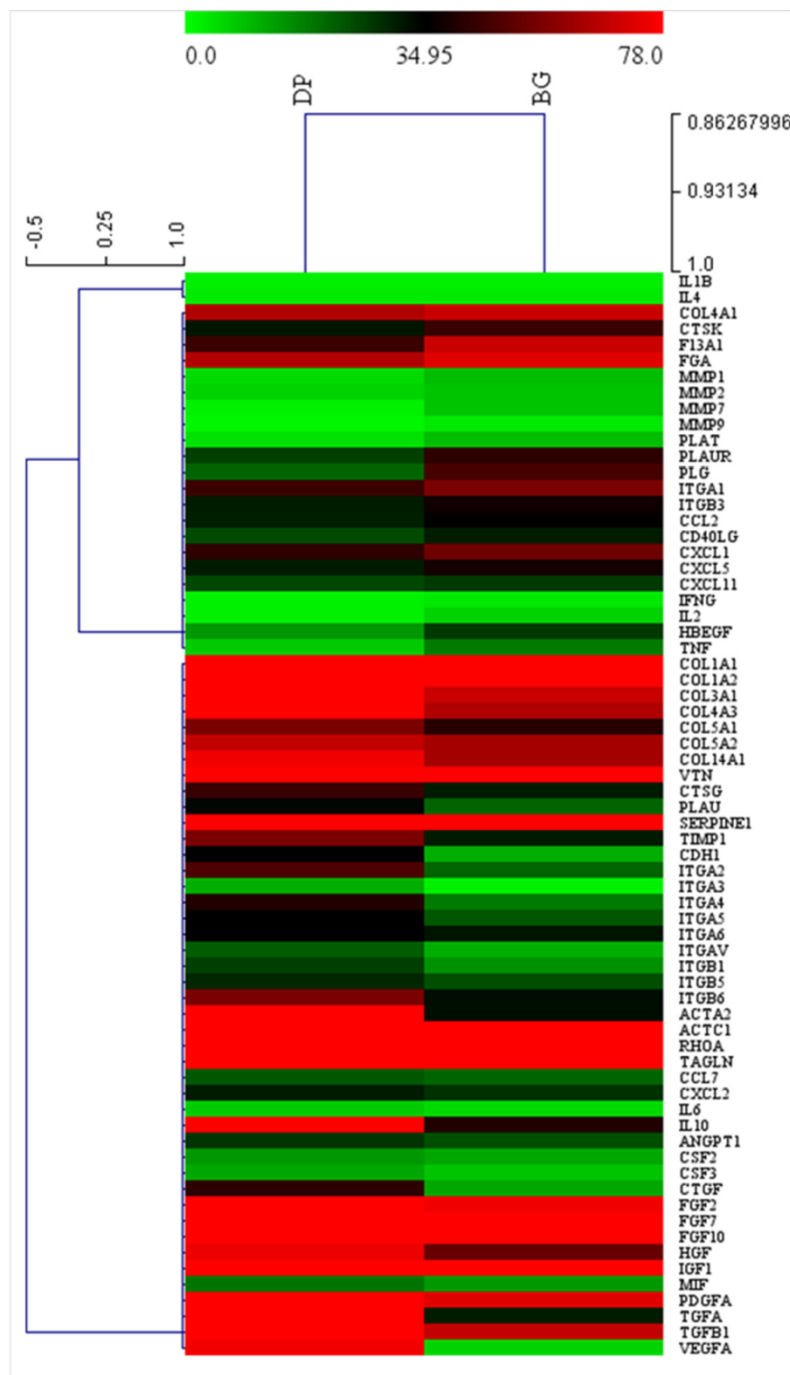


Рисунок 4. ПЦР в режиме реального времени генов белков (А), микроРНК (В) и мРНК (С), участвующих в одонтогенной или остеогенной детерминации СКПЗ, культивируемых до 21 дня на ЧД (голубые столбики) или МБК (серые столбики). Гены, участвующие в одонтогенной детерминации, выделены оранжевым цветом, а гены, связанные с остеогенной детерминацией — синим. На графиках показаны средние значения $\pm$ SD, полученные в трех различных экспериментах. Полученное значение кратности сравнивают с соответствующим значением для клеток, культивируемых на пластиковых подложках. Продолжительность культивирования составила 21 день. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.5. Внеклеточный матрикс и белки адгезии

Проведена оценка экспрессии генов, связанных с внеклеточным матриксом (ВКМ) и белками адгезии (рисунок 5а). При культивировании СКПЗ до 21 дня на ЧД или МБК отмечена сходная экспрессия структурных белков, таких как коллаген I типа, витронектин и серпин. С другой стороны, в группе ЧД обнаружены более высокие значения экспрессии внутриклеточных белков, связанных с внеклеточной средой, таких как актин, и белков клеточной адгезии, таких как интегрины, противовоспалительный фактор интерлейкин-10 (IL-10) и фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF), который является фундаментальным фактором ангиогенеза, а также TGF и факторы роста фибробластов (FGF).



(a)

Рисунок 5. Продолжение

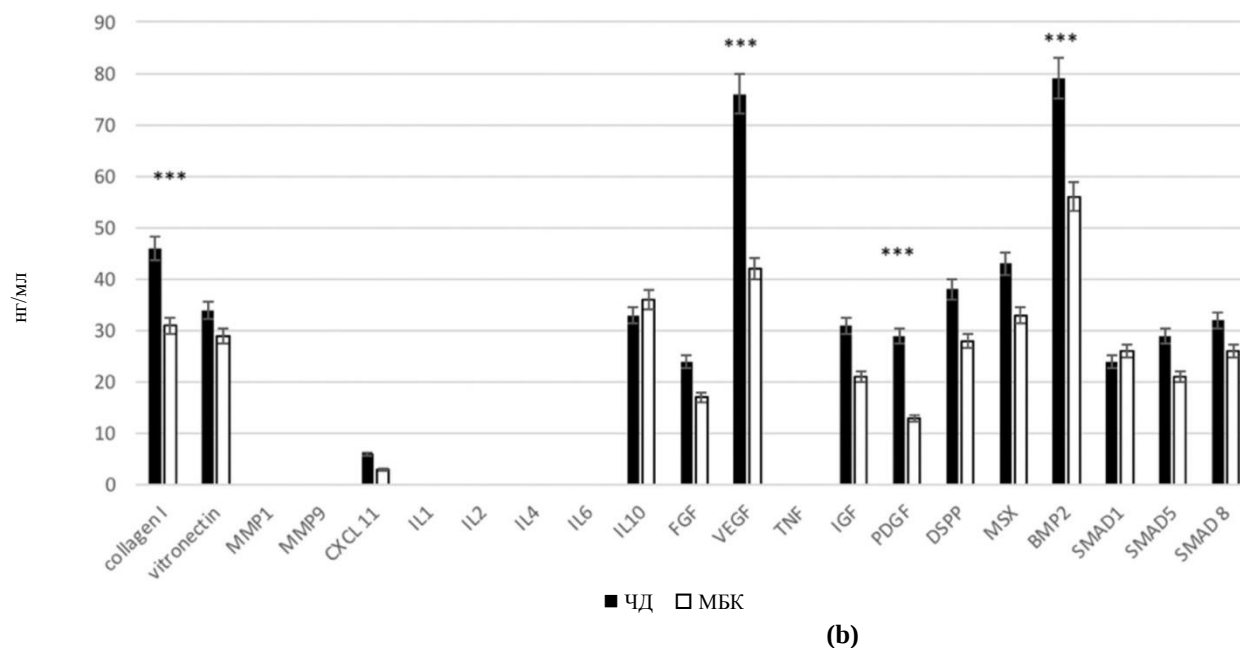


Рисунок 5. (а) Графическое представление результатов ПЦР в реальном времени по определению мРНК, связанных с генами ВКМ и адгезивными белками СКПЗ, при культивировании до 21 дня на ЧД (голубые столбики) или МБК (серые столбики); (б) ИФА-анализ белков, экспрессируемых СКПЗ, при культивировании до 21 дня на ЧД (слева) или МБК (справа).
*** $p < 0,001$.

Растворимые белки, такие как коллаген I типа и витронектин, которые связаны с внеклеточным матриксом (ВКМ), ферменты, связанные с ремоделированием ВКМ, такие как металлопротеиназы типа 1 и 9, иммунозависимые цитокины (CXCL11, IL-1-2-4-6-10) и факторы роста (FGF, VEGF, TNF, IGF, PDGF), определяли методом ИФА с целью подтверждения тенденций, полученных с помощью экспрессии генов. Как показано на рисунке 5b, при использовании обоих типов скаффолдов коллаген I типа и витронектин образуются в больших количествах; то же самое относится и к противовоспалительному цитокину IL-10, что подтверждает превосходные биологические свойства скаффолда. Во всех условиях экспериментов обнаружены белки, связанные с воспалением, такие как IL-1-2-4-6 и TNF. Факторы роста присутствовали в высоких концентрациях в обоих скаффолдах, хотя выработка VEGF, который играет важную роль на первом этапе регенерации, была выше при использовании дентинного материала. Синтез cxcl11, FGF и SMAD5/8 увеличился, но не достиг уровня статистической значимости.

2.6. Внутриклеточная активность ЩФ

Способность к продукции костного ВКМ исследовали на основании активности щелочной фосфатазы (ЩФ). На первом этапе минерализации ВКМ костной ткани образуются кристаллы гидроксиапатита внутри матричных пузырьков, отпочковывающихся от поверхностной мембраны одонтобластов и остеобластов. Последующее распространение гидроксиапатита в ВКМ и его отложение между коллагеновыми фибриллами обеспечивает минерализацию ВКМ. К ингибиторам образования гидроксиапатита относятся внеклеточные неорганические пирофосфаты, которые в нормальных условиях гидролизуются под действием ЩФ с образованием неорганических фосфатов, что способствует минерализации. Как показано на рисунке 6, использование скаффолда на основе дентина (ЧД) приводило к большей концентрации ЩФ (синие столбики), что подтверждает его способность поддерживать более быструю минерализацию ВКМ.

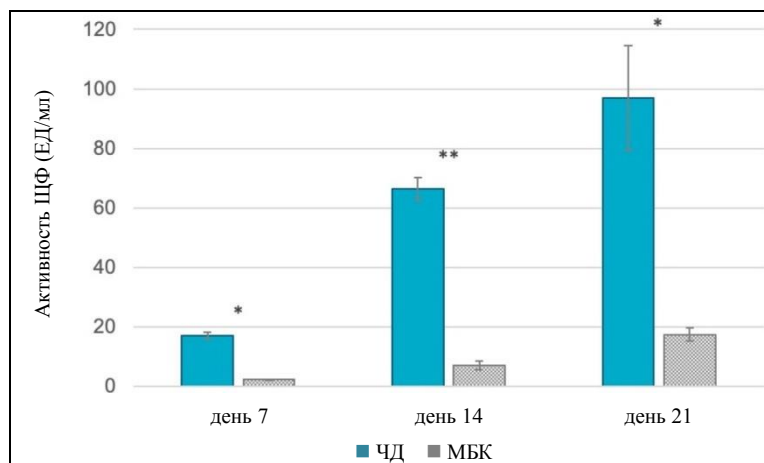


Рисунок 6. Количественная оценка внутриклеточной активности ЦФ (выраженной в ЕД/мл) в СКПЗ при культивировании на ЧД (голубые столбики) или МБК (серые столбики) через 7, 14 и 21 день после посева. На графике показаны средние значения $\pm$ SD, полученные в трех различных экспериментах. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.7. Морфология

Взаимодействия между СКПЗ и ЧД и МБК были подробно исследованы с помощью СЭМ. Как показано на рисунке 7, клетки были прикреплены к гранулам обоих материалов. Через 21 день культивирования СКПЗ взаимодействовали напрямую с обоими материалами, причем клетки, культивированные на ЧД, имели типичный фенотип одонтобластов (длинный отросток и очень короткое тело) (рисунок 7А), тогда как клетки, посеянные на МБК, были плоскими и имели остеобластоподобный фенотипом (рисунок 7В). На поверхности ЧД клетки имели столбчатое цилиндрическое тело, соединенное непосредственно небольшими тонкими филаментами с телами соседних клеток.

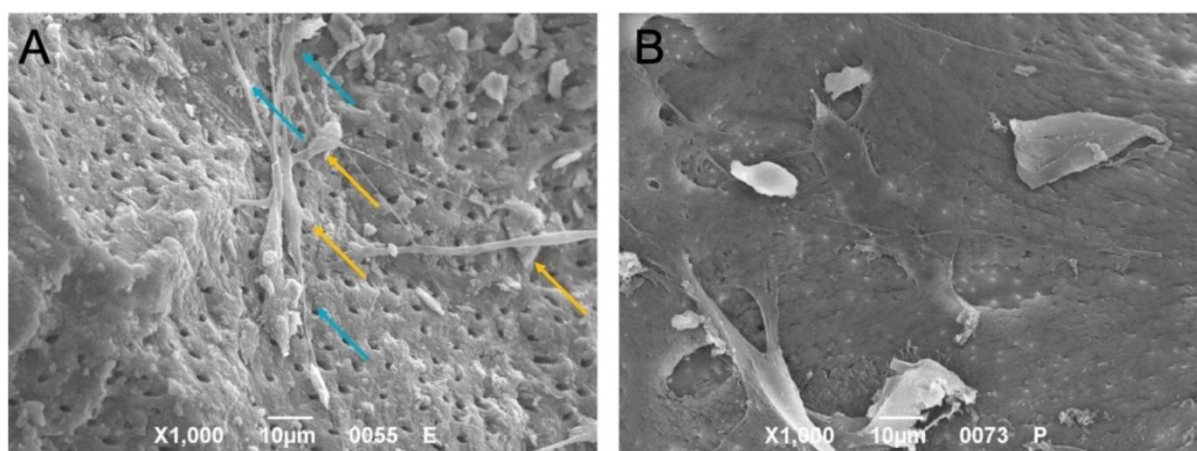


Рисунок 7. СЭМ СКПЗ, культивированных на гранулах ЧД или МБК (соответственно (А) и (В)). При посеве клеток на ЧД они приобретали фенотип одонтобластов, характеризующийся коротким телом (оранжевые стрелки) и удлиненным клеточным отростком (голубые стрелки).

2.8. Компрессионные свойства внеклеточного матрикса

Механические свойства ЧД и МБК без клеток и после 21 дня культивирования клеток представлены на рисунке 8. Результаты испытаний на осевое сжатие ЧД и МБК до и после 21 дня культивирования клеток имели тенденцию к увеличению с течением времени в группе ЧД, тогда как в группе МБК они оставались стабильными. Различия в предельной прочности на сжатие между образцами ЧД и МБК после 21 дня культивирования не были статистически значимыми. Сходным образом, значимых различий в модуле сжатия между ЧД и МБК после 21 дня культивирования клеток не наблюдалось.

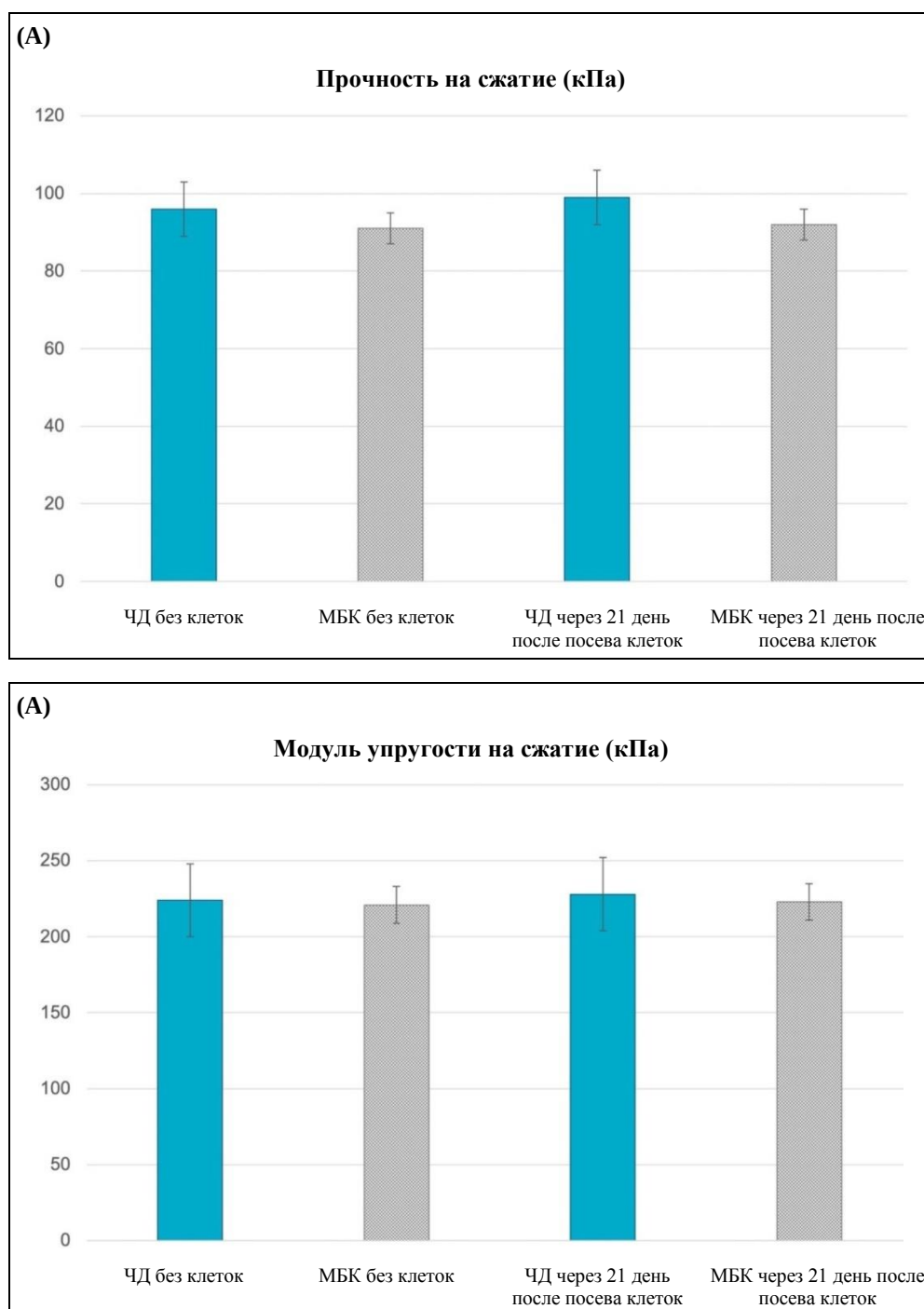


Рисунок 8. Прочность на сжатие (А) и модуль упругости на сжатие (не наблюдалось) ЧД и МБК без клеток и через 21 день после посева клеток.

3. Обсуждение

Все клетки взаимодействуют с окружающим внеклеточным матриксом (ВКМ); подобное взаимодействие стволовых клеток лежит в основе управления их дифференцировкой. Нанотопография, жесткость, состав стрессовых белков и напряжение, присущие любому ВКМ, влияют на детерминацию линии стволовых клеток [35–41]. Это динамическое взаимодействие клеток и ВКМ со временем развивается, и именно в результате этого согласованного взаимодействия формируются ткани. Мезенхимальные стволовые клетки могут образовывать хрящи, кости, мышцы и сухожилия; несмотря на возможность контроля их дифференцировки, она должна соответствовать физическим свойствам невероятно сложной естественной микросреды для достижения регенеративных целей [36,42–46]. Долгое время считалось, что судьба стволовых клеток полностью зависит от биохимических посредников, в то время как ранние данные, указывающие на механически обусловленное поведение этих клеток, привлекали меньше

внимания [47]. Независимые механические факторы, управляющие детерминацией стволовых клеток, включают напряжение [37], эластичность [38,48–50] и нанотопографию [39,51], присущие ВКМ. Жесткость, прочность на сжатие и размер пор влияют на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток во время заживления костной ткани [38,52,53]. Физическая среда, с которой взаимодействует резидентная мезенхимальная стволовая клетка посредством внеклеточного матрикса, играет важную роль в определении окончательной судьбы клетки. Жесткость ВКМ направляет развитие клетки и определяет ее реакцию на заболевание или повреждение. В некотором смысле кость — наиболее чувствительный орган к механическим воздействиям, поскольку при естественном механическом воздействии она подвергается постоянному ремоделированию [36]. На основании клинического опыта известно, что отсутствие механических стимулов или уменьшение внешней механической нагрузки снижает формирование костной ткани, выполняющей опорную функцию, и ослабляет структуру кости [54]. Несколько исследователей продемонстрировали, что в механических стимулах, модулирующих активность остеогенных клеток и формирование костной ткани, участвуют многофакторные регуляторы, включая гормоны или цитокины, белки цитоскелета, сигнальные пути и микроРНК.

Эпигенетика — это наука, целью которой является определение транскрипционных факторов и корегуляторов, локализованных в тканях, которые влияют на экспрессию генов, участвующих в этом процессе, а затем и в одонто- и остеогенных процессах, а также на формирование, ремоделирование и восстановление кости. Эти процессы контроля включают транскрипционный контроль генов посредством модификации хроматина и нуклеосомной архитектуры, метилирование-фосфорилирование ДНК и деградацию, опосредованную убиквитином, а также модуляцию количества белков посредством микроРНК. МикроРНК открывают новые возможности в отношении посттранскрипционного контроля благодаря своей способности напрямую ингибировать трансляцию мРНК путем связывания с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) целевых молекул мРНК. Этот процесс часто приводит к деградации мРНК. Сначала микроРНК образуются в ядре, а затем созревают в цитоплазме и переходят в активную форму под действием фермента Dicer. Более того, микроРНК могут быть включены в комплекс РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), благодаря чему они способны маркировать и подавлять трансляцию нескольких мРНК, тем самым регулируя почти 30 % генов, кодирующих белки, и различные внутриклеточные процессы. Кроме того, микроРНК играют важную роль в миграции и детерминации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в процессе заживления костной ткани. Подгруппа микроРНК также чувствительна к различным механическим стимулам. Они называются «механочувствительными» микроРНК [55–57] и часто участвуют в процессах остеогенеза и одонтогенеза. Изменения уровня этих микроРНК коррелируют с внеклеточными механическими стимулами, с сопутствующим изменением уровней мРНК белков ВКМ (таких как коллаген, остеопонтин, остеокальцин, остеонектин и сиалопротеин дентина), ферментов, участвующих в кальцификации ВКМ (таких как щелочная фосфатаза), транскрипционных факторов, вовлеченных в остеогенез (таких как RUNX), и внутриклеточных регуляторов (таких как WNT, семейство SMAD и CREB).

Клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе влияния механочувствительных микроРНК на формирование костной ткани, изучены недостаточно и могут стать предметом дальнейших исследований. Действительно, несколько микроРНК участвуют в этих процессах за счет масштабной регуляции молекулярных сетей; изучение их функций может привести к разработке новых подходов к регенерации тканей и модификации генетических нарушений. В настоящей статье авторы уделили особое внимание этим новым молекулярным факторам, поскольку сохранение механических свойств клеток, культивируемых на поверхности скаффолдов, имеет решающее значение для успешного использования остеопластических материалов в стоматологии, так как в подобных случаях они подвергаются воздействию жевательной нагрузки. В ранее проведенных исследованиях [21] показано, что использование ЧД не оказывает неблагоприятного воздействия на механические свойства костной ткани человека и улучшает ее регенерацию в клинических условиях за счет его превосходных остеогенных свойств. В настоящем исследовании положительные эффекты использования ЧД в качестве аутологичного заменителя костной ткани, полученного из ЧД, показаны на молекулярном уровне: установлено, что ЧД существенно ускоряют процессы остеогенеза и одонтогенеза. Анализ экспрессии генов и морфологический анализ подтвердили, что СКПЗ способны приобретать как остеогенный фенотип, так и фенотип одонтобластов только при посеве на поверхности ЧД. Однако на обоих биоматериалах СКПЗ формировали ВКМ с аналогичными значениями прочности на сжатие.

Сиалопротеины дентина (DSPP) были обнаружены в клетках, культивируемых на поверхности ЧД. DSPP — наиболее распространенные неколлагеновые кислые белки, присутствующие в дентине; они играют важную роль в процессе минерализации ткани и широко экспрессируются в дентине, а не в костной ткани. Состав DSPP сопоставим с составом остеопонтина (OPN) и костного сиалопротеина (BSP). Более того, DSPP участвуют в детерминации стволовых клеток пульпы зуба в одонтобластоподобные клетки, связывая их интегринов и в итоге способствуя миграции, прикреплению, детерминации и минерализации мезенхимальных клеток зуба. DSPP участвуют в фосфорилировании SMAD1/5/8 и в их ядерной транслокации посредством сигнальных путей ERK1/2 и p38. Комплекс SMAD1/5/8 связывается с элементами связывания SMAD (SBE). Несколько иммуногистохимических исследований со специфическими антителами к DSPP подтверждают локализацию DSPP в одонтоблестах, предентине и дентине вблизи отростков одонтобластов вдоль дентинных канальцев [58,59]. Более того, исследования *in vivo* показали, что они могут быть вовлечены в начальный процесс минерализации дентина, а не в созревание этой ткани [60].

Эпигенетические данные подтвердили наличие факторов, которые улучшают одонтогенную и остеогенную детерминацию клеток при посеве СКПЗ на поверхность ЧД. Как показано на рисунке 9, факторами остеогенного пути были WNT, микроРНК 26, β -катенин, TGF, щелочная фосфатаза и p38MAPK, а факторами одонтогенного пути — smad1, микро РНК 200, CREB и MSX [61]. Одним из важнейших факторов роста является VEGF: он стимулирует неоангиогенез и тем самым ускоряет формирование новой костной ткани [62]. Следует отметить, что повышение уровня VEGF наблюдалось только при посеве клеток на ЧД.

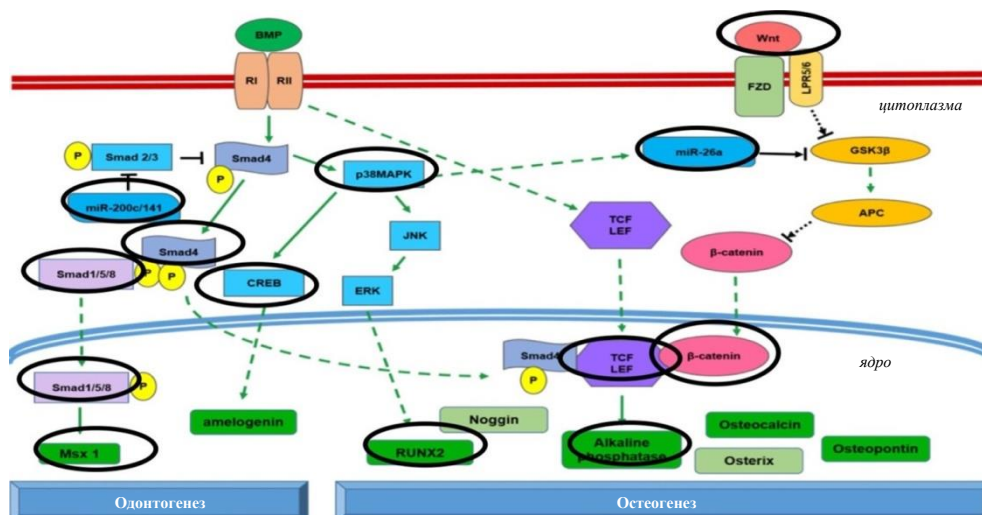


Рисунок 9. Сигнальные пути, обнаруженные в СКПЗ, культивируемых на поверхности дентина. При посеве СКПЗ на ЧД образовывался более прочный ВКМ, чем при посеве на ксеногенные остеопластические материалы. Эта более выраженная внешняя механоиндукция влияет на детерминацию стволовых клеток, стимулируя как остеогенный путь (посредством сигнального пути WNT с экспрессией микроРНК 26а), так и приобретение одонтогенного фенотипа (благодаря микроРНК 200 и SMAD1). По материалам Zhang и соавт. с изменениями [61].

4. Материалы и методы

4.1. Выделение стволовых клеток пульпы зуба

Пульпа зуба человека была извлечена из здоровых моляров, удаленных у взрослых в возрасте от 18 до 66 лет вследствие перикоронита или по ортодонтическим показаниям. Все участники предоставили письменное информированное согласие на использование пульпы удаленных зубов для научных исследований. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Тель-Авивского университета (кафедра биологии полости рта стоматологического факультета и кафедра биоинженерии инженерного факультета Тель-Авивского университета, Тель-Авив, Израиль). Согласно протоколу, описанному в ранее проведенном исследовании [35], после удаления пульпу погружали на 1 час при температуре 37 °C в фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина-стрептомицина, 500 мг/мл кларитромицина, 3 мг/мл коллагеназы I типа и 4 мг/мл диспазы. После ферментации раствор фильтровали через фильтры Falcon с размером ячеек 70 мкм (Becton and Dickinson, Франклин-Лейкс, штат Нью-Джерси,

США). Клетки, полученные из каждого образца пульпы, культивировали *in vitro* в виде монослоя до р1 в неспецифической среде для культивирования не гемопоэтических (НГ) стволовых клеток (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия).

4.2. Характеристика СКПЗ методом проточной цитометрии

Прикрепленные СКПЗ на третьем пассаже диссоциировали и ресуспендировали в буфере для окрашивания при проточной цитометрии (R&D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота, США) при конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Для изучения поверхностных маркеров использовали следующие флуоресцентные моноклональные мышиные антитела к белкам человека: CD29 APC (Thermo Fisher Scientific, Сан-Диего, штат Калифорния, США), CD73 APC (eBioscience™, Thermo Fisher Scientific), CD90 BV510 (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния, США), CD105 PE-Cyanine7 (eBioscience™), CD14 PE (eBioscience™) и CD45 Pacific Orange (Thermo Fisher Scientific). Клетки дважды промывали 2 мл буфера для окрашивания при проточной цитометрии и ресуспендировали в 500 мкл буфера для окрашивания при проточной цитометрии. Флуоресценцию оценивали методом проточной цитометрии на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher Scientific). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Attune NxT (Thermo Fisher Scientific).

4.3. Подготовка образцов с помощью продукта компании Kometa Bio®

Гранулы ЧД были приготовлены и обработаны с помощью устройства компании Kometa Bio® (Smart Dentin Grinder (SDG), Нью-Джерси, штат Нью-Йорк, США) в соответствии с инструкциями производителя следующим образом:

1. Удаляли коронки и все пломбы, зубной налет, дентин измененного цвета, кариозные ткани и периодонтальную связку, промывали зубы стерильным физиологическим раствором;
2. Фрагменты зуба измельчали с помощью SDG (Kometa Bio®) для получения и сбора ЧД размером от 300 до 1200 мкм и пористостью 2–14 мкм;
3. ЧД промывали в течение 10 мин в стерильном стеклянном контейнере с 0,5 М раствором NaOH с 20 % этанола, после чего промывали в течение 10 мин в стерильном физиологическом растворе. Эмаль не удаляли.

4.4. Депотеинизированный матрикс бычьей кости

Скаффолды на основе гидроксиапатита (ГА), изготовленные из депотеинизированного матрикса бычьей кости, поставлялись в гранулах размером 250–1000 мкм (Bio-Oss®, Geistlich Pharma Ag, Вольхузен, Швейцария). Данный биоматериал далее именуется матриксом бычьей кости (МБК).

4.5. Культура клеток

СКПЗ культивировали *in vitro* в виде монослоя в полной среде Игла в модификации Дульбекко (сDMEM) до этапа 1. В момент слияния клетки собирали методом обработки трипсином и высевали на образцы ЧД и МБК, предварительно закрепленные на дне планшетов с помощью 3 мл желатина (Sigma), при плотности 10^6 клеток/см². Клетки культивировали в течение 7 дней в сDMEM; в течение недели питательную среду меняли дважды.

4.6. Пролиферация клеток

Для оценки скорости пролиферации СКПЗ как на ЧД, так и на МБК были проведены тесты с метилтиазолилтетразолием (МТТ). В каждом образце удаляли питательную среду и инкубировали гранулы с клетками при температуре 37 °C в течение 3 ч в 1 мл раствора МТТ (0,5 мг/мл МТТ в ФСБ), затем МТТ экстрагировали 0,5 мл 10 % диметилсульфоксида в изопропанол и определяли количество образовавшегося синего формазана. Оптическую плотность (ОП) каждого образца регистрировали в двух повторностях при 570 нм в аликвотах по 200 мкл с использованием планшетного мультимодального ридера (Victor 3, Perkin Elmer, Милан, Италия). Образцы исследовали в четыре разных момента времени (через 3, 7, 14 и 21 день культивирования).

4.7. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Следуя инструкциям производителя, РНК извлекали из клеток, культивированных на ЧД и МБК в течение 21 дня, с использованием набора Total RNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek Corporation, Торолд, Онтарио, Канада). Общая РНК, полученная из образцов, была подвергнута обратной транскрипции с использованием набора SensiFAST™ cDNA Synthesis (Bioline GmbH, Констанц, Германия) в термодикле LifePro (BioerTechnology, Ханчжоу, Китай) с 10 мин отжига при 25 °C, 45 мин обратной транскрипции при 42 °C и 5 мин инактивации при 85 °C. Человеческие праймеры были выбраны заранее для каждого целевого гена с помощью программного обеспечения Primer 3 (Thermo-Fisher Scientific, Берлин, Германия). ПЦР-РВ проводили с выбранными праймерами в концентрации 400 нМ с использованием набора SensiFAST™ SYBR No-ROX (Bioline GmbH, Луккенвальде, Германия) на цикле Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Сидней, Австралия). Список использованных праймеров и связанных с ними последовательностей представлен в таблице 1. При анализе микроРНК авторы следовали инструкциям к набору Human miRNA Microarray Kit, V3 (Agilent Technologies) с 866 последовательностями для микроРНК человека. Для генов, связанных с внеклеточным матриксом и белками адгезии, использовали набор RT² Profiler PCR Array kit (Qiagen, Хильден, Германия). Анализ выполняли трижды на трех различных препаратах.

Таблица 1. Последовательности человеческих праймеров.

Обозначение гена	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')	Длина продукта (п.н.)
ALP	TCAGAGGGAAGGAGATAGAGAGTC	AGCCAGAAACCATATGTCAAGAGA	171
COL1A1	GAGCCAGCAGATCGAGA	ACCAGTCTCCATGTTGCAGA	178
DSPP	AGATCCGCACGCAGTAT GAG	AGGTCCGCAGGTCAAGGA	178
MSX	CAGGAGATCACAGAGTATGCCAA	AGATGCGGTGGCTAAAGGTC	179
OC	TGCATGTGTCTTAGTCTTAGTCACCGCTA	ACTTAGTGCTTACAGGAACCA	167
ON	TGCATGTGTCTTAGTCTTAGTCACC	GCTAACTTAGTGCTTACAGGAACCA	186
RUNX2	TCTTAGGCAGCTCTTTGGGA	TCCCTTGTCATGAAGCCTTGG	182
CTNNB1	TAATAAACAGCTCTAAGCCCA	ATCCTCTACATTTAGCCTAGA	176
CREB	CGTTAGGCGGCTCAATGGGA	TAACCTCTCCGGAAGCCTAAG	178
p38MAPK	GTTCCGGCTTGCTCTTTGCTA	TCCAATGACATCCGAGCCTAGA	181
RAC	AACTCATTCCTTTGCCTT	TCAATGATGTTCCCTCCAG	184
SMAD1	GGATAGAGGCTTTGGGACCT	TCCTCTTGAAGGGTCTTGGCA	178
SMAD4	TGCATTACGATCAAGGCTG	TATTGGATTGGAAGCTGCCCTTG	167
TGF	CCGGGCAGAATTTGA	TGGTCAATGTGAAGAA GG	185
WNT	GCTCTTCAAAGGTATTTG	TGGTCCAACCCGTCATC CT	185

Символы генов и соответствующие кодируемые белки перечислены ниже. ALP — щелочная фосфатаза; COL1A1 — коллаген I типа; CREB: белок, связывающий элемент ответа циклического АМФ; CTNNB1 — β -катенин; DSPP — предшественник сиалопротеина дентина; MSX — семейство генов гомеобокса мышечного сегмента; OC — остеокальцин; ON — остеоонектин; p38MAPK — митоген-активируемые протеинкиназы p38; RAC — Rac; RUNX2 — фактор транскрипции 2, связанный с карликовостью; SMAD1/4 — smad1/4; TGF — трансформирующий фактор роста; WNT — Wnt.

Условия термоденатурации были следующими: денатурация 2 мин при 95 °C, затем 40 циклов денатурации по 5 с при 95 °C, отжиг 10 с при 60 °C и элонгация 20 с при 72 °C. Анализ данных проводился по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Значения порогового цикла (C_t) (т. е. дробное число циклов, при котором количество амплифицированной мишени достигает заданного порога) целевых генов были нормализованы по конститутивному гену (рецептор трансферрина 1). Экспрессию генов сравнивали между контрольной группой (СКПЗ на пластиковом монослое) и тестовыми группами (СКПЗ, культивируемые на ЧД и МБК). Результаты представлены в виде кратности регуляции целевых генов в тестовых группах по сравнению с СКПЗ на монослое. Кратность регуляции указывает на повышенную (значения >2) или пониженную (значения <-2) экспрессию генов, тогда как значения между -2 и 2 указывают на дифференциально экспрессируемые гены.

4.8. Количественное определение внутриклеточной активности ЩФ

Активность внутриклеточной щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли с помощью колориметрического набора Alkaline Phosphatase Assay Kit (Abcam, Кембридж,

Соединенное Королевство). СКПЗ, культивированные на ЧД и МБК в течение 7, 14 и 21 дня, промывали ФСБ, гомогенизировали с буфером для анализа ЩФ, затем центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 3 минут для удаления нерастворимого материала. Калибровочный график был построен с использованием скорректированных значений оптической плотности стандартных растворов, и для каждого образца была определена концентрация pNP. Активность ЩФ рассчитывали следующим образом: активность ЩФ (ЕД/мл) = $(A/V)/T$, где A — количество pNP, образованного образцами (в мкмоль), V — объем образца, добавленного в аналитическую лунку (в мл), а T — время реакции (в мин).

4.9. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Для получения изображений с помощью СЭМ СКПЗ, культивированные на ЧД и МБК в течение 21 дня, фиксировали в 2,5 % глутаральдегиде и 0,1 М какодилатном буфере в течение 1 ч, затем постепенно дегидратировали в этаноле. СЭМ-анализ проводили с помощью СЭМ-микроскопа JSM JEOL 6490 (JEOL, Токио, Япония) в Центре анализа и обслуживания по сертификации (CEASC, Падуа, Падуанский университет, Италия).

4.10. Компрессионные свойства внеклеточного матрикса

Прочность на сжатие и модуль упругости на сжатие каждого остеопластического материала измеряли с помощью испытательной машины Hounsfield H10K/M527 (Хаунсфилд, штат Нью-Йорк, США) до и после 21 дня культивирования СКПЗ внутри гранул. Остеопластические материалы были достаточно однородными, поэтому ориентацию поверхностей на сжатие не регистрировали. Гранулы осторожно извлекали из лунок и помещали внутрь плоского кольца. На верхнюю и нижнюю поверхности каждого образца были помещены резиновые прокладки для обеспечения равномерного распределения давления.

Для подготовки образцов к испытанию на механическую прочность на сжатие гранулы помещали внутрь плоского кольца (диаметр 8 мм × высота 2 мм), затем кольцо осторожно снимали. Скорость траверсы устанавливали на уровне 1 мм/мин, а давление прикладывали до полного разрушения образцов. Для испытаний на сжатие использовали от семи до девяти идентичных образцов из каждой группы.

4.11. Анализ ИФА

Иммуноферментный анализ (ИФА) (SIGMA, Aldrich, Берлин, Германия) выполняли для выявления наличия следующих белков: коллагена I типа, витронектина, матриксных металлопротеиназ (MMP1, MMP9), CXCL 11, нескольких интерлейкинов (IL1, IL2, IL4, IL6, IL10), фактора роста фибробластов (FGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора некроза опухолей (TNF), инсулиноподобного фактора роста (IGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), DSPP, MSX, SMAD1, CREB, BMP2 и SMAD 1/5/8.

4.12. Статистический анализ

Для анализа данных проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Данные выражали в виде «среднее ± стандартное отклонение (SD)». Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

5. Выводы

Поскольку кость — это живая ткань, форма и функции которой зависят от состава и организации ее матрикса, а также от ее структурных особенностей, любое вмешательство в процессы, участвующие в восстановлении кости, может мешать ее регенерации. Костная ткань не способна к интерстициальному росту, поэтому масса костной ткани регулируется сложными процессами. Минерализованный матрикс костной ткани может изменяться только остеобластами и остеокластами, регулируемые остеоцитами, которые являются непосредственными регуляторами процессов формирования и резорбции кости [62]. Когда популяция костных клеток получает механический сигнал, он преобразуется в первый биологический сигнал. Затем должен произойти ряд вторичных биохимических сигнальных событий, чтобы сигнал распространился через клетки и к другим сенсорным/эффекторным клеткам. Исследования сигнальных путей, участвующих в распространении механического сигнала через костные клетки, выявили множество изменений, которые происходят в механически стимулированных остеоцитах и/или

остеообластах. Эти изменения могут влиять на экспрессию генов, белки и липиды (например, процессы фосфорилирования), могут вызывать деградацию белков, события внутриклеточной транслокации и высвобождение секретируемых факторов и даже могут изменять форму и размер клетки, среди прочих эффектов. Проблема, поставленная при анализе этих результатов исследований, состоит в том, чтобы определить, какие события необходимы для осуществления механотрансдукции, а какие события имеют мало функциональных последствий для этого процесса [63–65]. ЧД вызывает механоиндукцию, которая влияет на детерминацию стволовых клеток, стимулируя как остеогенный путь (посредством сигнального пути WNT с экспрессией микро РНК 26-27-32-586-885 и SMAD4), так и формирование одонтогенного фенотипа (благодаря микроРНК 200, микроРНК 218, CREB и SMAD1). Более того, при анализе секреции белков на ЧД выявлено больше факторов роста, связанных с ангиогенезом, таких как VEGF, чем на МБК. В любом случае, экспрессия *bmp2* и *smad5/8* подтверждает данные о том, что 3D-скаффолды поддерживают остеогенную детерминацию.

Этот белок, присутствие которого может быть обусловлено либо активностью СКПЗ, либо содержанием гранул, может обеспечить более надежную поддержку во время регенерации костей, поскольку формирование новых сосудов имеет решающее значение для обеспечения правильного ремоделирования тканей. Более того, высокие уровни ЩФ, обнаруженные только в присутствии ЧД, можно объяснить тем, что они происходят из дентинной матрицы. С этой точки зрения гранулы дентина можно рассматривать как биологический резервуар необходимых минеральных ионов, факторов роста и молекул ВКМ, обеспечивающих благоприятную биоиндуктивную микросреду и тем самым влияющих на выработку внеклеточного секрета [66–68]. Клетки секретируют несколько типов внеклеточных везикул, которые могут содержать сложный набор белков, липидов и нуклеиновых кислот. Их содержание неоднородно и зависит от физиологических условий клетки. Более того, изменения окружающей среды влияют на содержание экзосом в клетках. Таким образом, внеклеточные везикулы представляют собой ключевую концепцию в опосредовании изменений в поведении клеток путем воздействия на клетки паракринным или эндокринным образом, что делает их полезными с терапевтической точки зрения. Экзосомы играют важную роль в основном во время регенерации тканей, что представляет важное преимущество бесклеточной терапии [68–72]. Более того, в отличие от других наночастиц, экзосомы быстро выводятся и не характеризуются нежелательным накоплением в печени, что объясняет их благоприятный профиль токсичности; кроме того, они не экспрессируют HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) класса II, что делает их гипоиммуногенными. Благодаря своей высокой биосовместимости экзосомы привлекли широкое внимание медицинского сообщества. Наряду с методами тканевой инженерии стратегии, основанные на использовании экзосом, являются перспективным направлением для разработки усовершенствованных клинических методов лечения. Экзосомы могут быть использованы в регенеративной терапии в качестве биомиметических инструментов для индукции миграции, пролиферации и специфической дифференцировки стволовых клеток в одонтобласты. На основании этих данных можно предположить, что частицы на основе дентина могут оказывать положительное влияние на дифференцировку наивных клеток, индуцируя выработку экзосом, которые непосредственно запускают процесс регенерации с образованием одонтобластов [73–85].

В заключение следует отметить, что ВКМ СКПЗ, культивируемых на ЧД, обеспечивает очень точную связь между клеткой и матриксом и создает путь механической трансдукции, в основном за счет эпигенетических изменений, который в частности ориентирован на специфические механочувствительные микроРНК.

Вклад авторов: G.B. — написание первоначальной версии рукописи, написание обзора и редактирование рукописи; F.Z. — обработка данных; L.S. — разработка концепции, поиск ресурсов, написание обзора и редактирование рукописи; S.S. — валидация, поиск ресурсов, написание обзора и редактирование рукописи; B.Z. — разработка концепции, валидация, написание первоначальной версии рукописи, написание обзора и редактирование рукописи. G.S. — исследование. Все авторы прочитали и утвердили опубликованную версию рукописи.

Финансирование: данное исследование финансировалось по программе COST Action CA16122.

Конфликты интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Suzuki, O.; Shiwaku, Y.; Hamai, R. Octacalcium phosphate bone substitute materials: Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials. *Dent. Mater. J.* **2020**, *39*, 187–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Moussa, N.T.; Dym, H. Maxillofacial Bone Grafting Materials. *Dent. Clin. North Am.* **2020**, *64*, 473–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Brunello, G.; Panda, S.; Schiavon, L.; Sivoilella, S.; Biasetto, L.; Del Fabbro, M. The Impact of Bioceramic Scaffolds on Bone Regeneration in Preclinical In Vivo Studies: A Systematic Review. *Materials* **2020**, *13*, 1500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Yahav, A.; Kurtzman, G.M.; Katzap, M.; Dudek, D.; Baranes, D. Bone Regeneration: Properties and clinical applications of biphasic calcium sulfate. *Dent. Clin. N. Am.* **2020**, *64*, 453–472. [\[CrossRef\]](#)
5. Guazzo, R.; Gardin, C.; Bellin, G.; Sbricoli, L.; Ferroni, L.; Ludovichetti, F.S.; Piattelli, A.; Antoniac, I.; Bressan, E.; Zavan, B. Graphene-Based Nanomaterials for Tissue Engineering in the Dental Field. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Ramanauskaitė, A.; Sahin, D.; Sader, R.; Becker, J.; Schwarz, F. Efficacy of autogenous teeth for the reconstruction of alveolar ridge deficiencies: A systematic review. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *23*, 4263–4287. [\[CrossRef\]](#)
7. Kim, Y.-K.; Lee, J.; Um, I.-W.; Kim, K.-W.; Murata, M.; Akazawa, T.; Mitsugi, M. Tooth-derived bone graft material. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **2013**, *39*, 103–111. [\[CrossRef\]](#)
8. Gual-Vaques, P.; Polis-Yanes, C.; Estrugo-Devesa, A.; Ayuso-Montero, R.; Mari-Roig, A.; Lopez-Lopez, J. Autogenous teeth used for bone grafting: A systematic review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2017**, *23*, e112–e119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Khanijou, M.; Seriwatanachai, D.; Boonsirirath, K.; Suphangul, S.; Pairuchvej, V.; Srisatjaluk, R.L.; Wongsirichat, N. Bone graft material derived from extracted tooth: A review literature. *J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.* **2018**, *31*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
10. Becker, K.; Drescher, D.; Hönscheid, R.; Golubovic, V.; Mihatovic, I.; Schwarz, F. Biomechanical, micro-computed tomographic and immunohistochemical analysis of early osseous integration at titanium implants placed following lateral ridge augmentation using extracted tooth roots. *Clin. Oral Implant. Res.* **2017**, *28*, 334–340. [\[CrossRef\]](#)
11. Parvini, P.; Schwarz, F.; Dmd, M.K.H.; Rauch, N.; Nienkemper, M.; Becker, K. Microstructural volumetric analysis of vertical alveolar ridge augmentation using autogenous tooth roots. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2020**, *22*, 647–653. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Becker, K.; Jandik, K.; Stauber, M.; Mihatovic, I.; Drescher, D.; Schwarz, F. Microstructural volumetric analysis of lateral ridge augmentation using differently conditioned tooth roots. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *23*, 3063–3071. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Pohl, S.; Binderman, I.; Tomac, J. Maintenance of Alveolar Ridge Dimensions Utilizing an Extracted Tooth Dentin Particulate Autograft and Platelet-Rich fibrin: A Retrospective Radiographic Cone-Beam Computed Tomography Study. *Materials* **2020**, *13*, 1083. [\[CrossRef\]](#)
14. Kuperschlag, A.; Keršyć, G.; Kurtzman, G.M.; Horowitz, R.A. Autogenous Dentin Grafting of Osseous Defects Distal to Mandibular Second Molars After Extraction of Impacted Third Molars. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **2020**, *41*, 76. [\[PubMed\]](#)
15. Andrade, J.C.; Camino, M.; Nally, M.; Quirynen, B.; Martínez, N. Pinto, Combining autologous particulate dentin, L-PRF, and fibrinogen to create a matrix for predictable ridge preservation: A pilot clinical study. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 1151–1160. [\[CrossRef\]](#)
16. Cardaropoli, D.; Nevins, M.; Schupbach, P. New Bone Formation Using an Extracted Tooth as a Biomaterial: A Case Report with Histologic Evidence. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2019**, *39*, 157–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Del Canto-Diaz, A.; De Elío-Oliveros, J.; Alobera-Gracia, M.; Del Canto-Pingarron, M.; Martínez-Gonzalez, J. Use of autologous tooth-derived graft material in the post-extraction dental socket. *Pilot Study Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2018**, *24*, e53–e60. [\[CrossRef\]](#)
18. Brunello, G.; Zanotti, F.; Trentini, M.; Zanolla, I.; Pishavar, E.; Favero, V.; Favero, R.; Favero, L.; Bressan, E.; Bonora, M.; et al. Exosomes Derived from Dental Pulp Stem Cells Show Different Angiogenic and Osteogenic Properties in Relation to the Age of the Donor. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 908. [\[CrossRef\]](#)
19. Memarian, P.; Pishavar, E.; Zanotti, F.; Trentini, M.; Camponogara, F.; Soliani, E.; Gargiulo, P.; Isola, M.; Zavan, B. Active Materials for 3D Printing in Small Animals: Current Modalities and Future Directions for Orthopedic Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1045. [\[CrossRef\]](#)
20. Valdec, S.; Pasic, P.; Soltermann, A.; Thoma, D.; Stadlinger, B.; Rücker, M. Alveolar ridge preservation with autologous particulated dentin—A case series. *Int. J. Implant Dent.* **2017**, *3*, 12. [\[CrossRef\]](#)
21. Binderman, G.I.; Hallel, C.; Nardy, A.; Yaffe, L.; Sapoznikov, A. A novel procedure to process extracted teeth for immediate grafting of autogenous dentin. *J. Interdiscipl. Med. Dent. Sci.* **2014**, *2*, 154. [\[CrossRef\]](#)
22. Tran, H.L.B.; Doan, V.N. Human dental pulp stem cells cultured onto dentin derived scaffold can regenerate dentin-like tissue in vivo. *Cell Tissue Bank* **2015**, *16*, 559–568. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Wang, F.; Xie, C.; Ren, N.; Bai, S.; Zhao, Y. Human Freeze-dried Dentin Matrix as a Biologically Active Scaffold for Tooth Tissue Engineering. *J. Endod.* **2019**, *45*, 1321–1331. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Schwartz-Dabney, C.; Dechow, P. Variations in cortical material properties throughout the human dentate mandible. *Am. J. Phys. Anthr.* **2003**, *120*, 252–277. [\[CrossRef\]](#)
25. Rieger, M.; Fareed, K.; Adams, W.; Tanquist, R. Bone stress distribution for three endosseous implants. *J. Prosthet. Dent.* **1989**, *61*, 223–228. [\[CrossRef\]](#)
26. Stanford, C.M. Biomechanical and functional behavior of implants. *Adv. Dent. Res.* **1999**, *13*, 88–92. [\[CrossRef\]](#)
27. Sperling, I.; Itzkowitz, D.; Kaufman, A.Y.; Binderman, I. A new treatment of heterotransplanted teeth to prevent progression of root resorption. *Dent. Traumatol.* **1986**, *2*, 117–120. [\[CrossRef\]](#)
28. Andersson, L.; Bodin, I.; Sorensen, S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. *Dent. Traumatol.* **1989**, *5*, 38–47. [\[CrossRef\]](#)
29. Joshi, C.P.; Dani, N.H.; Khedkar, S.U. Alveolar ridge preservation using autogenous tooth graft versus beta-tricalcium phosphate alloplast: A randomized, controlled, prospective, clinical pilot study. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2016**, *20*, 429–434. [\[CrossRef\]](#)
30. Pohl, V.; Schuh, C.; Fischer, M.B.; Haas, R. A New Method Using Autogenous Impacted Third Molars for Sinus Augmentation to Enhance Implant Treatment: Case Series with Preliminary Results of an Open, Prospective Longitudinal Study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2016**, *31*, 622–630. [\[CrossRef\]](#)
31. Minamizato, T.; Koga, I.; Takashi, Y.; Nakatani, M.; Umebayashi, Y.; Sumita, T.; Ikeda, I. Clinical application of autogenous partially demineralized dentin matrix prepared immediately after extraction for alveolar bone regeneration in implant dentistry: A pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2018**, *47*, 125–132. [\[CrossRef\]](#)
32. Kim, Y.-K. Bone graft material using teeth. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *38*, 134–138. [\[CrossRef\]](#)
33. Park, S.-M.; Um, I.-W.; Kim, Y.-K.; Kim, K.-W. Clinical application of auto-tooth bone graft material. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *38*, 2–8. [\[CrossRef\]](#)
34. Ravindran, S.; George, A. Dentin Matrix Proteins in Bone Tissue Engineering. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *881*, 129–142. [\[CrossRef\]](#)

35. Ghensi, P.; Bressan, E.; Gardin, C.; Ferroni, L.; Ruffato, L.; Caberlotto, M.; Soldini, C.; Zavan, B. Osteo Growth Induction titanium surface treatment reduces ROS production of mesenchymal stem cells increasing their osteogenic commitment. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *74*, 389–398. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Hadden, W.J.; Choi, Y.S. The extracellular microscale governs mesenchymal stem cell fate. *J. Biol. Eng.* **2016**, *10*, 16. [\[CrossRef\]](#)
37. Saha, S.; Ji, L.; de Pablo, J.J.; Palecek, S.P. Inhibition of human embryonic stem cell differentiation by mechanical strain. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *206*, 126–137. [\[CrossRef\]](#)
38. Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126*, 677–689. [\[CrossRef\]](#)
39. Fu, J.; Wang, Y.-K.; Yang, M.T.; Desai, R.; Yu, X.; Liu, Z.; Chen, C. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 733–736. [\[CrossRef\]](#)
40. Becquart, P.; Cruel, M.; Hoc, T.; Sudre, L.; Pernelle, K.; Bizios, R.; Logeart-Avramoglou, D.; Petite, H.; Bensidhoum, M. Human mesenchymal stem cell responses to hydrostatic pressure and shear stress. *Eur. Cells Mater.* **2016**, *31*, 160–173. [\[CrossRef\]](#)
41. Sharp, L.A.; Lee, Y.W.; Goldstein, A.S. Effect of Low-Frequency Pulsatile Flow on Expression of Osteoblastic Genes by Bone Marrow Stromal Cells. *Ann. Biomed. Eng.* **2009**, *37*, 445–453. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Zavan, B.; Giorgi, C.; Bagnara, G.P.; Vindigni, V.; Abatangelo, G.; Cortivo, R. Osteogenic and chondrogenic differentiation: Comparison of human and rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured into polymeric scaffolds. *Eur. J. Histochem.* **2007**, *51* (Suppl. 1), 1–8. [\[PubMed\]](#)
43. Gardin, C.; Bressan, E.; Ferroni, L.; Nalesso, E.; Vindigni, V.; Stellini, E.; Pinton, P.; Sivoletta, S.; Zavan, B. In Vitro Concurrent Endothelial and Osteogenic Commitment of Adipose-Derived Stem Cells and Their Genomical Analyses Through Comparative Genomic Hybridization Array: Novel Strategies to Increase the Successful Engraftment of Tissue-Engineered Bone Grafts. *Stem. Cells Dev.* **2012**, *21*, 767–777. [\[CrossRef\]](#)
44. Gardin, C.; Ferroni, L.; Bressan, E.; Guirado, J.L.C.; Degidi, M.; Piattelli, A.; Zavan, B. Adult Stem Cells Properties in Terms of Commitment, Aging and Biological Safety of Grit-Blasted and Acid-Etched Ti Dental Implants Surfaces. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **2014**, *3*, 225–236. [\[PubMed\]](#)
45. Tatullo, M.; Marrelli, M.; Falisi, G.; Rastelli, C.; Palmieri, F.; Gargari, M.; Zavan, B.; Paduano, F.; Benagiano, V. Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior: A topical review. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2015**, *29*, 3–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Steinberg, M.S. Mechanism of Tissue Reconstruction by Dissociated Cells, II: Time-Course of Events. *Science* **1962**, *137*, 762–763. [\[CrossRef\]](#)
47. Lo, C.-M.; Wang, H.-B.; Dembo, M.; Wang, Y.-L. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 144–152. [\[CrossRef\]](#)
48. Choi, Y.S.; Vincent, L.G.; Lee, A.R.; Dobke, M.K.; Engler, A.J. Mechanical derivation of functional myotubes from adipose-derived stem cells. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2482–2491. [\[CrossRef\]](#)
49. Engler, A.; Griffin, M.A.; Sen, S.; Bonnemann, C.G.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 877–887. [\[CrossRef\]](#)
50. Yang, M.T.; Fu, J.; Wang, Y.-K.; Desai, R.A.; Chen, C.S. Assaying stem cell mechanobiology on microfabricated elastomeric substrates with geometrically modulated rigidity. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 187–213. [\[CrossRef\]](#)
51. Di Luca, A.; Ostrowska, B.; Lorenzo-Moldero, I.; Lepedda, A.J.; Swieszkowski, W.; Van Blitterswijk, C.; Moroni, L. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22898. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Vaughan, T.J.; Voisin, M.; Niebur, G.; McNamara, L.M. Multiscale Modeling of Trabecular Bone Marrow: Understanding the Micromechanical Environment of Mesenchymal Stem Cells During Osteoporosis. *J. Biomech. Eng.* **2015**, *137*, 011003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Hart, N.H.; Nimphius, S.; Rantalainen, T.; Ireland, A.; Siafarikas, A.; Newton, R.U. Mechanical basis of bone strength: In-fluence of bone material, bone structure and muscle action. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2017**, *17*, 114–139. [\[PubMed\]](#)
54. Foessl, I.; Kotzbeck, P.; Obermayer-Pietsch, B. miRNAs as novel biomarkers for bone related diseases. *J. Lab. Precis. Med.* **2019**, *4*, 2. [\[CrossRef\]](#)
55. Chen, Z.; Zhang, Y.; Liang, C.; Chen, L.; Zhang, G.; Qian, A. Mechanosensitive miRNAs and Bone Formation. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1684. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Yuan, Y.; Zhang, L.; Tong, X.; Zhang, M.; Zhao, Y.; Guo, J.; Lei, L.; Chen, X.; Tickner, J.; Xu, J.; et al. Mechanical Stress Regulates Bone Metabolism Through MicroRNAs. *J. Cell. Physiol.* **2016**, *232*, 1239–1245. [\[CrossRef\]](#)
57. Baba, O.; Qin, C.; Brunn, J.C.; Wygant, J.N.; McIntyre, B.W.; Butler, W.T. Colocalization of dentin matrix protein 1 and dentin sialoprotein at late stages of rat molar development. *Matrix Biol.* **2004**, *23*, 371–379. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Qin, C.; Baba, O.; Brunn, J.C.; McKee, M.D.; Bonewald, L.; Butler, W.T. Dentin matrix protein 1 (DMP1) and dentin sialoprotein (DSPP) share unique properties including tissue localization, proteolytic processing, and high molecular weight forms. In Proceedings of the 8th ICCBMT, Banff, AB, Canada, 17–22 October 2004; Sodek, J., Landis, W., Eds.; University of Toronto Press: Toronto, ON, Canada; Banff, AB, Canada, 2005; pp. 74–177.
59. Suzuki, S.; Sreenath, T.; Haruyama, N.; Honeycutt, C.; Terse, A.; Cho, A.; Kohler, T.; Müller, R.; Goldberg, M.; Kulkarni, A.B. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* **2009**, *28*, 221–229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Zhang, F.; Song, J.; Zhang, H.; Huang, E.; Song, D.; Tollemar, V.; Wang, J.; Wang, J.; Mohammed, M.; Wei, Q.; et al. Wnt and BMP signaling crosstalk in regulating dental stem cells: Implications in dental tissue engineering. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 263–276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Hu, K.; Olsen, B.R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* **2016**, *91*, 30–38. [\[CrossRef\]](#)
62. Florencio-Silva, R.; da Silva Sasso, G.R.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 421746. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Allen, M.R.; Burr, D.B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: So many hypotheses, so few data. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2009**, *67* (Suppl. 5), 61–70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

64. Grawish, M.E.; Grawish, L.M.; Grawish, H.M.; Grawish, M.M.; Holiel, A.A.; Sultan, N.; El-Negoly, S.A. Demineralized Dentin Matrix for Dental and Alveolar Bone Tissues Regeneration: An Innovative Scope Review. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2022**, *19*, 687–701. [CrossRef] [PubMed]
65. Kabir, A.; Murata, M.; Shakya, M.; Yamada, K.; Akazawa, T. Bio-Absorption of Human Dentin-Derived Biomaterial in Sheep Critical-Size Iliac Defects. *Materials* **2021**, *14*, 223. [CrossRef]
66. El Halaby, H.M.; Abu-Seida, A.M.; Fawzy, M.I.; Farid, M.H.; Bastawy, H.A. Evaluation of the regenerative potential of dentin conditioning and naturally derived scaffold for necrotic immature permanent teeth in a dog model. *Int. J. Exp. Pathol.* **2020**, *101*, 264–276. [CrossRef]
67. Imhof, T.; Korkmaz, Y.; Koch, M.; Sengle, G. Schiavinato A EMILIN proteins are novel extracellular constituents of the den-tin-pulp complex. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15320. [CrossRef] [PubMed]
68. Athirasala, A.; Tahayeri, A.; Thrivikraman, G.; França, C.M.; Monteiro, N.; Tran, V.; Ferracane, J.; Bertassoni, L.E. A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry. *Biofabrication* **2018**, *10*, 024101. [CrossRef]
69. Marshall, G.W., Jr.; Wu-Magidi, I.C.; Watanabe, L.G.; Inai, N.; Balooch, M.; Kinney, J.H.; Marshall, S.J. Effect of citric acid concentration on dentin demineralization, dehydration, and rehydration: Atomic force microscopy study. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 500–507. [CrossRef]
70. Linde, A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect. Tissue Res.* **1995**, *33*, 163–170. [CrossRef]
71. Nakashima, M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod. Dent. Traumatol.* **1989**, *5*, 279–286. [CrossRef]
72. Hussain, A.; Tebyaniyan, H.; Khayatan, D. The Role of Epigenetic in Dental and Oral Regenerative Medicine by Different Types of Dental Stem Cells: A Comprehensive Overview. *Stem Cells Int.* **2022**, *2022*, 5304860. [CrossRef] [PubMed]
73. Shirazi, S.; Huang, C.C.; Kang, M.; Lu, Y.; Ravindran, S.; Cooper, L.F. The importance of cellular and exosomal miRNAs in mesenchymal stem cell osteoblastic differentiation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5953. [CrossRef] [PubMed]
74. Kang, M.; Huang, C.-C.; Gajendrareddy, P.; Lu, Y.; Shirazi, S.; Ravindran, S.; Cooper, L.F. Extracellular Vesicles From TNF α Preconditioned MSCs: Effects on Immunomodulation and Bone Regeneration. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 878194. [CrossRef] [PubMed]
75. Huang, C.; Miya, K.M.; Ravindran, S. 3D Encapsulation and tethering of functionally engineered extracellular vesicles to hydrogels. *Acta Biomater.* **2021**, *126*, 199–210. [CrossRef] [PubMed]
76. Controversial Topics in Orthodontics: Can We Reach Consensus? Shroff, Bhavna. 2021. Available online: <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/166464> (accessed on 2 August 2022).
77. Kang, M.; Thalji, G.; Huang, C.-C.; Shirazi, S.; Lu, Y.; Ravindran, S.; Cooper, L.F. Macrophage Control of Incipient Bone Formation in Diabetic Mice. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 596622. [CrossRef]
78. Kang, M.; Huang, C.-C.; Lu, Y.; Shirazi, S.; Gajendrareddy, P.; Ravindran, S.; Cooper, L.F. Bone regeneration is mediated by macrophage extracellular vesicles. *Bone* **2020**, *141*, 115627. [CrossRef]
79. Huang, C.; Miya, K.M.; Ravindran, S. Functionally engineered extracellular vesicles improve bone regeneration. *Acta Biomater.* **2020**, *109*, 182–194. [CrossRef]
80. Atsawasuwan, P.; Shirazi, S. Advances in Orthodontic Tooth Movement: Gene Therapy and Molecular Biology Aspect. In *Current Approaches in Orthodontics*; IntechOpen: London, UK, 2019. [CrossRef]
81. Ferroni, L.; Gardin, C.; D'Amora, U.; Calzà, L.; Ronca, A.; Tremoli, E.; Ambrosio, L.; Zavan, B. Exosomes of mesenchymal stem cells delivered from methacrylated hyaluronic acid patch improve the regenerative properties of endothelial and dermal cells. *Biomater. Adv.* **2022**, *139*, 213000. [CrossRef]
82. Trentini, M.; Zanotti, F.; Tiengo, E.; Camponogara, F.; Degasperi, M.; Licastro, D.; Lovatti, L.; Zavan, B. An Apple a Day Keeps the Doctor Away: Potential Role of miRNA 146 on Macrophages Treated with Exosomes Derived from Apples. *Biomedicines* **2022**, *10*, 415. [CrossRef]
83. Gardin, C.; Ferroni, L.; Erdog˘ an, Y.K.; Zanotti, F.; De Francesco, F.; Trentini, M.; Brunello, G.; Ercan, B.; Zavan, B. Nanostructured Modifications of Titanium Surfaces Improve Vascular Regenerative Properties of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells: Preliminary In Vitro Results. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 3452. [CrossRef] [PubMed]
84. Chachques, J.C.; Gardin, C.; Lila, N.; Ferroni, L.; Migonney, V.; Falentin-Daudre, C.; Zanotti, F.; Trentini, M.; Brunello, G.; Rocca, T.; et al. Elastomeric Cardiowrap Scaffolds Functionalized with Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Induce a Positive Modulation in the Inflammatory and Wound Healing Response of Mesenchymal Stem Cell and Macro-phage. *Biomedicines* **2021**, *9*, 824. [CrossRef] [PubMed]
85. Tatullo, M.; Marrelli, B.; Palmieri, F.; Amantea, M.; Nuzzolese, M.; Valletta, R.; Zavan, B.; Vito, D. Promising Scaffold-Free Approaches in Translational Dentistry. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3001. [CrossRef] [PubMed]