



Новая процедура обработки удаленных зубов для немедленной имплантации в постэкстракционные лунки. Экспериментальное исследование на американских фоксхаундах☆

José Luis Calvo-Guirado^{a,b,*}, Pilar Cegarra del Pino^c, Lari Sapoznikov^d,
Rafael Arcesio Delgado Ruiz^{e,f}, Manuel Fernández-Domínguez^{g,h},
Sérgio Alexandre Gehrke^{i,j,k}

^a Кафедра челюстно-лицевой хирургии и имплантологии полости рта, Католический университет Сан-Антонио-де-Мурсия, Мурсия, Испания

^b Кафедра международных стоматологических исследований, факультет медицинских наук, Католический университет Сан-Антонио-де-Мурсия, Мурсия, Испания

^c Факультет медицинских наук, Католический университет Сан-Антонио-де-Мурсия, Мурсия, Испания

^d Частная практика, Тель-Авив, Израиль

^e Кафедра протезирования и цифровых технологий, Университет Стоуни-Брук, Стоуни-Брук, США

^f Клиника фиксированного и съемного протезирования, III курс, стоматологический факультет, Университет Стоуни-Брук, Стоуни-Брук, США

^g Отделение хирургии полости рта и имплантологии, Университет Сан-Пабло (CEU), Мадрид, Испания

^h Стоматологические исследования в докторантуре по трансляционной медицине, Университет Сан-Пабло (CEU), Мадрид, Испания

ⁱ Кафедра биотехнологии, Католический университет Мурсии, Мурсия, Испания

^j Католический университет Сан-Антонио-де-Мурсия, Мурсия, Испания

^k Католический университет Уругвая, Монтевидео, Уругвай

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ

Хронология статьи:

Получено: 18 июля 2017 г.

Получено в доработанном виде: 22 октября 2017 г.

Принято в печать: 20 декабря 2017 г.

Ключевые слова:

Устройство для измельчения и сортировки дентина

Костный гранулированный материал на основе аутогенного дентина

Сохранение объема лунки

АННОТАЦИЯ

Цели: Исследовать использование частиц свежее удаленных зубов для заживления постэкстракционных лунок у собак, сравнивая формирование новой костной ткани в экспериментальных и контрольных участках.

Материалы и методы: премоляры P2, P3, P4 и первые нижнечелюстные моляры были атравматически извлечены с обеих сторон у шести американских фоксхаундов. Сразу после этого зубы были измельчены с помощью Smart Dentin Grinder. Частицы дентина просеивали для получения размера зерна 300–1200 мкм и погружали в спиртовое очищающее средство для растворения органических остатков и бактерий с последующей промывкой в стерильном солевом буферном растворе.

Животных случайным образом разделяли на две группы: лунки группы «А» (контрольные) оставляли для заживления без помещения остеопластического материала; лунки группы «В» (экспериментальные) заполняли костным гранулированным материалом на основе аутогенного дентина. Скорость заживления тканей и объем новообразованной кости оценивали с помощью гистологического и гистоморфометрического анализов через 60 и 90 дней после трансплантации. Тип образовавшейся кости был классифицирован как грубоволокнистая (незрелая) или пластинчатая (зрелая) костная ткань.

Результаты: в группе В (экспериментальная) объем новообразованной костной ткани через 60 и 90 дней был существенно выше, чем в группе А (контрольная) ($p < 0,05$). В группе с трансплантацией дентина (25,7%) доля незрелой костной ткани была ниже, чем в контрольной группе (5,9%). Аналогичные различия также наблюдались через 90 дней после трансплантации.

Выводы: костный гранулированный материал на основе аутогенного дентина, трансплантированные сразу после экстракции, представляют собой перспективный биоматериал для консервации лунок, сохранения как щечной, так и язычной пластинки, формирования большого объема новой незрелой костной ткани через 60 дней и небольшого количества пластинчатой кости после 90 дней заживления.

© 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

☆ Эта статья входит в специальный выпуск Dentistry 2017.

* Адрес для переписки: Faculty of Health Sciences, Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos N. 135 Guadalupe, 30107 Murcia, Spain.
Электронная почта: jcalvo@ucam.edu (J.L. Calvo-Guirado).

<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.12.010>

0940-9602/© 2018 Elsevier GmbH. Все права защищены.

1. Введение

В челюстно-лицевой, пародонтальной и дентальной имплантационной хирургии используются различные материалы, представленные на рынке. В частности, для стабилизации свертываемости крови, увеличения объема альвеолярной кости и восстановления ее первоначальной структуры, функции и внешнего вида применяются остеопластические материалы. В качестве альтернатив аутогенным остеопластическим материалам разработан широкий спектр биоматериалов, обладающих хорошими остеоиндуктивными свойствами, но сопряженных с определенным риском вирусной инфекции; синтетические материалы обладают остеокондуктивным эффектом и могут производиться в неограниченных объемах (Kim, 2012; Kim et al., 2001a,b,c). Аллотрансплантаты, ксенотрансплантаты и синтетические материалы в течение долгого времени применяются в качестве заменителей костной ткани при дефектах различного размера, была подтверждена их полезность и эффективность по данному показанию (Pérez-Sánchez et al., 2010). Гидроксиапатит химически близок к биологическим апатитовым кристаллам и считается биоактивной формой кальций-фосфатной керамики (Gauthier et al., 2004; Maté-Sánchez de Val et al., 2012; Maté-Sánchez de Val et al., 2014). Различия в физико-химических свойствах остеопластических материалов влияют на скорость деградации, в результате чего депротенизированные костные частицы могут резорбироваться достаточно медленно, чтобы обеспечить время, необходимое для формирования зрелой кости (Ramírez Fernández et al., 2017a,b,c). Остеопластические материалы могут быть получены из четырех источников, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. Синтетические остеопластические материалы относительно недороги и не несут риска передачи инфекций, но обладают низкой остеоиндуктивностью и ограничено способствуют раннему остеогенезу, из-за чего их применение сводится к ситуациям, где требуется длительное формирование незрелой и пластинчатой кости. Ксенотрансплантаты получают из тканей животных (например, свиней, коров или лошадей). Они медленно резорбируются и являются хорошей матрицей для костной регенерации, но плохо интегрируются с вновь образованной костью. Аллотрансплантаты получают из человеческой кости, как правило, длинных трубчатых костей трупного донора. Они резорбируются слишком быстро и не обеспечивают достаточной поддержки для длительного костного ремоделирования, но при этом хорошо интегрируются с новой костью. Аутоотрансплантаты, получаемые от самого пациента, считаются «золотым стандартом» в костной пластике. Они обладают биологически активной, регулирующей клеточное поведение матрицей, не вызывают иммунного ответа и не являются патогенными, однако требуют взятия костного материала с донорского участка, что сопряжено с возможными осложнениями (Kim et al., 2010).

Удаление зубов — одна из самых распространенных процедур в стоматологии. Извлеченные зубы, как правило, утилизируются как медицинские отходы (Horowitz et al., 2012). Однако удаленные зубы могут быть переработаны в эффективный остеопластический материал (Kim et al., 1993; Kim et al., 1994; Kim et al., 1996a; Kim et al., 1996b; Kim et al., 1997; Kim, 1998; Kim et al., 2001a,b,c; Kim et al., 2004a,b). Пересадка зубов давно применяется в стоматологии, а анкилоз зуба является хорошо изученным феноменом. В последние годы несколько исследовательских групп изучили возможности применения удаленных зубов.

Аутогенный остеопластический материал на основе зубов (AutoBT, Korea Tooth Bank Co., Сеул, Корея), представляющий собой человеческий деминерализованный матрикс дентина, полученный из удаленных человеческих зубов, был впервые разработан в 2008 году; его остеоиндуктивные, остеокондуктивные и ремоделирующие свойства при применении в дентальной имплантологии тщательно изучены.

Химический состав зубов — особенно дентина — и костей во многом схож. Цемент зуба на 45–50% состоит из неорганических веществ, на 50–55% — из органических веществ и воды. Альвеолярная кость содержит 65% неорганических и 35% органических веществ (Kim et al., 2010). Кость и дентин по массе примерно на 70% состоят из гидроксиапатита, на 20% — из коллагена и на 10% — из жидкости (Bhaskar, 1980; Murata et al., 2000; Murata et al., 2002; Akazawa et al., 2006; Murata et al., 2007; Min, 2007; Nanci, 2008). Частицы дентина обладают средней твердостью и легко обрабатываются, что делает их перспективными для применения в качестве остеопластического материала, особенно с учетом наличия в свежем дентинном матриксе факторов роста и костных морфогенетических белков (BMP).

Как деминерализованный дентинный матрикс (DDM), так и деминерализованный костный матрикс (DBM) преимущественно

состоят из волокон коллагена I типа (95%), остальная часть приходится на неколлагеновые белки (NCP), включая малые количества факторов роста. Таким образом, и DDM, и DBM можно определить как кислотоустойчивый коллаген, связанный с BMP, включая члены суперсемейства трансформирующего фактора роста β (TGF- β), которые усиливают образование костной ткани (Nanci, 2008). Ксенотрансплантаты на основе дентина могут инкорпорироваться в кость, не вызывая воспалительной реакции, при этом они постепенно резорбируются и замещаются новой костью (Andersson, 2010; Nakashima, 2005; Hassan et al., 2003).

В настоящей работе описана клиническая процедура, в которой свежее удаленные зубы перерабатывают в не содержащие бактерий частицы аутогенного минерализованного дентина, пригодные для немедленного заполнения лунок. Для измельчения удаленных зубов использовалось устройство Smart Dentin Grinder™, позволяющее получать частицы дентина заданного размера. Химический очиститель позволял получить стерильный материал менее чем за 15 минут. Цель исследования заключалась в оценке эффективности применения полученного материала для заполнения постэкстракционных лунок с помощью гистологического и гистоморфометрического анализа формирования жизнеспособной кости (VB) в сравнении с незаполненными лунками.

2. Материалы и методы

В исследовании использовали шесть американских фоксхаундов в возрасте около 1 года, каждый из которых весил 14–15 кг. Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике исследований на животных Университета Мурсии (Испания) и соответствовал требованиям Директивы Совета Европейского союза от 1 февраля 2013 года № 2013/53/CEE. Клиническое обследование подтвердило удовлетворительное общее состояние здоровья животных. Перед началом эксперимента собаки были помещены на карантин, в течение которого им проводилась вакцинация против бешенства и назначались витамины. До и после операции животных содержали в вольерах, обеспечивая необходимый ветеринарный уход, свободный доступ к воде и стандартное лабораторное питание на всем протяжении исследования. У всех животных были интактные зубные дуги, без признаков оральных, вирусных или грибковых поражений.

Премедикация включала внутримышечное введение 10% золазепам в дозе 0,10 мл/кг, малеата ацепромазина (Calmo-Neosan®, Pfizer, Мадрид, Испания) в дозе 0,12–0,25 мг/кг и метедомидина в дозе 35 мкг/кг (Medetor 1 мг, Virbac, CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH, Германия) в четырехглавую мышцу бедра. Затем животных переводили в операционную, где им устанавливали внутривенный катетер (диаметр 22 или 20 G) в область головной вены, через который проводили непрерывную медленную инфузию пропофола со скоростью 0,4 мг/кг/мин. Для поддержания анестезии применяли летучие анестетики, при этом животным проводили интубация трахеи с помощью зонда Magill для подключения к анестезиологической системе и подачи изофлорана (2 об.%) в смеси с кислородом. Кроме того, в области хирургического вмешательства выполняли местную анестезию (Артикаин 40 мг с адреналином 1%, Normon®, Мадрид, Испания). Все процедуры проводились под контролем ветеринарного врача.

Под местной и общей анестезией, описанной выше, проводили удаление премоляров и первых моляров нижней челюсти с обеих сторон (P2, P3, P4, M1) (рис. 1). Многокорневые зубы рассекались в щечно-язычном направлении в области бифуркации с использованием бора из карбида вольфрама, что позволяло извлекать каждый корень по отдельности без повреждения костных стенок альвеолы.

Букко-лингвальные (3,9 ± 0,37 мм) и мезиодистальные (4,3 ± 0,45 мм) размеры входа в каждую свежую постэкстракционную лунку измеряли с помощью штангенциркуля, определяя средние параметры альвеолярного гребня. Средние размеры альвеолярного гребня в постэкстракционных лунках были следующими: 3,8 ± 0,21 мм (P2), 4,0 ± 0,5 мм (P3), 4,1 ± 1 мм (P4), 5,6 ± 0,07 мм (M1).

После отсечения коронковой части зубов с использованием стоматологического бора из карбида вольфрама (Zekrya FG Maillefer — Dentsply, США) корни очищали ультразвуковым аппаратом, шлифуя поверхность для удаления оставшихся волокон периодонтальной связки (рис. 2). Затем корни измельчали с помощью устройства Smart Dentin Grinder (Bioner Sistemas Implantológicos, Каталония, Испания) (рис. 3). Устройство Smart Dentin Grinder™ предназначено для измельчения удаленных зубов и сортировки полученного дентинного материала на частицы двух заданных размеров.

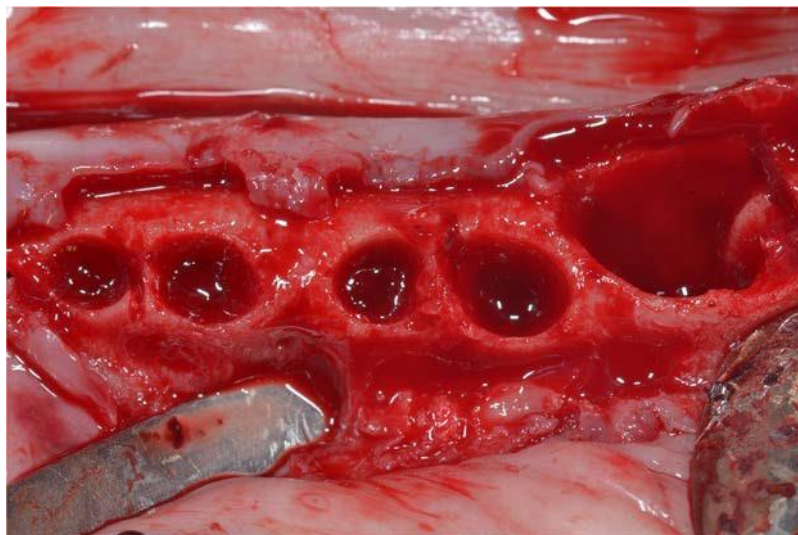


Рисунок 1. Постэкстракционные лунки нижнечелюстных премоляров и первых моляров.



Рисунок 2. Камера Smart dentin grinder с корнями, извлеченными из собаки.

Эффективность процесса сортировки достигает 95%. Для обеззараживания дентинных частиц использовали щелочно-спиртовой очищающий раствор, после чего материал дважды промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Весь процесс занимал 15–20 минут. Методика применима для зубов, удалённых по пародонтологическим показаниям, а также для зубов, ранее восстановленных с помощью фиксированных протезов (при условии их предварительного удаления), и частично или полностью ретенционных зубов. Однако зубы с ранее проведённым эндодонтическим лечением использовать не следует из-за риска контаминации посторонними материалами. В качестве альтернативы можно высушить полученные влажные частицы, поместив их на 5 минут на нагретую плиту (140 °C); после чего сухие стерильные частицы дентина можно использовать немедленно либо сохранить для последующего применения (Binderman et al., 2014).

Измельчённый дентин анализировали методом сканирующей электронной микроскопии (SEM) для оценки морфологии корней (Рис. 4–6). Для SEM как опытные, так и контрольные образцы помещали в жидкий азот примерно на 2 минуты, затем расщепляли вдоль продольной оси; другую половину разрезали поперечно с помощью ленточной пилы с алмазным покрытием и водяным охлаждением. Очищенные свежие поверхности покрывали углеродной плёнкой (BalTesc CED 030; BalTesc, Бальцерс, Лихтенштейн) и исследовали при увеличении $\times 10$. Разрешающая способность прибора составляла: 0,8 нм при 15 кВ; 1,4 нм при 1 кВ;

0,6 нм при 30 кВ (STEM-режим); 3,0 нм при 20 кВ, 10 нА; рабочее расстояние — 8,5 мм. Использовалась система Gemini II Electron Optics (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Йена, Германия) с детекторами вторичных и отраженных электронов, что позволяло изучать биологические процессы, связанные с регенерацией тканей, и выявлять морфологические изменения клеточных компонентов различных материалов. Первичный электронный пучок вызывает образование как вторичных, так и отраженных электронов. Различие в их энергии обеспечивает их разделение по траекториям с помощью модуля Beam Booster. Вторичные электроны формируются на верхних нанометрах поверхности образца и имеют энергию менее 50 эВ, визуализируя его топографию. Электрическое поле колонки SEM притягивает эти электроны, а линза объектива направляет их к кольцевому детектору InLens. В зависимости от состояния поверхности образца детектор регистрирует вторичные электроны в широком угловом диапазоне. Электроны обратного рассеяния (отраженные электроны) формируются под поверхностью. Их уровень энергии аналогичен уровню первичных электронов, направляемых на образец. Их количество превышает число вторичных электронов, и они помогают получить специфическую информацию о составе исследуемого материала. Малоугловые электроны обратного рассеяния дают сведения о кристаллической структуре образца (Carr and Toner, 1981; Mangano et al., 2013; Eberle et al., 2015; Ribeiro da Silva et al., 2016; Arshad et al., 2017).



Рисунок 3. (а) Устройство Smart dentin grinder, (b) остеопластический материал из корней зубов с размером частиц 1200 мкм, (с) остеопластический материал из корней зубов с размером частиц 3 мкм, (d) дентинный остеопластический материал после очистки.

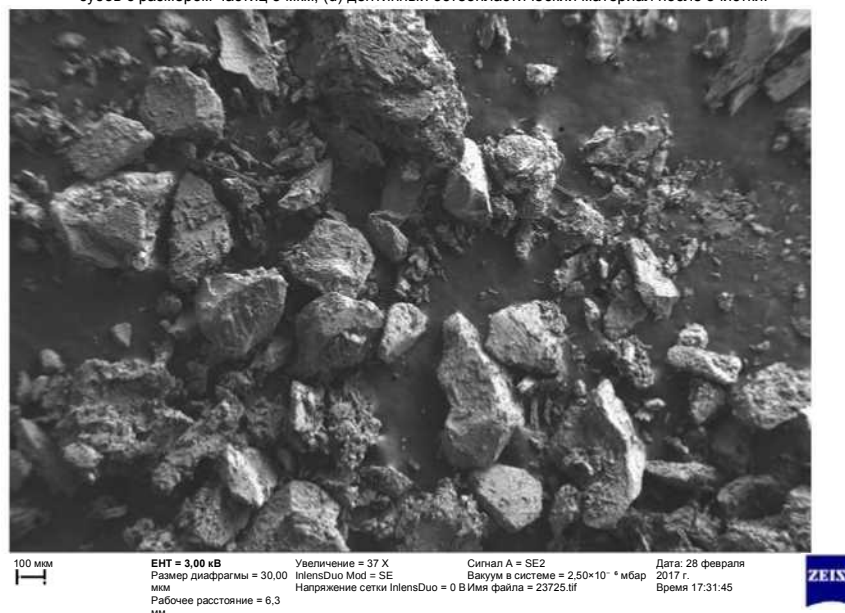


Рисунок 4. Изображение частиц разного размера, полученное методом сканирующей электронной микроскопии (SEM).

Для опытной группы (группа В) случайным образом были выбраны лунки после удаления зубов Р3, Р4 и М1 как с левой, так и с правой стороны. Эти участки заполнялись свежемельченными дентинными частицами (Рис. 7). Лунки после удаления зубов Р2 с обеих сторон оставались без вмешательства для естественного заживления, составляя контрольную группу (группа А). Для ушивания использовали простые рассасывающиеся шовные материалы (3–0 TV-15, Lorca Marin®, Мурсия, Испания), чтобы десны полностью смыкались над лунками. Швы снимали через 2 недели.

Передний участок от клыка до клыка сохранялся нетронутым, чтобы обеспечить минимальную жевательную функцию. Верхняя челюсть в эксперименте не подвергалась вмешательству. Все хирургические процедуры выполнялись под наблюдением ветеринарного врача, закреплённого за подразделением по исследованиям на животных университета.

Во время хирургического вмешательства внутривенно вводили

глюкозо-солевой раствор (250 см³) для поддержания водного баланса и облегчения послеоперационного восстановления. Вводили следующие препараты: противовоспалительный препарат Метакам®, 1–2 мл внутримышечно; антибиотик Алсир® (энрофлоксацин), 2 мл внутримышечно.

В соответствии с рекомендациями этических комитетов по исследованию на животных антибиотики и противовоспалительные препараты вводили сразу после операции и далее каждые два дня в течение четырёх дней, чтобы предотвратить послеоперационные воспаления и инфекции.

После операции собак переводили в вольеры, где они восстанавливались под наблюдением ветеринара. В течение последующих дней проводился уход за постэкстракционными ранами для профилактики инфекций, а также мониторинг общего состояния здоровья животных.

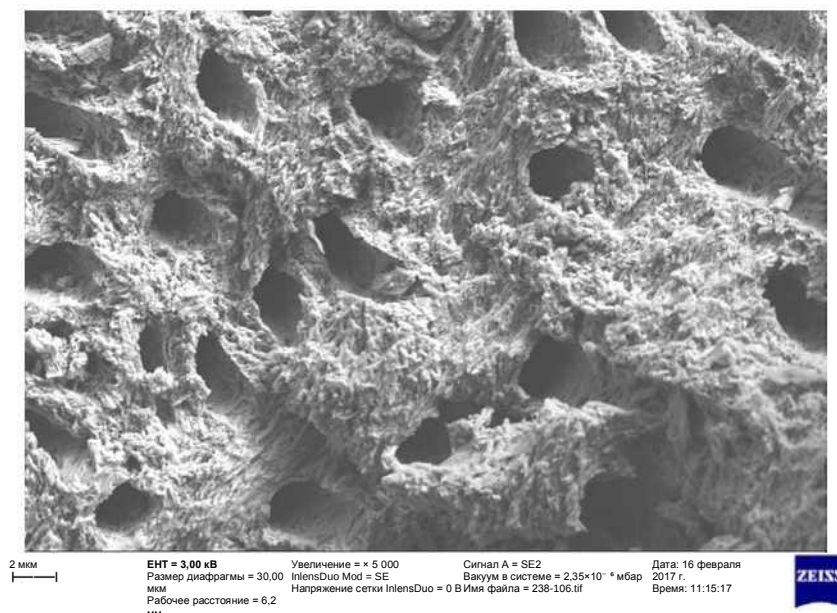


Рисунок 5. Поверхность измельченного дентина после деминерализации. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 10\,000$).

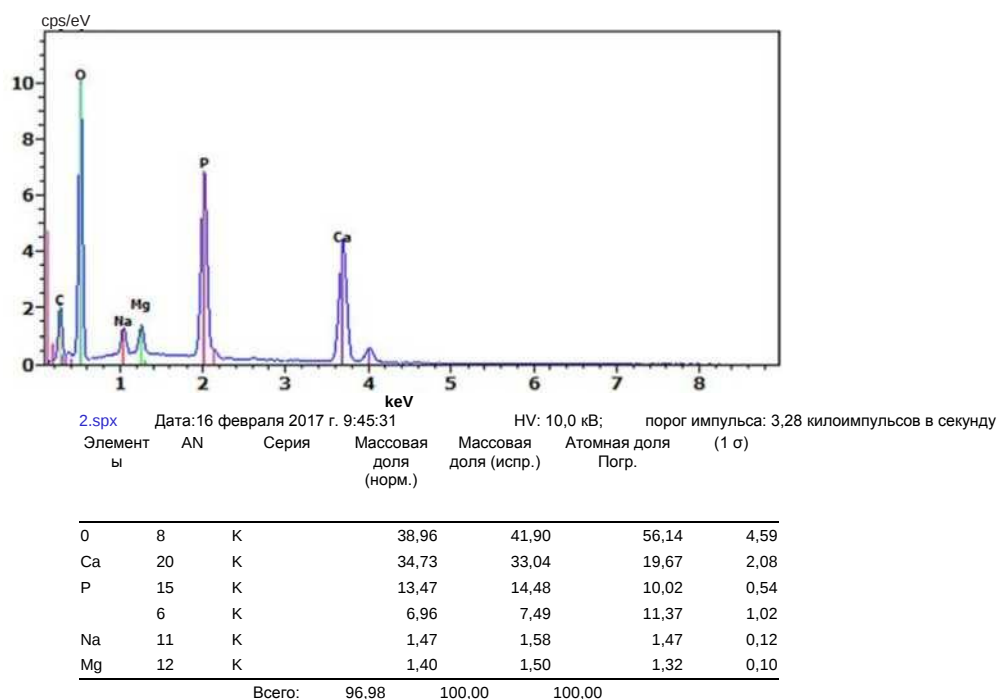


Рисунок 6. Энергетически-дисперсионная спектроскопия (EDX) дентинного материала.

Животные получали мягкий корм и воду без ограничений. Слизистую оболочку полости рта очищали марлевыми салфетками, пропитанными новым средством для полоскания рта на основе морской воды (Sea 4 Encias®, Blue Sea Laboratories, Аликанте, Испания). На вестибулярную и язычную десну, где выполнялись надкостничные разрезы от клыка до второго моляра, наносили местный анестетик.

Заживление кости происходило в течение 60 или 90 дней. После этого поднимали полнослойный лоскут (рис. 5), и с контрольных и исследуемых участков брали биопсию с помощью трепана диаметром 2,75 мм (рис. 8), соответственно с левой и правой стороны.

По одному биоптату из каждой группы (контрольной и исследуемой) и каждого временного периода анализировали методом микро-КТ (двумодальная SPECT-КТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография, аппарат Albira Bruker, Массачусетс, США), после чего образцы погружали в

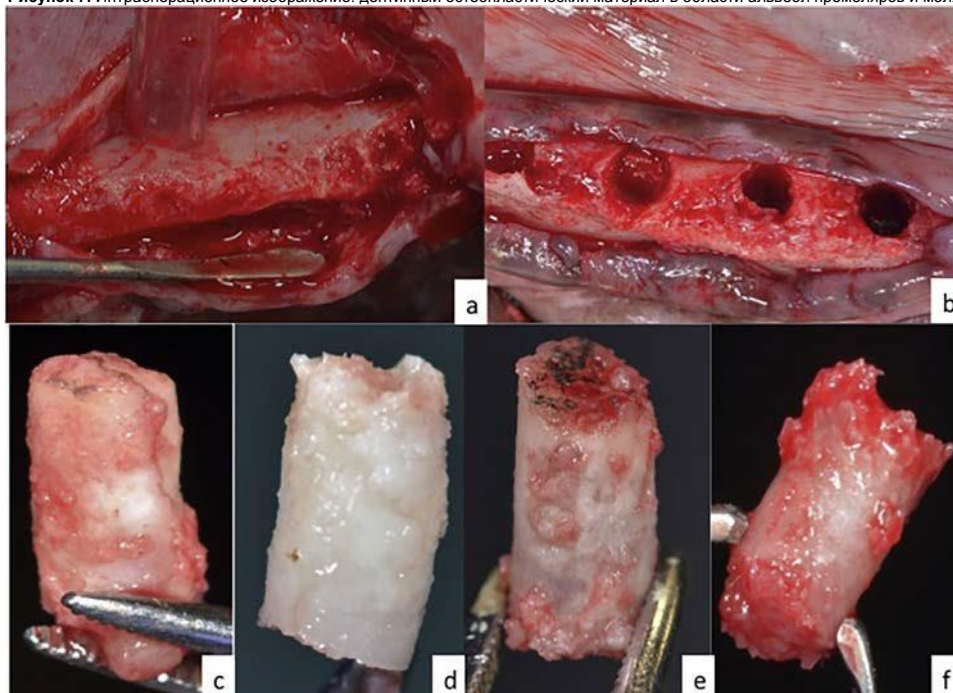
светополимеризующийся эпоксидный материал (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Австрия). Метод микро-КТ позволял выполнять анализ объемом 18 мм³ и плотностью 20 000 вокселей на образец.

2.1. Гистологическое исследование и подготовка образцов

Костные цилиндры были получены и индивидуально фиксированы в 4% формальдегиде в течение 15 дней. Образцы подвергались декальцинации в течение 30 дней с использованием реагента TBD-2 (Anatomical Pathology International, Ранкорн, Чешир, Великобритания). Половину образцов подвергли обезвоживанию и заливке в парафин с получением срезов толщиной 8 мкм (более тонкие срезы обеспечивают лучшую проходимость света и, соответственно, лучшую визуализацию структур). После этого срезы депарафинировали, гидратировали дистиллированной водой и окрашивали толуидиновым синим в течение 2–3 минут.



Рисунок 7. Интраоперационное изображение: дентинный остеопластический материал в области альвеол премоляров и моляров.



Фиг. 8. (а) Зажившая кость с дентинным остеопластическим материалом через 3 месяца заживления, (b) области взятия трепанобиопсии после применения остеопластического материала, (с) костный цилиндр из контрольного участка после 60 дней заживления, (d) костный цилиндр из участка применения дентинного остеопластического материала после 60 дней заживления, (е) костный цилиндр из контрольного участка после 90 дней заживления, (f) костный цилиндр из участка применения дентинного остеопластического материала после 90 дней заживления.

Другую половину образцов обезжизняли серией спиртовых растворов со снижающейся концентрацией (100–50%) и помещали в гистологическую смолу (Technovit 7200-VLC, Kulzer, Вайрхайм, Германия). После полимеризации образцы разрезали продольно по оси блока с помощью металлографического резака на срезы толщиной 100 мкм, затем шлифовали до толщины 30 мкм. Срезы погружали в раствор нитрата серебра (AgNO_3) на 30 минут и экспонировали на солнечном свете, промывали проточной водой, высушивали, затем окрашивали основным фуксином в течение 5 минут, снова промывали и монтировали на предметные стекла. Для гистоморфометрического анализа изображения увеличивали в 20 раз, анализируя каждый образец в 10 полях зрения в цифровом формате (DP12, Olympus, Нагано, Япония). Для анализа изображений использовалось программное обеспечение Microimage 4.0 (Media Cybernetics, Силвер-Спринг, Мэриленд, США). Все анализы проводились одним и тем же специалистом, не знавшим, к какой группе относится образец (исследуемая или контрольная). Оценивалась только область новообразованной кости; соединительная ткань не учитывалась. Определяли долю незрелой кости в общей площади кости. Незрелая кость характеризовалась дезорганизованной минерализованной структурой, высоким уровнем клеточности и наличием крупных костномозговых пространств, в отличие от зрелой кости, в которой преобладали остеоны — костные пластинки, концентрически организованные вокруг гаверсовых каналов.

2.2. Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения SPSS 20.0 (SPSS, Чикаго, штат Иллинойс, США). Были рассчитаны описательные статистики (среднее значение и стандартное отклонение).

Таблица 1.

Средние значения $\pm$ стандартное отклонение количества незрелой кости в каждый момент исследования; уровень значимости был установлен на уровне $P < 0,05$.

	Количество незрелой кости	
	Измельчитель дентина (%) Среднее значение $\pm$ SD	Контроль (%) Среднее значение $\pm$ SD
60 дней	25,7 $\pm$ 0,11*	55,98 $\pm$ 0,16
90 дней	12,6 $\pm$ 0,34*	34,8 $\pm$ 0,1

* $P < 0,05$.

Гистометрические измерения объема незрелой кости (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) после 60 и 90 дней заживления.

Таблица 2

Средние значения $\pm$ стандартное отклонение количества новообразованной кости и соединительной ткани через 60 дней; уровень значимости был установлен как $P < 0,05$.

Время измерения – 60 дней	Измельчитель дентина Среднее значение $\pm$ SD	Контроль	Значение P
Новообразованная кость	82,22 $\pm$ 1,7*	57,29 $\pm$ 0,11	<0,022*
Соединительная ткань	18,67 $\pm$ 0,1	30,56 $\pm$ 0,3	<0,562

Гистометрические измерения объема новообразованной кости (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) после 60 дней заживления.

* $P < 0,05$.

Таблица 3

Средние значения $\pm$ стандартное отклонение количества новообразованной кости и соединительной ткани через 90 дней; уровень значимости был установлен как $P < 0,05$.

Время измерения – 90 дней	Измельчитель дентина Среднее значение $\pm$ SD	Контроль	Значение P
Новообразованная кость	91,32 $\pm$ 0,8	65,89 $\pm$ 0,6	<0,123*
Соединительная ткань	8,38 $\pm$ 0,9	23,67 $\pm$ 1,1	<0,150

Гистометрические измерения объема новообразованной кости (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) после 90 дней заживления.

* $P < 0,05$.

Для сравнения средних значений применяли непараметрический критерий Уилкоксона для связанных выборок, принимая уровень значимости за 95% ($P < 0,05$). Нулевая гипотеза предполагала равенство средних, а наличие значимых различий между ними рассматривалось как альтернативная гипотеза. Поскольку были выявлены значительные различия между средними значениями, нулевая гипотеза была отклонена. Для анализа различий между переменными использовали t -критерий Стьюдента. Значимость была установлена как $p < 0,05$. Средний процент образования новой костной ткани, остаточного остеопластического материала и неминерализованной соединительной ткани в каждый период оценки показан в таблицах 1–3.

3. Результаты

3.1 Оценка по данным микроКТ

На рисунке 9 представлено микроКТ-изображение участка с дентинным остеопластическим материалом через 90 дней с усреднённой плотностью 828 $\pm$ 13 единиц Хаунсфилда (максимальное значение — 1210 ед. Хаунсфилда), что соответствует костной ткани типа D1. В контрольном участке через 90 дней плотность составила 773,6 $\pm$ 15 ед. Хаунсфилда, что соответствует аналогичному типу кости.

3.2 Результаты через 60 дней

3.2.1 Оптическая микроскопия

В контрольной группе наблюдалось значительное количество вновь образованной кости, закрывающей костные дефекты. Однако вся эта ткань представляла собой незрелую (ретикулофиброзную) кость — дезорганизованную структуру с высоким уровнем клеточности и крупными костномозговыми полостями. В группе, где применялся дентинный остеопластический материал, также выявлялась новообразованная кость, включая области с нерегулярной структурой и высокой клеточностью, но в меньшей степени, чем в контрольной группе. В группа, в которой применялся дентинный материал, отмечены остатки частично резорбированных частиц дентина и остеоиндукция на поверхности частиц дентина и между ними (фиг. 10).

3.2.2 Гистоморфометрический анализ

По данным гистоморфометрии доля незрелой (ретикулофиброзной) кости составляла 25,7 $\pm$ 0,11% в дефектах, обработанных дентинным материалом, что статистически значимо отличалось от контрольных участков — 55,98 $\pm$ 0,16% (таблица 1). Через 60 дней доля новой кости в участках, обработанных дентинным материалом, составляла 82,22 $\pm$ 1,7%, в то время как в контрольных дефектах — 57,29 $\pm$ 0,11%, различия были статистически значимыми ($p < 0,05$) (таблица 2).

3.3 90 дней

3.3.1 Оптическая микроскопия

Через 90 дней в контрольной группе объем вновь образованной кости увеличился по сравнению с 60-м днём; костные дефекты были закрыты, на изображениях присутствовали концентрические пластинки, формирующие остеоны, хотя в отдельных участках по-прежнему сохранялась дезорганизованная незрелая кость. В образцах с дентинным остеопластическим материалом преобладала зрелая новообразованная (пластинчатая) кость, организованная в остеоны с развитой сосудистой системой; дезорганизованные участки с высокой клеточностью сохранялись, но составляли лишь незначительную часть общего костного объема (рис. 11).

3.3.2 Гистоморфометрический анализ

По данным гистоморфометрии средняя доля костного мозга составляла 12,6 $\pm$ 0,34% в участках с дентинным остеопластическим материалом, что статистически значимо отличалось от контрольных значений — 34,8 $\pm$ 0,1% (таблица 1). Были обнаружены статистически значимые различия между оценками через 60 и 90 дней (таблица 1). Через 90 дней доля новой кости в участках, обработанных дентинным материалом, составляла 91,32 $\pm$ 0,8%, в то время как в контрольных дефектах — 65,89 $\pm$ 0,6%, различия были статистически значимыми ($p < 0,05$) (таблица 3).

4. Обсуждение

Кристаллы гидроксиапатита идентичны по структуре как в дентине, так и в кости. Однако ткани различаются по механическим свойствам и клеточному составу: в отличие от кости, дентин не содержит клеток. В дентине содержится около 10% воды, которая полностью располагается в дентинных канальцах. С возрастом этот объем снижается, поскольку перитубулярный и интратубулярный дентин заполняет канальцы и вытесняет воду. В контексте гидродинамической теории возникновения боли в дентине это частично объясняет (в сочетании с другими многофакторными причинами) снижение болевой чувствительности у пожилых людей. При использовании дентинных частиц в качестве остеопластического материала, механизм их действия основывается на анкилозе; процесс не нарушается из-за содержания воды в органической матрице, так как водородные связи сохраняются почти без изменений в течение всей жизни и после смерти. Это объясняет, почему зубы часто используются в качестве надежного источника информации в судебно-медицинской экспертизе. Было проверено наличие свободных аминокислот в дентине, обработанном описанным методом, и обнаружено лишь их незначительное количество. Однако наиболее важные RDG-пептиды (аргинин, глицин, аспартат) остались неизменёнными. Это наблюдение относится к дентину после этапов измельчения и обработки этанолом. Основной причиной сохранности является высокая плотность минеральной части, защищающей матрикс. Кроме того, дентин не нагревался и не обрабатывался (сильными) кислотами, что позволяло остеокластам выполнять свою функцию. Таким образом, предложенный метод оказался эффективным, несмотря на значительную потерю свободной воды.

Безопасность аутогенного остеопластического материала, полученного из зубов, уже была установлена. Это перспективный материал, способный заменить аутогенные костные материалы, обладающий хорошими остеогенными свойствами благодаря выраженной остеоиндукции и остеоиндукции, обеспечиваемой как органическими, так и неорганическими компонентами.

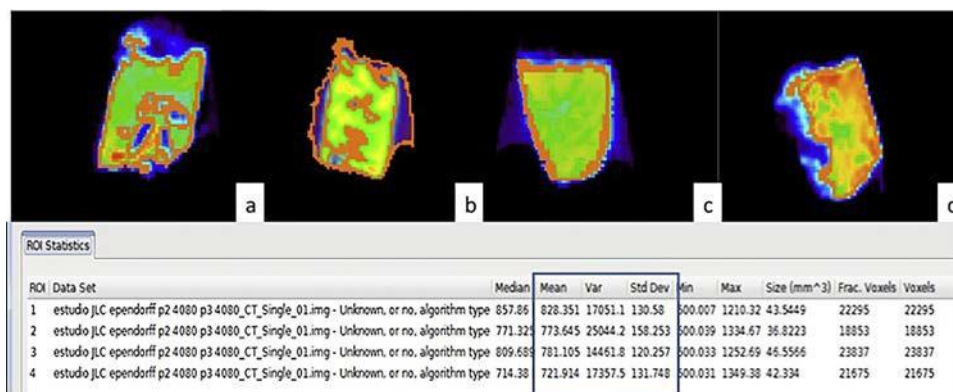


Рисунок 9. (а) МикроКТ-изображение участка с дентинным материалом через 90 дней, плотность по Хаунсфилду: 828 ± 13 ед.; (b) МикроКТ-изображение контрольного участка через 90 дней, плотность по Хаунсфилду: $773,6 \pm 15$ ед.; (c) МикроКТ-изображение участка с дентинным материалом через 60 дней, плотность по Хаунсфилду: 781 ± 1 ед.; (d) МикроКТ-изображение участка с дентинным материалом через 60 дней, плотность по Хаунсфилду: 721 ± 9 ед.

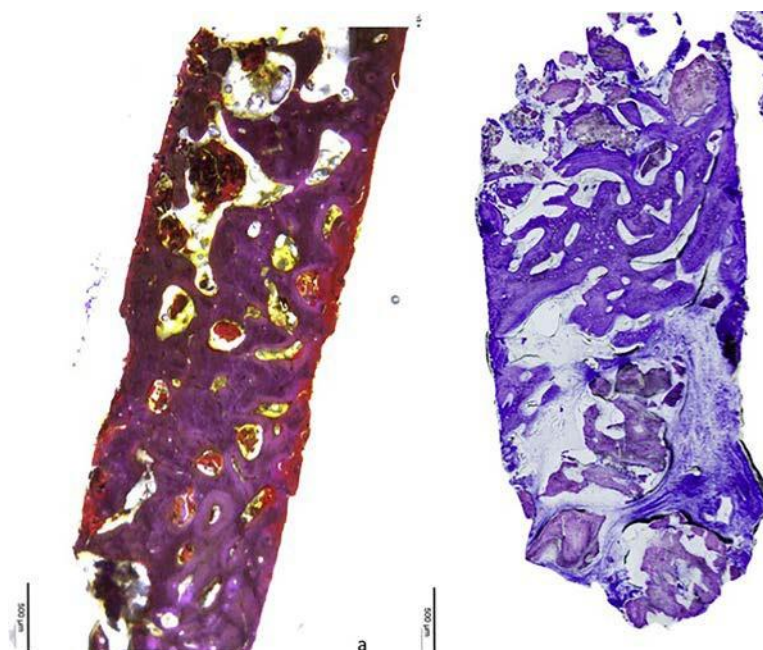


Рисунок 10. (а) Образец из контрольной группы: значительное количество новообразованной кости, закрывающей костный дефект, при этом ткань полностью незрелая (ретикулофиброзная кость); (б) Образец с дентинным материалом: новообразованная кость с участками нерегулярной организации и высокой клеточности (увеличение $\times 10$).

При недостаточном количестве доступного остеопластического материала возможно дополнение другими материалами. В настоящее время проводится большое количество исследований остеоиндуктивных и остеокондуктивных остеопластических материалов на основе ауто- и ксеногенных зубов с целью создания идеальных каркасов для доставки стволовых клеток и факторов роста в эндодонтическом лечении и для реставрации зубов (Kim, 2012).

Вода, содержащаяся в микроскопических порах дентина (которые с возрастом становятся более многочисленными и крупными), также присутствует во внеклеточном матриксе костной ткани. Распределение воды в костной ткани меняется с возрастом. В литературе описано, что её количество уменьшается по мере роста скелета (Jonsson et al., 1985) и по мере прогрессирования минерализации. Можно предположить, что поведение кости с точки зрения механики зависит от распределения воды в ткани — долей воды, связанной с коллагеном, с минеральной фазой и подвижной воды в сосудистых и лакунарно-каналикулярных пространствах.

Аутогенные зубы применяются для трансплантации в лунки после удаления уже более 40 лет. Известно, что трансплантированные зубы, анкилозированные в челюстной кости,

подвергаются заместительной резорбции костной тканью в течение 5–8 лет (Sperling et al., 1986). Кроме того, согласно литературным данным, удаленные зубы, имплантированные обратно в лунки, прочно прикрепляются к кости, которая формируется непосредственно на корневом дентине или цементе, приводя к анкилозу (Andersson et al., 1989). Тем не менее, способность материала на основе зубов генерировать костную ткань мало изучена. Без сомнения, аутогенная кость является идеальным материалом для реконструкции дефектов твердых тканей. Она обладает способностью к остеогенезу, остеокондукции, остеointegrации, не вызывает реакций на инородное тело, и способствует быстрому заживлению (Urist, 1965; Urist et al., 1973, 1982).

Анкилозированный корень зуба непрерывно резорбируется и замещается костью (в конечном итоге с резорбцией всего корня), при этом альвеолярный отросток сохраняется как в период резорбции, так и после него. Согласно обзору Malmgren (2013), зубы с анкилозом, подвергшиеся декоронации, способствуют сохранению альвеолярного гребня в щечно-нёбном направлении, при этом часто наблюдается также увеличение вертикальной высоты (Malmgren, 2013; Park et al., 2007).

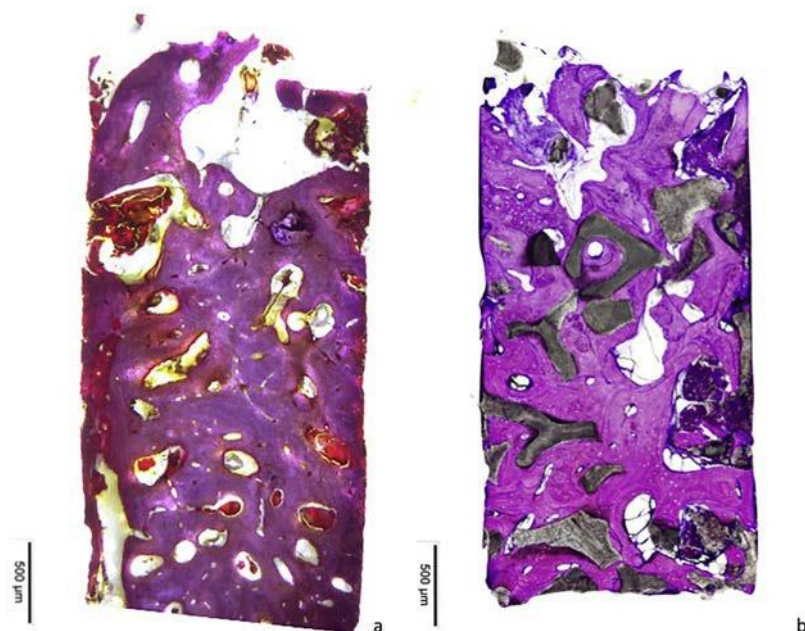


Рисунок 11. (а) Образец из контрольной группы: усиленная организация вновь образованной кости, но сохраняются участки незрелой (ретикулофиброзной) кости; (б) Образец с дентинным материалом: преобладание зрелой (пластинчатой) кости, хорошо организованной в остеоны (увеличение $\times 10$).

Учитывая широкий спектр доступных остеопластических материалов, выбор правильного материала может быть затруднительным. Он должен зависеть от размера дефекта и клинической цели вмешательства. При необходимости удаления зуба, материалы, полученные из зубов, могут рассматриваться как жизнеспособная альтернатива благодаря своему аутогенному происхождению и благоприятным клиническим и гистологическим результатам (Kim et al., 2013). Хотя деминерализованный дентин содержит матричные факторы роста и дифференцировки, способные индуцировать остеогенез, однако вновь образованная кость и остаточный дентин недостаточно прочны для надёжной фиксации имплантатов. Используемое в настоящем исследовании устройство Smart Dentin Grinder позволяет получать стерильный минерализованный дентинный материал из только что удалённых собственных зубов, пригодный к немедленному применению в качестве аутогенного остеопластического материала.

Преимуществом гранулированного минерализованного материала на основе дентина является сохранение механической стабильности, что обеспечивает возможность ранней нагрузки имплантатов после помещения остеопластического материала в свежие лунки и костные дефекты (Kim, 2012). Более того, хотя индуктивные свойства несколько замедлены, минерализованный дентин прочно интегрирован в новообразованную кость, создавая прочный участок для фиксации имплантатов. Клинические данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что установка и нагрузка имплантатов может быть выполнена как в нижней челюсти, так и в верхней челюсти в течение 2–3 месяцев после трансплантации частиц дентина (Yeomans and Urist, 1967). Настоящие результаты показывают, что дентинные материалы являются отличным каркасом для образования новой кости, ремоделируясь значительно медленнее, чем кортикальная кость или большинство доступных биоматериалов, обеспечивая долгосрочное сохранение альвеолярного гребня, структуры и эстетики мягких тканей (Andersson, 2010; Binderman et al., 2014).

Проведен большой объем исследований остеопластических материалов для замены аутогенной кости. В частности, Kim и соавт. (2014) разработали материал на основе удалённых собственных зубов, который потенциально лишен недостатков аллотрансплантатов, ксенотрансплантатов и синтетических материалов (Kim et al., 2014). Авторы утверждали, что аутоотрансплантат, полученный из собственных зубов пациента, представляет собой инновационный материал, высокоэффективный в клинической практике, обладающий всеми преимуществами аутогенной кости благодаря сходству его компонентов с костной тканью. Кроме того, он устраняет психологический дискомфорт пациентов, часто возникающий, когда им предлагают использование алло- или ксенотрансплантатов. Материал отличается высокой биосовместимостью, не вызывает иммунного ответа, реакции на инородное тело или перекрестного заражения. Он обладает остеоиндуктивными, остеокондуктивными свойствами, а также способностью к полному замещению с ремоделированием (creeping substitution), и может быть изготовлен в различных формах и размерах (Kim et al., 2001a,b,c, 2002,

2004a,b). Зубы могут быть использованы, даже если корень остается в альвеолярной кости. Более того, некоторые хирургические протоколы намеренно предусматривают сохранение зубного корня для предотвращения резорбции альвеолярного отростка (Sperling et al., 1986; Andersson et al., 1989).

Согласно данным Kim и соавт., около 90% органического компонента зуба составляет коллаген типа I, играющий ключевую роль в кальцификации кости (Urist, 1965; Urist et al., 1973, 1982; Malmgren, 2013; Park et al., 2007; Kim et al., 2014). Зубы и кости челюстей обладают высокой степенью сродства благодаря сходному химическому составу и структуре. Таким образом, использование удалённых нефункциональных зубов или зубов при пародонтите в качестве источника остеопластического материала вместо их утилизации является обоснованным подходом, позволяющим избежать возможного отсроченного иммунного ответа благодаря применению дентинного материала (Kim, 2012; Kim et al., 2017). Kim проводил эксперименты с использованием специализированных устройств для обработки зубного материала, получая блоки или частицы, которые затем успешно применялись в доклинических и клинических исследованиях. В настоящем исследовании на собаках формирование незрелой кости наблюдалось спустя 60 дней, а небольшое количество пластинчатой (зрелой) кости — спустя 90 дней. Согласно этим выводам, гранулированный материал на основе аутогенного дентина является перспективным материалом для восстановления кости, особенно когда для сохранения объема лунки нет возможности использовать аутогенную кость.

5. Выводы

Гранулированный материал на основе аутогенного дентина, трансплантированный сразу после экстракции, можно считать полезным биоматериалом для консервации лунок, сохранения как щечной, так и язычной пластинки, формирования большого объема новой незрелой костной ткани через 60 дней и небольшого количества пластинчатой кости после 90 дней заживления.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гранулированный минерализованный материал на основе аутогенного дентина может быть использован в качестве альтернативного остеопластического материала для сохранения краевой кости в области лунки, для синус-лифтинга, а также для устранения костных дефектов.

Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить Nuria Garcia Carrillo (ветеринарный врач, Университет Мурсии, Испания) за помощь в уходе за животными.

Список литературы

- Akazawa, T., Murata, M., Sasaki, T., Tazaki, J., Kobayashi, M., Kanno, T., Matsushima, K., Arisue, M., 2006. Biodegradation and bioabsorption innovation of the function-ally graded cattle-bone-originated apatite with blood compatibility. *J. Biomed. Mater. Res.* 76, 44–51.

- Andersson, L., Bodin, I., Sörensen, S., 1989. *Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage*. *Endod. Dent. Traumatol.* 5, 38–47.
- Andersson, L., 2010. *Dentin xenografts to experimental bone defects in rabbit tibia are ankylosed and undergo osseous replacement*. *Dent. Traumatol.* 26, 398–402.
- Arshad, M., Mahgoli, H., Payaminia, 2017. *Effect of repeated screw joint closing and opening cycles and cyclic loading on abutment screw removal torque and screw thread morphology: scanning electron microscopy evaluation*. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 22, <http://dx.doi.org/10.11607/jomi.5476>.
- Bhaskar, S.N., 1980. *Orban's Oral Histology and Embryology*, 9th ed. Mosby Co., USA.
- Binderman, I., Hallel, G., Nardy, C., Yaffe, A., Sapoznikov, L., 2014. *A novel procedure to process extracted teeth for immediate grafting of autogenous dentin*. *J. Interdiscipl. Med. Dent. Sci.* 2, 154, <http://dx.doi.org/10.4172/jimds.1000154>.
- Carr, K.E., Toner, P.G., 1981. *Scanning electron microscopy in biomedical research and routine pathology*. *J. Microsc.* 123, 147–159.
- Eberle, A.L., Mikula, S., Schalek, R., Lichtman, J., Knothe Tate, M.L., Zeidler, D., 2015. *High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope*. *J. Microsc.* 259, 114–120.
- Gauthier, O., Boix, D., Grimandi, G., Aguado, E., Bouler, J.M., Weiss, P., Daculsi, C., 2004. *A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets: a preliminary study in dogs*. *J. Periodont.* 75, 663–671.
- Hassan, A.H., Evans, C.A., Zaki, A.M., George, A., 2003. *Use of bone morphogenetic protein-2 and dentin matrix protein-1 to enhance the osteointegration of the on plant system*. *Connect Tissue Res.* 4, 30–41.
- Horowitz, R., Holtzclaw, D., Rosen, P.S., 2012. *A review on alveolar ridge preservation following tooth extraction*. *J. Evid. Based Dent. Pract.* 12, 149–160.
- Jonsson, U., Ranta, H., Strömberg, L., 1985. *Growth changes of collagen cross-linking, calcium, and water content in bone*. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 104, 89–93.
- Kim, Y.K., Yeo, H.H., Ryu, C.H., Lee, H.B., Byun, U.R., Cho, J.E., 1993. *An experimental study on the tissue reaction of toothash implanted in mandible body of the mature dog*. *J. Korean Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* 15, 129–136.
- Kim, Y.K., Yeo, H.H., Yang, I.S., Seo, J.H., Cho, J.O., 1994. *Implantation of toothash combined with plaster of Paris: experimental study*. *J. Korean Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* 16, 122–129.
- Kim, Y.K., Yeo, H.H., Cho, J.E., 1996a. *The experimental study of implantation combined with toothash and plaster of Paris in the rats: comparison according to the mixing ratio*. *J. Korean Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* 18, 26–32.
- Kim, Y.K., Yeo, H.H., Park, I.S., Cho, J.E., 1996b. *The experimental study on the healing process after the inlay implantation of toothash/plaster mixture block*. *J. Korean Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* 18, 253–260.
- Kim, Y.K., 1998. *The development of new biomaterial for restoration of hard tissue defects*. *J. Korean Dent. Assoc.* 36, 289–295.
- Kim, Y.K., Kim, S.G., Lee, J.G., Lee, M.H., Cho, J.O., 2001a. *An experimental study on the healing process after the implantation of various bone substitutes in the rats*. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 27, 15–24.
- Kim, S.G., Kim, Y.K., Cho, J.O., 2004a. *Histologic evaluation of peri-implant defects with a particulate dentin-plaster of Paris combination and bioresorbable membrane barriers: a preliminary study*. *Hosp. Dent.* 16, 15–18.
- Kim, S.G., Kim, H.K., Lim, S.C., 2001b. *Combined implantation of particulate dentin, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats*. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 29, 282–288.
- Kim, S.G., Chung, C.H., Kim, Y.K., Park, J.C., Lim, S.C., 2002. *The use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants*. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 17, 86–94.
- Kim, S.Y., Kim, S.G., Lim, S.C., Bae, C.S., 2004b. *Effects on bone formation in ovariectomized rats after implantation of tooth ash and plaster of Paris mixture*. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62, 852–857.
- Kim, Y.K., Kim, S.G., Byeon, J.H., Lee, H.J., Um, I.U., Lim, S.C., 2010. *Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 109, 496–503.
- Kim, Y.K., 2012. *Bone graft material using teeth*. *J. Korean Assoc. Oral. Maxillofac. Surg.* 38, 134–138.
- Kim, Y.K., Lee, J., Um, I.W., Kim, K.W., Murata, M., Akazawa, T., Mitsugi, M., 2013. *Tooth-derived bone graft material*. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 39, 103–111.
- Kim, Y.K., Kim, S.G., Yun, P.Y., Yeo, I.S., Jin, S.C., 2014. *Autogenous teeth used for bone grafting: a comparison with traditional grafting materials*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 117, e39–e45.
- Kim, Y.K., Bang, K.M., Murata, M., Mitsugi, M., Um, I.W., 2017. *Retrospective clinical study of allogenic demineralized dentin matrix for alveolar bone repair*. *J. Hard Tissue Biol.* 26, 95–102.
- Kim, S.G., Kim, H.K., Lim, S.C., 2001c. *Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats*. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 29, 282–288.
- Malmgren, B., 2013. *Ridge preservation/decoronation*. *J. Endod.* 39, S67–S72.
- Mangano, C., Perrotti, V., Raspanti, M., Mangano, F., Luongo, G., Piattelli, A., Iezzi, G., 2013. *Human dental implants with a sandblasted, acid-etched surface retrieved after 5 and 10 years: a light and scanning electron microscopy evaluation of two cases*. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 28, 917–920.
- Maté-Sánchez de Val, J.E., Calvo-Guirado, J.L., Delgado-Ruiz, R.A., Ramírez-Fernández, M.P., Negri, B., Abboud, M., Martínez, I.M., de Aza, P.N., 2012. *Physical properties, mechanical behavior, and electron microscopy study of a new a-TCP block graft with silicon in an animal model*. *J. Biomed. Mater. Res. A: Appl. Biomater.* 100, 3446–3454.
- Maté-Sánchez de Val, J.E., Mazón, P., Guirado, J.L., Delgado Ruiz, R.A., Ramírez Fernández, M.P., Negri, B., Abboud, M., De Aza, P.N., 2014. *Comparison of three hydroxyapatite/tricalcium phosphate/collagen ceramic scaffolds: an in vivo study*. *J. Biomed. Mater. Res. A: Appl. Biomater.* 102, 1037–1046.
- Min, B.M., 2007. *Oral Biochemistry*. Daehan Narae Pub Co., Seoul, pp. 22–26.
- Murata, M., Maki, F., Sato, D., Shibata, T., Arisue, M., 2000. *Bone augmentation by onlay implant using recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat skull without periosteum*. *Clin. Oral Impl. Res.* 11, 289–295.
- Murata, M., Arisue, M., Sato, D., Sasaki, T., Shibata, T., Kuboki, Y., 2002. *Bone induction in subcutaneous tissue in rats by a newly developed DNA-coated atelocollagen and bone morphogenetic protein*. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 40, 131–135.
- Murata, M., Akazawa, T., Tazaki, J., Ito, K., Sasaki, T., Yamamoto, M., Tabata, Y., Arisue, M., 2007. *Blood permeability of a novel ceramic scaffold for bone morphogenetic protein-2*. *J. Biomed. Mater. Res.* 81B, 469–475.
- Nakashima, M., 2005. *Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 369–376, Review.
- Nanci, A., 2008. *Ten Cate's Oral Histology*, 7th ed. Elsevier Inc., pp. 202–211.
- Park, C.H., Abramson, Z.R., Taba Jr., M., Jin, Q., Chang, J., 2007. *Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair*. *J. Periodontol.* 78, 273–281.
- Pérez-Sánchez, M.J., Ramírez-Glindon, E., Lledó-Gil, M., Calvo-Guirado, J.L., Pérez-Sánchez, C., 2010. *Biomaterials for bone regeneration*. *Med. Oral Pathol. Oral & Cir. Bucal.* 15, 517–522.
- Ramírez Fernández, M.P., Gehrke, S.A., Mazón, P., Calvo-Guirado, J.L., De Aza, P.N., 2017a. *Implant stability of biological hydroxyapatites used in dentistry*. *Materials (Basel)* 10 (6), 12.
- Ramírez Fernández, M.P., Mazón, P., Gehrke, S.A., Calvo-Guirado, J.L., De Aza, P.N., 2017b. *Comparison of two xenograft materials used in sinus lift procedures: material characterization and in vivo behavior*. *Materials (Basel)* 10 (6), 7.
- Ramírez Fernández, M.P., Gehrke, S.A., Pérez Albacete Martínez, C., Calvo Guirado, J.L., de Aza, P.N., 2017c. *SEM-EDX study of the degradation process of two xenograft materials used in sinus lift procedures*. *Materials (Basel)* 10 (5), 17.
- Ribeiro da Silva, J., Castellano, A., Malta Barbosa, J.P., Gil, L.F., Marin, C., Granato, R., Bonfante, E.A., Tovar, N., Janal, M.N., Coelho, P.G., 2016. *Histomorphological and histomorphometric analyses of grade IV commercially pure titanium and grade V Ti-6Al-4V titanium alloy implant substrates: an in vivo study in dogs*. *Implant Dent.* 25, 650–655.
- Sperling, I., Itzkowitz, D., Kaufman, A., Binderman, I., 1986. *A new treatment of heterotransplanted teeth to prevent progression of root resorption*. *Endod. Dent. Traumatol.* 2, 117–120.
- Urist, M.R., 1965. *Bone: formation by auto induction*. *Science* 150, 893–899.
- Urist, M.R., Iwata, H., Ceccotti, P.L., Dorfman, R.L., Boyd, S.D., McDowell, R.M., Chien, C., 1973. *Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3511–3515.
- Urist, M.R., Mizutani, H., Conover, M.A., Lietze, A., Finerman, G.A., 1982. *Dentin, bone, and osteosarcoma tissue bone morphogenetic proteins*. *Prog. Clin. Biol. Res.* 101, 61–81.
- Yeomans, J.D., Urist, M.R., 1967. *Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues*. *Arch. Oral Biol.* 12, 999–1008.