



# Αναγεννητική περιοδοντική θεραπεία: οι δυνατότητες της ιστικής μηχανικής

## Regenerative periodontal therapy: the potential of tissue engineering

**Δομνίκη Χατζοπούλου<sup>1</sup>, Francis J. Hughes<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Κλινικός Λέκτορας, Μονάδα Περιοδοντολογίας, Ινστιτούτο Οδοντιατρικής, Σχολή Ιατρικής και Οδοντιατρικής Bart's και Λονδίνου, Πανεπιστήμιο Queen Mary Λονδίνου, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο, <sup>2</sup>Καθηγητής, Μονάδα Περιοδοντολογίας, Τομέας Κλινικής Έρευνας, Κολέγιο Kings, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο

**Dominiki Chatzopoulou<sup>1</sup>, Francis J. Hughes<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Periodontist, Clinical Lecturer, Unit of Periodontology, Institute of Dentistry, Bart's and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, UK  
<sup>2</sup>Professor, Periodontology Unit, Clinical Research Division, Kings College, London, UK

### Περίληψη

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η δυνατότητα για περιοδοντική αναγέννηση φαίνεται να περιορίζεται από την αναγεννητική ικανότητα των κυττάρων και το τοπικό περιβάλλον. Η αναγέννηση των κατεστραμμένων περιοδοντικών ιστών ρυθμίζεται από διάφορους τύπους περιοδοντικών κυττάρων, τη μεσοκυττάρια ουσία και από μια μεγάλη ποικιλία βιοενεργών μορίων που προκαλούν επιλεκτικές και μη επιλεκτικές αντιδράσεις σε διάφορα κύτταρα και στις προγονικές σειρές τους. Καθώς οι συμβατικές μέθοδοι περιοδοντικής αναγέννησης παραμένουν ανεπαρκείς για πλήρη και αξιόπιστη περιοδοντική αναγέννηση, η παρούσα δημοσίευση παρουσιάζει την πρόοδο στους τομείς της ιστικής μηχανικής οι οποίες θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην διαμόρφωση των απαραίτητων προϋποθέσεων που υποστηρίζουν το φυσικό δυναμικό της επούλωσης των περιοδοντικών ιστών.

Η περιοδοντική ιστική μηχανική εξαρτάται από τρία θεμελιώδη στοιχεία: κατάλληλα μηνύματα, κύτταρα και πλέγματα που στοχεύουν την περιοδοντική βλάβη. Τα κύτταρα παρέχουν τον εξοπλισμό για ανάπτυξη νέων ιστών και αναγέννηση. Οι σηματοδοτικοί παράγοντες διαμορφώνουν την κυτταρική δραστηριότητα και παρέχουν ερεθίσματα για διαφοροποίηση των κυττάρων και ανάπτυξη ιστών. Τέλος, τα πλέγματα καθοδηγούν και μορφοποιούν μια τρισδιάστατη πρότυπη δομή που διευκολύνει αυτές τις διαδικασίες. Επιπλέον, η παρούσα ανασκόπηση αναπτύσσει το σημαντικό ρόλο αυτών των τριών στοιχείων στη διαδικασία επούλωσης καθώς και τις πρόσφατες προόδους και μελλοντικές κατευθύνσεις της έρευνας για την ανάπτυξη κλινικών μεθόδων για προβλέψιμη περιοδοντική αναγέννηση.

Περιοδοντολογικά Ανάλεκτα **2010; 21:57-75**

**Λέξεις κλειδιά:** περιοδοντική αναγέννηση, ιστική μηχανική, βλαστικά κύτταρα, βιοϋλικά πλέγματα

### Abstract

Experimental studies have shown that the potential of periodontal regeneration seems to be limited by the regenerative capacity of the cells involved and the local environment. The regeneration of damaged periodontal tissues is regulated by various periodontal cell types, the extracellular matrix, and a vast array of biomolecules that induce both selective and non-selective responses in different cells and their precursor lineages. As conventional periodontal regeneration methods remain insufficient to obtain a complete and reliable periodontal regeneration, this paper presents the progress in tissue engineering which could help in the development of all necessary conditions that support the natural healing potential of periodontal tissues.

Periodontal tissue engineering is dependent on three basic components: appropriate cells, signals, and scaffolds that target the tissue defect. Cells provide the machinery for new tissue growth and regeneration. Signaling factors modulate cellular activity and provide stimuli for cell differentiation into developing tissues. Finally, scaffolds guide and form a three-dimensional template structure to facilitate these processes. In addition, the present review elaborates the important role of these three components in the healing process and the recent progress and future directions of research in developing clinical methods for predictable periodontal regeneration.

*Analecta Periodontologica* **2010; 21:57-75**

**Key words:** periodontal regeneration, tissue engineering, stem cells, biomaterial scaffolds

## Αιτιολόγηση της περιοδοντικής αναγέννησης

Η συμβατική περιοδοντική θεραπεία περιλαμβάνει την επιτυχή διαχείριση των στοματικών βιοϋμένων, πρώτα με την εφαρμογή μεθόδων απομάκρυνσης της πλάκας από τον ασθενή και κατόπιν με την επαγγελματική αφαίρεση των εναποθέσεων και των παραγόντων κατακράτησης πλάκας. Η θεραπεία μπορεί επίσης να απαιτεί χειρουργικές παρεμβάσεις τόσο για απομάκρυνση εναποθέσεων όσο και για χειρουργική αποκατάσταση των βλαβών. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ενδείκνυται και η συμπληρωματική χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων. Γενικά, μακροπρόθεσμες μελέτες παρακολούθησης των αποτελεσμάτων της περιοδοντικής θεραπείας για διάστημα μέχρι 10 χρόνια, υποδεικνύουν ότι η θεραπεία είναι συνήθως πολύ επιτυχής στην εξάλειψη όσο και στην πρόληψη μελλοντικής ενεργοποίησης της νόσου. Ο κίνδυνος απώλειας δοντιών περιορίζεται γενικά σε μικρές ομάδες ασθενών υψηλού κινδύνου, ιδιαίτερα σε άτομα που καπνίζουν και δεν ακολουθούν ικανοποιητικό πρόγραμμα υποστήριξης (Chambrone και συν. 2010).

Ωστόσο, παρά τα θετικά αποτελέσματα, η καταστροφή των περιοδοντικών ιστών σαν αποτέλεσμα της περιοδοντίτιδας θεωρείται μη αντιστρεπτή και κατά συνέπεια η ανάσχεση της πορείας της νόσου δεν ακολουθείται συνήθως από αναγέννηση των χαμένων στηρικτικών ιστών (Caton και Greenstein 1993). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της επιτυχημένης συμβατικής θεραπείας έχουν σημαντικούς περιορισμούς που περιλαμβάνουν ευαισθησία, φτωχή αισθητική, αυξημένη υφίξη των ούλων και περιορισμένη αποτελεσματικότητα στη στήριξη των προσβλημένων δοντιών (Caton και συν. 1976, 1980). Η αναγεννητική θεραπεία αποσκοπεί στη μείωση των αρνητικών επιπτώσεων της εξάλειψης των θυλάκων και στη βελτιωμένη ικανότητα στοματικής υγιεινής από τον ασθενή, αλλά και στην αποκατάσταση του ουλικού περιγράμματος και στη δημιουργία νέας πρόσφυσης που μπορεί να βελτιώσουν την αισθητική, τη στήριξη, αλλά και την παραμονή των δοντιών στο στόμα.

Η περιοδοντική αναγέννηση προϋποθέτει τη δημιουργία νέας οστεΐνης, φατνιακού οστού και λειτουργικά προσανατολισμένου περιρριζίου που εισέρχεται στους αναγεννημένους ιστούς (Polimeri και συν. 2008). Έτσι, η «χρυσή σταθερά» για την επιβεβαίωση της επιτυχημένης περιοδοντικής αναγέννησης είναι η ιστολογική εξέταση (Sculean και συν. 2008). Ωστόσο, επειδή για λόγους ηθικής, η ιστολογική εκτίμηση είναι αδύνατη σε ανθρώπινες κλινικές μελέτες, τα αναγεννητικά αποτελέσματα εκτιμώνται με εναλλακτικές κλινικές παραμέτρους που περιλαμβάνουν το κέρδος της κλινικής πρόσφυσης και την ακτινογραφική καταμέτρηση της οστικής απόθεσης σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της συμβατικής ανοιχτής χειρουργικής απόξεσης (OFD) (Camargo και συν. 2000, 2001, Lekovic και συν. 2001, Tonetti και συν. 2004, Vouros και συν. 2004, Belal και συν. 2005, Camargo και συν. 2005, Liñares και συν. 2006, Sculean και συν. 2007, 2008).

Τα διαδοχικά στάδια της επούλωσης των ιστών περιλαμβάνουν την αρχική φλεγμονώδη αντίδραση και το σχηματισμό του αιματικού θρόμβου, τη μετανάστευση των προγονικών κυττάρων στο τραύμα, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων που οδηγεί σε ώριμα κύτταρα και την εναπόθεση και οργάνωση των νεόπλαστων ιστών. Οι προσπάθειες ελέγχου αυτών των βιολογικών παραμέτρων έχουν δείξει μόνο περιορισμένη επιτυχία μέχρι σήμερα, εν μέρει λόγω της έλλειψης γνώ-

## Rationale of periodontal regeneration

Conventional periodontal treatment involves the successful management of oral biofilms, first by patient-performed plaque control measures and second by professional removal of deposits and plaque retentive factors. Therapy may also require surgical interventions, both to facilitate removal of deposits and to carry out surgical defect correction. In addition, on some occasions the use of adjunctive antimicrobial agents may also be indicated. In general, long-term follow-up studies of the outcomes of periodontal therapy for periods of up to 10 years indicate that treatment is usually very successful in both eliminating disease and preventing future disease activity. The risk of tooth loss is largely confined to small proportions of high-risk patients, particularly smokers and individuals not following adequate periodontal maintenance programs (Chambrone et al. 2010).

However, despite the favorable outcomes, destruction of periodontal tissues as a result of periodontitis is considered irreversible, and thus resolution of the disease process is not usually followed by regeneration of the lost supporting tissues (Caton and Greenstein 1993). In addition, the outcomes of successful conventional therapy have significant limitations including tooth sensitivity, poor esthetics, increased gingival recession, and very limited effects on the structural support of the affected teeth (Caton et al. 1976, 1980). Regenerative periodontal therapy aims at reducing the side effects of pocket elimination procedures and providing an improved ability for proper oral hygiene by the patient, together with the restoration of gingival contour and generation of new attachment, which may improve esthetics, tooth support, and preservation of teeth in the mouth.

Periodontal regeneration requires the formation of new cementum, crestal alveolar bone, and functionally orientated periodontal ligament (PDL) that inserts into these regenerated tissues (Polimeri et al. 2006). Thus, the “gold standard” for demonstration of successful periodontal regeneration is histological evaluation (Sculean et al. 2008). However, because histological assessment is impossible for ethical reasons in human clinical studies, regenerative outcomes are typically assessed by surrogate clinical parameters, including gain of clinical attachment or radiographic measurement of bone growth when compared with outcomes achieved by conventional open flap debridement (OFD) surgery (Camargo et al. 2000, 2001, Lekovic et al. 2001, Tonetti et al. 2004, Vouros et al. 2004, Belal et al. 2005, Camargo et al. 2005, Liñares et al. 2006, Sculean et al. 2007, 2008).

The sequential steps of tissue healing include an initial inflammatory response and clot formation, migration of the progenitor cells into the wound, proliferation of the progenitor cells, differentiation of cells to give rise to mature cells, and deposition with organization of new tissues. Attempts to manipulate these biological parameters have shown only limited success to date, partly because of the lack of knowledge

σεων πάνω στους βασικούς μοριακούς μηχανισμούς επούλωσης των περιοδοντικών ιστών, αλλά και λόγω της περίπλοκης ανατομικής διάταξης του οστού, του περιριζίου και των δοντιών, μαζί με τις εγγενείς επιπλοκές της επούλωσης που οφείλονται στο ιδίομορφο περιοδοντικό περιβάλλον.

Οι περιορισμοί από το τοπικό περιβάλλον που επηρεάζουν την επούλωση του περιοδοντίου περιλαμβάνουν (1) την επικοινωνία με τη στοματική κοιλότητα και την πιθανότητα βακτηριακής επιμόλυνσης, (2) το φυσικό περιβάλλον: διακυμάνσεις του pH και της θερμοκρασίας, παρουσία συγκλεισιακών δυνάμεων και φυσιολογικές κινήσεις των δοντιών, (3) τα πολλά κύτταρα που αλληλοεπιδρούν: επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του συνδετικού ιστού πρέπει να συνεργαστούν συντονισμένα για την αποκατάσταση της πρόσφυσης και (4) την εκτεταμένη καταστροφή της μεσοκυττάριας ουσίας που παρατηρείται στην περιοδοντίτιδα και επηρεάζει έντονα τη διαδικασία επούλωσης (McCulloch και συν. 1993).

Το αποτέλεσμα της επούλωσης εξαρτάται από τη φύση των ανώριμων κυττάρων που μεταναστεύουν στη βλάβη (Melcher και συν. 1976) και τα σήματα που ελέγχουν τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία τους (McCulloch και Narayanan 1994, Pitaru και συν. 1994). Η προέλευση των προγονικών κυττάρων από το περιριζίο έχει μεγάλη σημασία για την κατανόηση των διαδικασιών της περιοδοντικής επούλωσης. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, δεν προκαλεί έκπληξη ότι οι διάφορες χειρουργικές προσεγγίσεις και η χημική επεξεργασία της ρίζας οδήγησαν σε ελάχιστη περιοδοντική αναγέννηση (Caton και συν. 1980).

### Σύγχρονες τεχνικές περιοδοντικής αναγέννησης

Για πολλά χρόνια, μια μεγάλη πρόκληση για την περιοδοντική θεραπεία ήταν η επινόηση και εφαρμογή κλινικά επιτυχημένων μεθόδων περιοδοντικής αναγέννησης. Μέχρι στιγμής, η πλήρης αναγέννηση των κατεστραμμένων περιοδοντικών ιστών δεν έχει επιτευχθεί στον άνθρωπο. Τα τελευταία 20 περίπου χρόνια, έχουν εμφανιστεί διάφορες κλινικές τεχνικές που επιτρέπουν τη μερική αναγέννηση των περιοδοντικών ιστών σε συγκεκριμένα περιστατικά. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση αφοριστικών μεμβρανών για κατευθυνόμενη ιστική αναγέννηση (KIA), τη χρήση μοσχευμάτων όπως τα οστικά αυτομοσχεύματα, τα αλλομοσχεύματα, τα ετερομοσχεύματα και τα συνθετικά υλικά, καθώς και την εφαρμογή βιολογικά δραστικών υλικών όπως οι πρωτεΐνες της αδαμαντινικής θεμέλιας ουσίας. Όλες αυτές οι αναγεννητικές τεχνικές ενδείκνυνται σε ενδοστικές βλάβες 2- και 3-τοιχωμάτων ή μεσορριζικές βλάβες κατηγορίας II και επομένως η εφαρμογή τους παραμένει σχετικά περιορισμένη.

#### Κατευθυνόμενη ιστική αναγέννηση

Στην KIA, η εφαρμογή αφοριστικών μεμβρανών για τον αποκλεισμό των επιφανειακών ουλικών ιστών από το χειρουργικό πεδίο και η δημιουργία χώρου επιτρέπουν την επαναποίκιση της βλάβης από κύτταρα του περιριζίου και του οστού. Οι πρώτες μελέτες της KIA παρείχαν ιστολογική τεκμηρίωση σημαντικής περιοδοντικής αναγέννησης σε ανθρώπινες μελέτες και μελέτες με ζώα. Οι Nyman και συνεργάτες (Nyman και συν. 1982a, 1982b) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν το σχηματισμό νέας πρόσφυσης με τη χρήση μεμβράνης που παρεμπόδιζε τα κύτταρα του επιθηλίου και του συνδετικού ιστού να διεισδύσουν και να αποικίσουν την περιοχή της βλάβης.

Η ανάπτυξη της KIA βασίστηκε αρχικά στην ιδέα ότι μόνο

of the basic mechanisms of molecular periodontal wound healing and also because of the complex anatomical arrangement of bone, PDL, and teeth, along with complications of tissue healing inherent to the distinct periodontal environment.

Limitations of the local environment that affect periodontal wound healing include (1) communication with the oral cavity and the potential for bacterial contamination; (2) physical environment: variations in pH and temperature, the presence of occlusal loading, and physiological movement of teeth; (3) multiple interacting cells: epithelial and various connective tissue cells must work in concert to reestablish the periodontal attachment apparatus; and (4) the extensive destruction of the extracellular matrix that occurs in periodontitis severely affects the healing process (McCulloch et al. 1993).

The outcome of wound healing depends on the nature of the immature cells that migrate into the defect (Melcher et al. 1976) and the signals that control their differentiation and function (McCulloch and Narayanan 1994, Pitaru et al. 1994). The source of the progenitor cells within the PDL is of considerable importance in understanding the events that occur during periodontal wound healing. Given all of the preceding, it is not surprising that various surgical procedures and root surface conditioning have resulted in minimal periodontal regeneration (Caton et al. 1980).

### Current periodontal regenerative techniques

For many years, a major challenge for periodontal therapy has been the conception and application of clinically successful methods for periodontal regeneration. Thus far, complete regeneration of the damaged periodontal supporting tissues has not been achieved in humans. Over the past 20 years or so, different clinical techniques have emerged that allow partial regeneration of the periodontal tissues in specific cases, including the use of barrier membranes for guided tissue regeneration (GTR); the use of graft materials, including autologous bone grafts, allografts, xenografts, and alloplastic materials; and the application of biologically active materials such as enamel matrix proteins. All these regenerative procedures are mainly indicated for two- or three-wall intrabony defects or class II furcation defects, and thus their application remains relatively limited.

#### Guided tissue regeneration

In GTR, the application of barrier membranes for the exclusion of the superficial gingival tissues from the surgical wound and the creation of space, allow wound repopulation by cells of the PDL and bone. Early GTR studies provided histological evidence of significant periodontal regeneration in both human and animal studies. Nyman and colleagues (Nyman et al. 1982a, 1982b) were the first to report the formation of new attachment by means of using a membrane to prevent gingival epithelium and connective tissue cells from invading and populating the defect.

The development of GTR was initially based on

τα κύτταρα του περιρριζίου έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν νέα πρόσφυση συνδετικού ιστού (Melcher 1976, Gottlow και συν. 1984). Η ερμηνεία αυτή μπορεί να είναι ουσιαστικά μία υπεραπλούστευση, καθώς είναι γνωστό ότι τα αρχέγονα κύτταρα στο χώρο του περιρριζίου μπορεί να προέρχονται από τον παρακείμενο μυελό των οστών και ουσιαστικά η χρήση των μεμβρανών της ΚΙΑ δεν αποκλείει τα κύτταρα που προέρχονται από το παρακείμενο στην περιοχή της επούλωσης οστό. Ωστόσο, τα κλινικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο αποκλεισμός των επιφανειακών κυττάρων των ούλων ευνοεί την περιοδοντική αναγέννηση. Η ΚΙΑ έχει αξιολογηθεί σε πολλές κλινικές μελέτες και τα αποτελέσματα φαίνεται να εξαρτώνται γενικά από μια σειρά παραγόντων που περιλαμβάνουν τη χειρουργική τεχνική, την αποκάλυψη της μεμβράνης κατά τη διάρκεια της επούλωσης, την ανατομία της βλάβης, το κάπνισμα και τον έλεγχο των βιοϋμένων της πλάκας. Τα κλινικά αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα σε διάφορους ασθενείς και στις διάφορες μελέτες. Ωστόσο, η συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων μελετών (RCTs) υποδηλώνει ότι το όφελος από την ΚΙΑ είναι σχετικά μικρό, με συνολικό κέρδος κλινικής πρόσφυσης μικρότερη από 2 mm συγκριτικά με την OFD (Needleman και συν. 2005). Η αποτελεσματικότητα διαφόρων απορροφήσιμων και μη απορροφήσιμων μεμβρανών στην ΚΙΑ έχει διερευνηθεί ευρέως, αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις για στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των μεμβρανών (Stavropoulos και συν. 2004).

### Μοσχευματικά υλικά

Τα αυτόλογα οστικά μοσχεύματα χρησιμοποιήθηκαν στην περιοδοντική αναγέννηση, αλλά η νοσηρότητα που συνδέεται με τη συλλογή τους έχει περιορίσει σημαντικά την εφαρμογή τους. Επίσης, έχουν αξιολογηθεί αρκετά μοσχευματικά υλικά που περιλαμβάνουν το αφαλατωμένο λυοφιλοποιημένο οστικό αλλομόσχευμα (DFDBA), το αποπρωτεϊνωμένο βόειο οστικό μόσχευμα (DBBM) και συνθετικά αλλοπλαστικά υλικά όπως ο υδροξυαπατίτης, το β-τριφωσφορικό ασβέστιο και τα υαλομοσχεύματα (Harris 1999, Reynolds και συν. 2003, Aspriello και συν. 2010).

Μολονότι τα αυτόλογα μοσχεύματα περιέχουν οστεογενετικά κύτταρα και αυξητικούς παράγοντες και το DFDBA μπορεί επίσης να περιέχει αυξητικούς παράγοντες, τα αλλοπλαστικά υλικά λειτουργούν κυρίως σαν ικρίωμα και προάγουν την αποίκιση της περιοδοντικής βλάβης από κατάλληλα προγονικά κύτταρα. Αν και τα κλινικά αποτελέσματα των διαφόρων μοσχευμάτων είναι ανώτερα σε σύγκριση με την OFD, η ιστολογική εκτίμηση δείχνει συχνά στοιχεία μερικής αναγέννησης καθώς και μακροχρόνια παραμονή του μοσχεύματος που περιχαράκωνεται από πυκνό ινώδη ιστό (Sculean και συν. 2008, Stavropoulos και συν. 2010). Τα συνολικά αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν με την εφαρμογή της ΚΙΑ (Aichelmann-Reidy και Yukna, 1998, Parashis και συν. 2004).

### Βιοενεργά υλικά

Μια σειρά από βιοενεργά υλικά έχουν ήδη προταθεί και δοκιμαστεί για χρήση σε αναγεννητικές τεχνικές. Η βιολογική αρχή αυτής της προσέγγισης είναι η εφαρμογή παραγόντων που μπορεί να ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των προγονικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της επούλωσης των ιστών προς το σχηματισμό νέου οστού, οστεΐνης και περιρριζίου. Το

the concept that only PDL cells have the potential to create new connective tissue attachment (Melcher 1976, Gottlow et al. 1984). This interpretation may actually be an oversimplification, as it is known that the source of progenitor cells within the PDL may arise from the adjacent alveolar bone marrow stroma, and in fact the use of GTR barrier membranes does not exclude cells derived from the adjacent bone from the healing wound. However, the clinical results suggest that the exclusion of superficial gingival cells favors periodontal regeneration. GTR has been evaluated in numerous clinical studies and overall outcomes appear to be dependent on a range of factors, including surgical technique, membrane exposure during healing, defect anatomy, smoking, and plaque biofilm control. Clinical outcomes may vary extensively in different patients and between different studies. However, systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials (RCTs) of GTR suggest that the benefit of GTR is relatively modest, resulting in an overall increased gain of clinical attachment level of less than 2 mm when compared with OFD procedures (Needleman et al. 2005). The efficacy of various nonresorbable and resorbable membranes in GTR has been widely investigated but there is no evidence of statistically significant differences in outcomes between various membranes (Stavropoulos et al. 2004).

### Graft materials

Autogenous bone grafts have been successfully used for periodontal regeneration but the morbidity associated with harvesting of the graft has significantly limited their application. Several grafting materials have been evaluated, including demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA), deproteinized bovine bone mineral (DBBM), and synthetic alloplastic materials such as hydroxyapatite, β-tricalcium phosphate, and bioactive glass (Harris 1999, Reynolds et al. 2003, Aspriello et al. 2010).

Although autogenous bone contains both osteogenic cells and growth factors, and DFDBA may also contain growth factors, alloplastic materials seem to mainly act as a scaffold to promote repopulation of the periodontal defect by appropriate progenitor cells. While clinical outcomes of various grafts are superior to those of OFD procedures, histological evaluation often shows evidence of partial regeneration together with long-term persistence of graft material encapsulated by dense fibrous tissue (Sculean et al. 2008, Stavropoulos et al. 2010). Overall outcomes of these studies are similar to those seen with GTR procedures (Aichelmann-Reidy and Yukna 1998, Parashis et al. 2004).

### Bioactive materials

A range of bioactive materials has also been proposed and tested for use in regenerative techniques. The biological rationale of this approach is the application of factors that may regulate differentiation and function of progenitor cells during tissue healing toward the formation of new bone, cementum, and PDL.

παράγωγο της αδαμαντινικής θεμέλιας ουσίας (EMD) είναι το πιο διαδεδομένο και δοκιμασμένο υλικό σε αυτήν την κατηγορία. Το EMD είναι πλούσιο σε χοίρειες αμελογενίνες που πιστεύεται ότι αποτελούν το βιολογικά ενεργό συστατικό του προϊόντος. Το EMD ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών *in vitro* και ρυθμίζει την παραγωγή μιας σειράς αυξητικών παραγόντων σε διάφορους τύπους κυττάρων. Οι βιολογικές δράσεις του EMD έχουν ανασκοπηθεί διεξοδικά από τον Bosshardt (2008). Κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει επανειλημμένα ότι η χρήση του EMD σε ενδοστικές βλάβες βελτιώνει τις κλινικές παραμέτρους, ενώ η περιοδοντική αναγέννηση έχει επιβεβαιωθεί από ιστολογικές μελέτες. Μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση της εφαρμογής EMD σε RCTs έδειξε παρόμοια συνολικά αποτελέσματα με εκείνα που έχουν αναφερθεί για την KIA (Esposito και συν. 2009).

Επιπλέον, το Pep-Gen P15 και το αιμοπεταλιακό πλάσμα (PRP) είναι άλλα δύο βιοενεργά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Το Pep-Gen P15 είναι ένα συνθετικό πεπτίδιο που έχει ομολογία με πεπτιδικά θραύσματα κολλαγόνου τύπου I. Στη μοναδική RCT που διερεύνησε τη χρήση του, το υλικό έδειξε κάποια θετικά αποτελέσματα περιοδοντικής αναγέννησης (Yukna και συν. 2000). Το PRP προέρχεται από προετοιμασία με φυγοκέντρηση του αίματος του ασθενούς και είναι πλούσιο σε μια σειρά αυξητικών παραγόντων όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) και ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β). Το PRP έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα για την οστική αναγέννηση στην εμφυτευματολογία, αλλά δεν υπάρχουν πειστικά στοιχεία για τη χρήση του σε επεμβάσεις περιοδοντικής αναγέννησης (Dori και συν. 2008).

Πιο πρόσφατα, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην πιθανή εφαρμογή ανασυνδυασμένων αυξητικών παραγόντων όπως οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs), ο PDGF και ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας-2 (FGF-2) που δρουν σαν βιολογικοί μεσολαβητές της περιοδοντικής αναγέννησης. Η δυναμική εφαρμογή των αυξητικών παραγόντων στην περιοδοντική αναγέννηση θα παρουσιαστεί παρακάτω.

### **Συνδυαστική αναγεννητική θεραπεία έναντι OFD**

Τουλάχιστον εννέα RCTs έχουν συγκρίνει την αποτελεσματικότητα διάφορων συνδυαστικών αναγεννητικών τεχνικών (πειραματική ομάδα) σε σχέση με την OFD μόνο (ομάδα ελέγχου) στην αντιμετώπιση περιοδοντικών ενδοστικών βλαβών (Camargo και συν. 2000, 2001, 2005, Lekovic και συν. 2001, Tonetti και συν. 2004, Vouros και συν. 2004, Liñares και συν. 2006, Sculean και συν. 2007, 2008b) και μεσοριζικών βλαβών κατηγορίας II (Belal και συν. 2005).

Όλες οι μελέτες έδειξαν ότι η συνδυαστική θεραπεία της KIA με το DBBM οδήγησε σε σημαντικά καλύτερα κλινικά ή ακτινογραφικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την OFD μόνο (Camargo και συν. 2000, 2005, Tonetti και συν. 2004, Vouros και συν. 2004, Liñares και συν. 2006, Sculean και συν. 2007). Ωστόσο, καμία από τις μελέτες δεν είχε σκέλη ελέγχου με KIA ή DBBM μόνο.

Η συνδυαστική θεραπεία με EMD και KIA δεν παρείχε επιπρόσθετη βελτίωση σε σύγκριση με το EMD ή την KIA μόνο (Sculean και συν. 2007, 2008b). Μια άλλη RCT (Camargo και συν. 2001) αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού EMD και DBBM για την αντιμετώπιση ενδοστικών βλαβών. Η συνδυαστική εφαρμογή EMD και DBBM σε ενδοστικές

Enamel matrix derivative (EMD) is the most widely used and tested material in this category. EMD is rich in porcine amelogenins which are thought to be the biologically active component of the product. EMD stimulates osteoblast differentiation and proliferation *in vitro* and regulates the production of a range of growth factors in various cell types. The biological activities of EMD have been comprehensively reviewed by Bosshardt (2008). Clinical trials have repeatedly proved that EMD application to intrabony defects significantly improves periodontal parameters while periodontal regeneration has been verified by histological studies. A recent systematic review of RCTs on EMD application demonstrated overall similar clinical outcomes to those reported for GTR (Esposito et al. 2009).

In addition, Pep-Gen P15 and platelet-rich plasma (PRP) are two other bioactive materials that have been applied in the clinical practice. Pep-Gen P15 is a synthetic peptide that has homology with collagen type I peptide fragments. In the single RCT that tested its use, the material showed some positive effects on periodontal regeneration (Yukna et al. 2000). PRP is an autologous preparation from centrifugation of a patient's blood and contains a number of growth factors, including platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor-beta (TGF-β). PRP has been used in particular for bone augmentation in implantology, but there is no convincing evidence for its use in periodontal regeneration procedures (Dori et al. 2008).

More recently, interest has been aroused in the possible application of recombinant growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMPs), PDGF, and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) which act as biological mediators of periodontal regeneration. The potential application of growth factors for periodontal regeneration is considered further below.

### **Combined regenerative therapy versus OFD**

At least nine RCTs have compared the efficacy of different combined regenerative therapies (test group) versus OFD alone (control group) for the treatment of periodontal intrabony defects (Camargo et al. 2000, 2001, 2005, Lekovic et al. 2001, Tonetti et al. 2004, Vouros et al. 2004, Liñares et al. 2006, Sculean et al. 2007, 2008b) and class II furcation defects (Belal et al. 2005).

All studies showed that the combined therapy of GTR plus DBBM resulted in significantly better clinical or radiographic outcomes compared with OFD alone (Camargo et al. 2000, 2005, Tonetti et al. 2004, Vouros et al. 2004, Liñares et al. 2006, Sculean et al. 2007). However, none of the studies had control arms of GTR or DBBM alone.

The combined treatment of EMD plus GTR did not provide additional improvement compared with EMD or GTR alone (Sculean et al. 2007, 2008b). Another RCT (Camargo et al. 2001) assessed the efficacy of EMD plus DBBM for the treatment of intrabony defects. The combined application of EMD and DBBM

βλάβες οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε σχέση με την OFD μόνο. Ωστόσο, η έλλειψη σκελών ελέγχου μόνο με EMD ή DBBM αμφισβητεί την αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπευτικής προσέγγισης. Συμπερασματικά, παραμένει αβέβαιο αν η συνδυαστική θεραπεία είχε κάποιο επιπρόσθετο όφελος σε σχέση με το EMD, την ΚΙΑ ή το DBBM μόνο.

Πέρα από τα κλινικά αποτελέσματα των συνδυαστικών αναγεννητικών μεθόδων, ιστολογικά στοιχεία έχουν επιβεβαιώσει την επούλωση με περιοδοντική αναγέννηση μετά από θεραπεία με την ταυτόχρονη χρήση μεμβρανών και μοσχευματικών υλικών, κυρίως με τη μορφή οστικής απόθεσης (Deliberador και συν. 2006). Κανένα επιπρόσθετο όφελος δε φαίνεται να εντοπίζεται με την εφαρμογή συνδυαστικών τεχνικών σε ενδοοστικές βλάβες τριών οστικών τοιχωμάτων, μεσορριζικές βλάβες κατηγορίας II ή οστικές οπές (Tal και συν. 2005, Sculean και συν. 2008a).

Συνοπτικά, οι υπάρχουσες μέθοδοι περιοδοντικής αναγέννησης έχουν αποδείξει ότι ενισχύουν την αναγέννηση του οστού, της οστέινης και του περιρριζίου σε σύγκριση με την εφαρμογή OFD μόνο. Ωστόσο, η θεραπεία με αυτές τις συνδυαστικές προσεγγίσεις περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό σε καλά περιγεγραμμένες οστικές βλάβες και φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική ποικιλοπλοία στα κλινικά αποτελέσματα. Απροσδόκητα, δεν υπάρχει ικανοποιητική τεκμηρίωση που υποστηρίζει την υπεροχή των συνδυαστικών θεραπειών σε σχέση με τη μεμονωμένη χρήση μοσχευμάτων (Trombelli και Farina 2008).

Η σχετικά μέτρια αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπειών δεν επιτρέπει την πλήρη αποκατάσταση των χαμένων περιοδοντικών ιστών και έτσι η εντατική έρευνα έχει στραφεί στην ανάπτυξη πρωτοποριακών μεθόδων για τη βελτίωση των αναγεννητικών αποτελεσμάτων. Οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην κατανόηση της φύσης και συμπεριφοράς των κυττάρων του περιρριζίου, στη ρύθμισή τους από αυξητικούς παράγοντες και άλλα μόρια σηματοδότησης, καθώς και στο συντονισμό αυτών των πληροφοριών για να εξεταστεί η πιθανή εφαρμογή μεθόδων ιστικής μηχανικής στην περιοδοντική αναγέννηση. Η ιστική μηχανική είναι ένας σχετικά νέος κλάδος που στοχεύει στην αναγέννηση ιστών και οργάνων από τη συνδυασμένη εφαρμογή κυττάρων, κατάλληλων μορίων σηματοδότησης και πλεγμάτων βιοϋλικών. Για να εκτιμηθεί το δυναμικό της ιστικής μηχανικής στην περιοδοντική αναγέννηση, είναι απαραίτητη η κατανόηση της φύσης των κυττάρων που εμπλέκονται και ο σηματοδοτικός τους έλεγχος.

### Βλαστικά κύτταρα και σχηματισμός οστού

Ένας καθοριστικός παράγοντας για το αναγεννητικό δυναμικό του περιρριζίου είναι η ικανότητα των κυττάρων του για διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες και οστεϊνοβλάστες που οδηγεί στο σχηματισμό νέου οστού και οστέινης. Οι οστεϊνοβλάστες είναι φαινοτυπικά παρόμοιοι ή πανομοιότυποι με τους οστεοβλάστες, υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα και οι διαδικασίες για το σχηματισμό οστέινης είναι ουσιαστικά ίδια με εκείνα που εμπλέκονται στο σχηματισμό οστού. Οι ώριμοι οστεοβλάστες προέρχονται από μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στο στρώμα του μυελού των οστών και άλλων συνδετικών ιστών.

Βλαστικό κύτταρο ονομάζεται ένα αδιαφοροποίητο κύτταρο το οποίο παρουσιάζει απεριόριστη ικανότητα αυτοανανέωσης και μπορεί να δώσει πρόδρομα κύτταρα με ικανότητα διαφορο-

in intrabony defects resulted in statistically significantly more favorable clinical outcomes than OFD alone. However, the lack of control arms of only EMD or DBBM questions the efficacy of the combined therapy. In conclusion, it remains uncertain whether the combined therapy had any additional benefit compared with EMD, GTR, or DBBM alone.

In addition to the clinical outcomes of combined regenerative therapeutic approaches, histologic evidence has demonstrated healing with periodontal regeneration following treatment with the combination of barrier membranes and grafting materials, predominantly in the form of bone repair (Deliberador et al. 2006). No additional benefit of combination treatments seems to be detected in three-wall intrabony, class II furcation or fenestration defects (Tal et al. 2005, Sculean et al. 2008a).

In summary, existing methods for periodontal regeneration have been shown to enhance regeneration of bone, cementum, and PDL compared with treatment with OFD surgery alone. However, treatment with these combined approaches is largely restricted in well-contained bony defects and appears to show considerable variability in clinical outcomes. Surprisingly, there is little evidence to support superiority of the combination therapies over single graft treatment alone (Trombelli and Farina 2008).

The relatively modest efficacy of available treatments do not allow full restoration of the lost periodontal tissues, and thus intensive research has been directed towards the development of novel methods to improve regenerative outcomes. Research efforts aim to understand the nature and behavior of the PDL cells, as well as the regulation of these cells by growth factors and other signaling molecules, and to coordinate this information to consider possible application of tissue engineering methods in periodontal regeneration. Tissue engineering is a relatively new discipline that aims to regenerate organs and tissues by the combined application of cells, appropriate signaling molecules, and biomaterial scaffolds. In order to assess the potential of tissue engineering for periodontal regeneration, it is necessary to understand the nature of the cells involved and their regulatory signals.

### Stem cells and bone formation

A significant determinant of the regenerative potential of the PDL is the unique ability of PDL cells to undergo osteoblast and cementoblast differentiation, resulting in new bone and cementum formation. Cementoblasts are phenotypically similar or identical to osteoblasts, suggesting that the cells and the processes for cementum formation are essentially the same as those engaged in bone formation. Mature osteoblasts are derived from mesenchymal stem cells, which are present in bone marrow stroma and other connective tissues.

A stem cell is defined as an undifferentiated cell that exhibits unlimited self-renewal capacity and the potential to give rise to precursor cells capable of dif-

ποίησης σε κύτταρα ενός ώριμου φαινότυπου (Wolpert 1988). Η μίτωση του βλαστικού κυττάρου δίνει δύο θυγατρικά κύτταρα, ένα που διατηρεί το φαινότυπο του βλαστικού κυττάρου και ένα άλλο που οδηγεί σε δεσμευμένα κύτταρα τα οποία τελικά διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και άλλα κύτταρα μεσεγγυματικού φαινότυπου.

Κλασικά πειράματα από τους Owen και Friedenstein έδειξαν ότι η διασπορά στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών δημιουργεί αποικίες ινοβλαστικών κυττάρων που όταν τοποθετούνται σε θαλάμους διάχυσης και εμφυτεύονται σε αρουραίους μπορούν να οδηγήσουν σε μια σειρά διαφοροποιημένων κυττάρων με φαινότυπους οστεοβλαστών, χονδροβλαστών, λιποκυττάρων και ινοβλαστών (Friedenstein 1976, Friedenstein και συν. 1987, Owen και Friedenstein 1988). Μεταγενέστερα in vitro πειράματα έδειξαν το σχηματισμό μιας σειράς διαφοροποιημένων κυττάρων σε κυτταρικούς πληθυσμούς του στρώματος του μυελού των οστών που μπορεί να ρυθμίζεται με στεροειδείς ορμόνες όπως η δεξαμεθαζόνη (Beresford και συν. 1992, 1994). Έτσι τα ενήλικα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα είναι πολυδύναμα και έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν σε μια σειρά από διαφοροποιημένους κυτταρικούς φαινότυπους που περιλαμβάνουν ινοβλάστες, οστεοβλάστες (και πιθανά οστεϊνοβλάστες), χονδροβλάστες, λιποκύτταρα και μυοβλάστες. Η διαδικασία του περιορισμού των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων σε μια συγκεκριμένη κυτταρική γραμμή είναι γνωστή ως «δέσμευση».

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι διαχωρίζονται με έκφραση διαφορετικών γονιδίων από το ίδιο γονιδίωμα, αν και μόνο λίγες διαφορές στην περιεκτικότητα των πρωτεϊνών διακρίνουν τον ένα κυτταρικό τύπο από τον άλλο. Η έκφραση των περισσότερων γονιδίων ελέγχεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο, αν και ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος είναι επίσης σημαντικός.

Οι μεταγραφικοί έλεγχοι εξαρτώνται από γονιδιακά ελεγχόμενες πρωτεΐνες που συνδέονται με συγκεκριμένες ακολουθίες DNA. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ενεργοποιήσουν (θετικός έλεγχος) ή να απενεργοποιήσουν (αρνητικός έλεγχος) ένα γονίδιο. Τα γονίδια συνήθως ρυθμίζονται από συνδυαστικές θετικές και αρνητικές δράσεις των ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του επικρατούς γονιδίου παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στο δίκτυο ελέγχου με τη ρύθμιση μεγάλων ομάδων γονιδίων. Οι γενετικοί μηχανισμοί που δημιουργούν διαφορετικούς τύπους κυττάρων από ένα αρχικό αδιαφοροποίητο κύτταρο είναι ένα σαφές παράδειγμα της δράσης των επικρατών ρυθμιστικών γονιδίων. Η έκφραση του επικρατούς γονιδίου επάγεται από συγκεκριμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που ελέγχουν τον κυτταρικό τύπο, λειτουργώντας σε συνδυασμούς για τον προσδιορισμό της μεταγραφής πολλών άλλων γονιδίων. Έτσι, ενεργοποιείται και ελέγχεται μια καλά οργανωμένη αλληλουχία έκφρασης γονιδίων που οδηγεί στο σχηματισμό ενός συγκεκριμένου φαινότυπου.

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στον εντοπισμό των μεταγραφικών παραγόντων που λειτουργούν ως κύριοι ενεργοποιητές κατά τη διάρκεια της δέσμευσης των πολυδύναμων κυττάρων σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Τα γονίδια της οικογένειας Myo-D με το βασικό δομικό μοτίβο έλικα-βρόχος-έλικα είναι γνωστά για τον καθορισμό της δέσμευσης και τη διαφοροποίηση μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων σε μυοβλάστες (Weintraub 1993). Παρόμοια, ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR-γ 2 καθορίζει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (Dennis και Charbord

ferentiation to cells of a mature phenotype (Wolpert 1988). Mitosis of a stem cell gives two daughter cells, one retaining the stem cell phenotype and the other giving rise to committed cells that will ultimately differentiate into osteoblasts and other mesenchymal cell phenotypes.

Classic experiments by Owen and Friedenstein showed that dispersed bone marrow stromal cells give rise to colonies of fibroblastic cells which, when placed in diffusion chambers and implanted in rats, can give rise to a range of differentiated cell phenotypes, including osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, and fibroblasts (Friedenstein 1976, Friedenstein et al. 1987, Owen and Friedenstein 1988). Subsequent in vitro experiments have demonstrated the formation of a range of differentiated cell phenotypes in bone marrow stromal cell populations that can be regulated by steroid hormones such as dexamethasone (Beresford et al. 1992, 1994). Thus, adult mesenchymal stem cells are multipotent and have the potential to give rise to a range of several differentiated cell phenotypes, including fibroblasts, osteoblasts (and presumptively cementoblasts), chondroblasts, adipocytes, and myoblasts. The process of a multipotent stem cell becoming restricted to a specific cell lineage is known as “commitment”.

In multicellular organisms, various cell types are differentiated by expressing different genes from the same genome, although only few differences in protein content distinguish one cell type from another. The expression of most genes is controlled predominantly at the transcriptional level, although post-transcriptional controls are also important.

Transcriptional controls depend on gene regulatory proteins that bind to specific DNA sequences. These proteins can help to turn a gene either on (positive control) or off (negative control). Genes usually are regulated by the combinatorial effects on several such positive and negative gene regulatory proteins. Master gene regulatory proteins play a special role in this gene control network by regulating large sets of genes. The genetic mechanisms that create different cell types provided from an initial undifferentiated multipotent cell are a clear example of the action of master regulatory genes. The expression of the master gene is induced by specific master gene regulatory proteins that control the cell type by acting in combinations to determine the transcription of many other genes. Therefore, a well-regulated cascade of expressed genes is initiated and controlled, resulting in a specific phenotype.

Considerable progress has been made in identifying those transcription factors that act as master switches during commitment of multipotent cells to specific lineages. Basic helix-loop-helix structural motif genes of the Myo-D family are known to specify commitment and differentiation of mesenchymal stem cells to the myoblast lineage (Weintraub 1993). Similarly, the transcription factor PPAR-γ 2 can specify adipocyte differentiation (Dennis and Charbord 2002), and

**Πίνακας 1. Αλλαγές στους φαινοτυπικούς δείκτες κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών**

Δείκτης	Πολυδύναμα προγονικά κύτταρα	Δεσμευμένα οστεοπρογονικά κύτταρα	Προ-οστεοβλάστες	Οστεοβλάστες	Επενδυτικά κύτταρα	Οστεοκύτταρα
Κολλαγόνο τύπου I	++	++	++++	++++	+	+
Κολλαγόνο τύπου III, V	++	+	-	-	-	-
Φιμπρονεκτίνη	++	++	++	+	;	;
Τενασίνη	-	-	++	++	;	;
Οστεοκαλσίνη		-	-	++	-	-
Οστεονεκτίνη	-	-	+	+++	;	+
Οστεοποντίνη	-	++	+	++++	-	;
Αλκαλική φωσφατάση	-	-	+++	++++	-	-
PTH-ανταποκρινόμενος	-	-	++	++++	;	++

PTH: παραθυρεοειδής ορμόνη, (+): θετική έκφραση του δείκτη, (-): αρνητική έκφραση του δείκτη, (;): αμφισβητήσιμη έκφραση του δείκτη

**Table 1. Changes in phenotypic markers during osteoblast differentiation**

Marker	Multipotent progenitor cells	Committed osteoprogenitor cells	Preosteoblasts	Osteoblasts	Lining cells	Osteocytes
Collagen type I	++	++	++++	++++	+	+
Collagen type III, V	++	+	-	-	-	-
Fibronectin	++	++	++	+	?	?
Tenascin	-	-	++	++	?	?
Osteocalcin		-	-	++	-	-
Osteonectin	-	-	+	+++	?	+
Osteopontin	-	++	+	++++	-	?
Alkaline phosphatase	-	-	+++	++++	-	-
PTH-responsive	-	-	++	++++	?	++

PTH: parathyroid hormone, (+): positive expression of the marker, (-): negative expression of the marker, (?) questionable expression of the marker

2002) και η έκφραση του Sox-9 απαιτείται για τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων (Sato και συν. 2005).

Μία σημαντική εξέλιξη στην κατανόηση της γενετικής ρύθμισης της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών έγινε με τον προσδιορισμό του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα Runx-2 (παλιότερα γνωστός σαν παράγοντας κεντρικής σύνδεσης Cbfa-1) (Ducy και συν. 1997). Η έκφραση του Runx-2 είναι απόλυτη προϋπόθεση για τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Τα ποντίκια με απενεργοποιημένο τον παράγοντα Runx-2 χαρακτηρίζονται από κανονικό χόνδρινο σκελετό αλλά απουσία σχηματισμού οστού (και δοντιών). Είναι γνωστό ότι ο παράγοντας Runx-2 αλληλεπιδρά άμεσα με τον ενεργοποιητή της οστεοκαλσίνης για πρόκληση της έκφρασής της (Ducy και συν. 1997). Ωστόσο, ο Osterix, ένας ακόμη μεταγραφικός παράγοντας που δρα ανταγωνιστικά στον Runx-2, αποδείχθηκε ότι αποτελεί επίσης απόλυτη προϋπόθεση για την κανονική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια (Nakashima και συν. 2002).

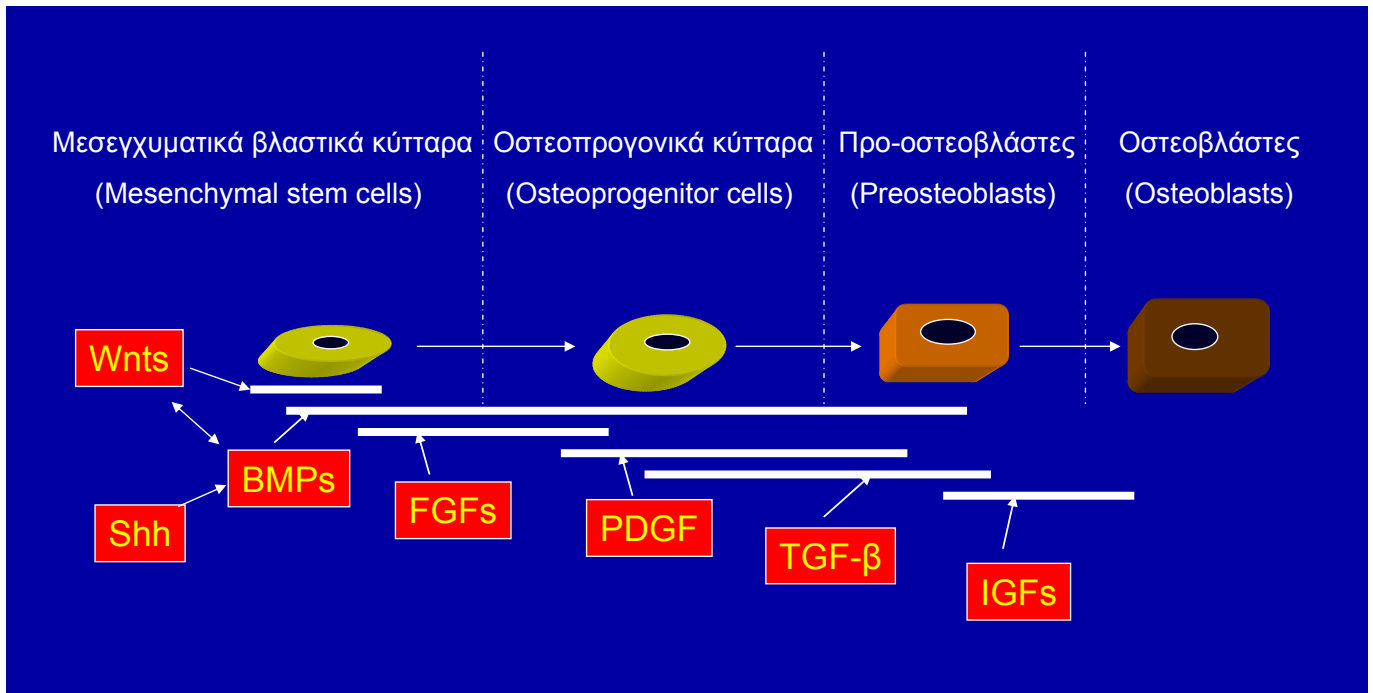
Η έκφραση του Runx-2 εμφανίζεται αρκετά όψιμα στα στάδια

Sox-9 expression is required for chondrocyte differentiation (Sato et al. 2005).

A major breakthrough in the understanding of genetic regulation of osteoblast differentiation was made with the identification of the role of the transcription factor Runx-2 (previously known as core binding factor 1, Cbfa-1) (Ducy et al. 1997). Runx-2 expression is an absolute requirement for osteoblast differentiation. Runx-2 knockout mice are characterized by normal cartilaginous skeleton but complete absence of bone (and tooth) formation. Runx-2 is known to interact directly with the osteocalcin promoter to induce its expression (Ducy et al. 1997). However, an additional transcription factor, Osterix, which is a downstream target for Runx-2, has also been shown to be an absolute requirement for normal osteoblast differentiation in knockout mice experiments (Nakashima et al. 2002).

The expression of Runx-2 occurs quite late in the





**Εικόνα 1:** Ρύθμιση της διαφοροποίησης της οστεοβλαστικής σειράς από αυξητικούς παράγοντες. BMPs: οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες, FGFs: ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες, IGFs: ινσουλινοικοί αυξητικοί παράγοντες, PDGF: αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, Shh: σηματοδοτικός παράγοντας, TGF-β: τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β, Wnts: σηματοδοτικό δίκτυο πρωτεϊνών (από Hughes και συν. 2006).

**Figure 1:** Regulation of the osteoblast lineage differentiation by growth factors. BMPs: bone morphogenetic proteins, FGFs: fibroblast growth factors, IGFs: insulin-like growth factors, PDGF: platelet-derived growth factor, Shh: sonic hedgehog homolog, TGF-β: transforming growth factor-β, Wnts: signaling protein network (from Hughes et al. 2006).

διαφοροποίησης της οστεοβλαστικής σειράς και πιθανότατα δεν καθορίζει την οστεοβλαστική δέσμευση σε πληθυσμούς πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων. Πιο πρόσφατα, έχει παρουσιαστεί ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα TAZ που φαίνεται ότι δρα με τον καθορισμό της οστεοβλαστικής κατεύθυνσης σε διδύναμους βλαστικούς κυτταρικούς πληθυσμούς οστεοβλαστών/λιποκυττάρων με την ενεργοποίηση του Runx-2 και την ταυτόχρονη καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα των λιποκυττάρων PPAR-γ 2 (Hong και συν. 2005). Πειραματική υπερέκφραση του TAZ σε αρχέγονα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα φαίνεται να καθοδηγεί επιλεκτικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση.

Τα κύτταρα με δέσμευση που περιορίζεται στην οστεοβλαστική σειρά ονομάζονται οστεοπρογονικά κύτταρα. Αυτά τα δεσμευμένα κύτταρα υφίστανται μια σειρά από κυτταρικές διαιρέσεις κατά τη διαφοροποίηση (Εικόνα 1) και εκφράζουν σταδιακά μια σειρά από οστεοβλαστικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 1).

### Κύτταρα του περιριζίου

Τα ώριμα κύτταρα του περιριζίου περιλαμβάνουν ινοβλάστες, οστεοβλάστες και οστεϊνοβλάστες μαζί με άλλους τύπους κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα. Μελέτες των κυττάρων του περιριζίου υποδεικνύουν ότι ο ιστός αυτός είναι ασυνήθιστα πλούσιος σε πληθυσμούς προγονικών και βλαστικών κυττάρων συγκριτικά με άλλους ινώδεις συνδετικούς ιστούς που περιλαμβάνουν και το συνδετικό ιστό των ούλων.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα περιριζικά κύτταρα που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν *in vitro* επιδεικνύουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε οστεοβλάστες ή οστεϊνοβλάστες, εκφράζουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με το οστό, ανταποκρίνονται σε οστεοτροπικούς αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες και

osteoblast lineage differentiation and probably does not specify osteoblastic commitment events in multipotent stem cell populations. More recently, the role of the transcription factor TAZ was reported, which appears to act by specifying osteoblastic cell fate in bipotent osteoblast/adipocyte stem cell populations by activating Runx-2 while simultaneously repressing the adipocyte transcription factor PPAR-γ 2 (Hong et al. 2005). Experimental overexpression of TAZ in primary mesenchymal stem cells appears to preferentially specify osteoblastic differentiation.

Cells with restricted commitment to the osteoblast lineage are defined as osteoprogenitor cells. These committed cells undergo a series of cell divisions during differentiation (Figure 1) and increasingly express a range of osteoblastic features (Table 1).

### PDL cells

Mature PDL cells mainly include fibroblasts, osteoblasts, and cementoblasts, together with other cell types such as endothelial and epithelial cells. Studies of PDL cells suggest that this tissue is unusually rich in progenitor and stem cell populations when compared with many other fibrous connective tissues, including the gingival connective tissue.

Several studies have demonstrated that PDL cells isolated and cultured *in vitro* exhibit the capacity to undergo osteoblastic or cementoblastic differentiation, express bone-associated proteins, respond to osteotropic growth factors and hormones, and produce miner-

**Πίνακας 2. Δραστηριότητες αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών**

Αυξητικός παράγοντας	Κύτταρα στόχοι	Δραστηριότητες
Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs)	Βλαστικά κύτταρα Οστεοπρογονικά κύτταρα	Δέσμευση βλαστικών κυττάρων στην οστεοβλαστική σειρά Διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων
wnts	Βλαστικά κύτταρα (?)	Δέσμευση βλαστικών κυττάρων στην οστεοβλαστική σειρά (?)
Ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες (FGFs)	Ανώριμα οστεοπρογονικά κύτταρα	Πολλαπλασιασμός Δέσμευση σε τελικό στάδιο της διαφοροποίησης
Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF)	Προγονικά κύτταρα	Πολλαπλασιασμός (νεοαγγειογέννηση)
Τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β)	Προ-οστεοβλάστες Ωριμοί οστεοβλάστες	Σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας
Ινσουλινικοί αυξητικοί παράγοντες (IGFs)	Προ-οστεοβλάστες	Τελικό στάδιο διαφοροποίησης

**Table 2. Activities of growth factors involved in osteoblast differentiation**

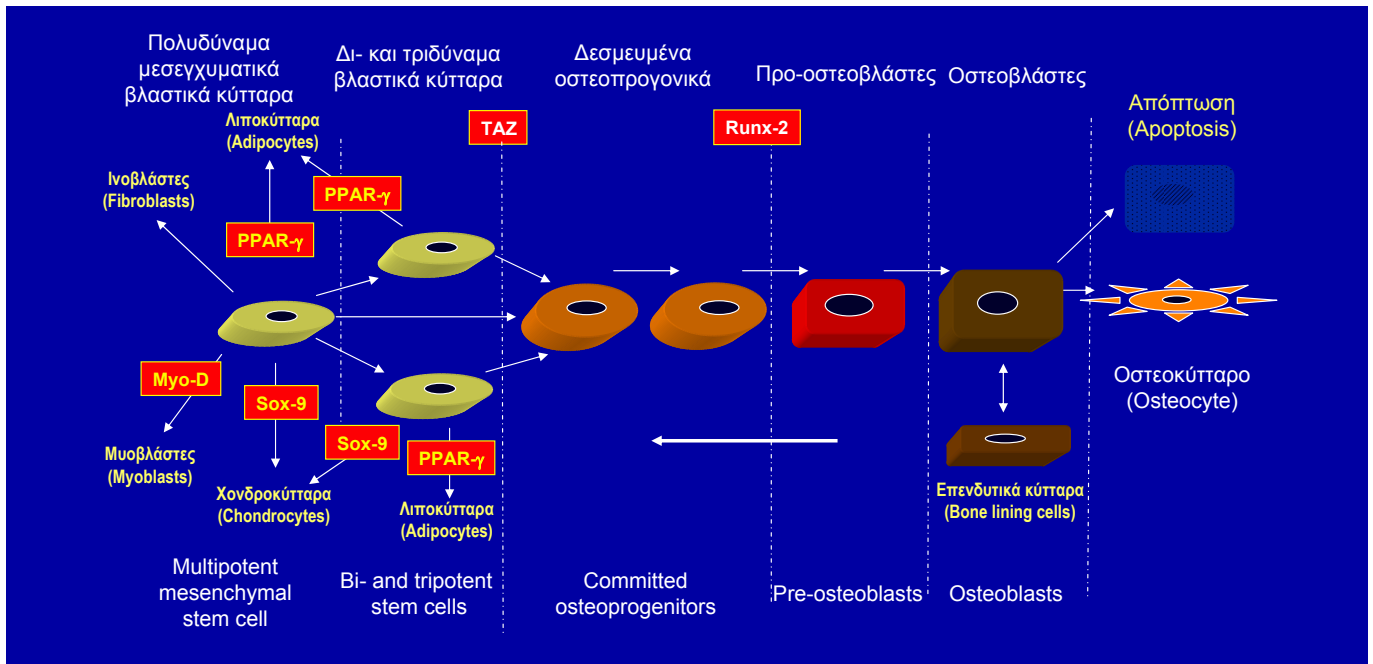
Growth factor	Target cells	Activities
Bone morphogenetic proteins (BMPs)	Stem cells Osteoprogenitor cells	Stem cell commitment to osteoblast lineage Progenitor cell differentiation
wnts	Stem cells (?)	Stem cell commitment to osteoblast lineage (?)
Fibroblast growth factors (FGFs)	Early osteoprogenitor cells	Proliferation Inhibition of terminal differentiation
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Progenitor cells	Proliferation (neovascularization)
Transforming growth factor-β (TGF-β)	Preosteoblasts Mature osteoblasts	Synthesis of extracellular matrix
Insulin-like growth factors (IGFs)	Preosteoblasts	Terminal differentiation

παράγουν εναλατωμένα οστικά οζίδια *in vitro* (Arceo και συν. 1991, Kobayashi και συν. 1999). Παρόλο που τα περιρριζικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια είναι ένα υποσύνολο των κυττάρων του περιρριζίου *in vivo*, μελέτες υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα που απομονώνονται *in vitro* είναι αντιπροσωπευτικά των κυττάρων του περιρριζίου (Lekic και συν. 2001). Πιο πρόσφατα οι Seo και συν. (2004) έδειξαν ότι το περιρριζίο περιέχει ένα πραγματικό πληθυσμό μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων τα οποία μπορούν να απομονωθούν από την έκφραση βλαστικών κυτταρικών δεικτών όπως οι Stro-1 και CD146. Αυτά τα περιρριζικά βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν δυνατότητες διαφοροποίησης και αυτοανανέωσης *in vitro* και μπορούν να συμβάλλουν στο σχηματισμό διαφόρων συνδετικών ιστών που περιλαμβάνουν αυτούς του περιοδοντίου, εάν εμφυτευτούν *in vivo*.

Μελέτες κινητικής των περιρριζικών κυττάρων σε ποντίκια έχουν περιγράψει την παρουσία περιαγγειακών κυττάρων με πεπερασμένη διάρκεια ζωής περίπου 28 ημερών που διαιρούνται και στη συνέχεια μεταναστεύουν στις επιφάνειες του οστού και της οστεΐνης (McCulloch και Heersche 1988). Επιπλέον, αδιαφοροποίητα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν συνεχώς από ενδοστικούς χώρους του φατνιακού οστού στο περιρριζίο και στη συνέχεια φαίνεται ότι διαφοροποιούνται σε οστεοβλαστικά και οστεϊνοβλαστικά κύτταρα (McCulloch και συν. 1987). Ωστόσο, κάποιες πρόσφατες μελέτες με σεσημασμέ-

alized bone-like nodules *in vitro* (Arceo et al. 1991, Kobayashi et al. 1999). Although PDL cells that grow in culture are only a subset of all the cells present in the ligament *in vivo*, studies suggest that the cells isolated *in vitro* are indeed representative of the cells within the ligament (Lekic et al. 2001). More recently, Seo et al. (2004) have demonstrated that the PDL contains a true mesenchymal stem cell population that can be isolated by its expression of stem cell surface markers, including Stro-1 and CD146. These PDL stem cells exhibit multipotent differentiation potential and self-renewal *in vitro*, and can contribute to the formation of a range of connective tissues, including those of the periodontium, if implanted *in vivo*.

Studies of the kinetics of PDL cells in mice have described the presence of dividing paravascular cells with a finite life span of around 28 days that subsequently migrate to bone and cementum surfaces (McCulloch and Heersche 1988). Furthermore, undifferentiated proliferating cells continually migrate from endosteal spaces of the alveolar bone into the ligament and subsequently appear to give rise to mature osteoblast and cementoblast cells (McCulloch et al. 1987). However, some recent studies with labeled cells sug-



**Εικόνα 2:** Απλοποιημένο σχεδιάγραμμα της οστεοβλαστικής δέσμευσης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων. Οι παράγοντες μεταγραφής (Myo-D, PPAR-γ, Runx-2, Sox-9, TAZ) καθοδηγούν τη δέσμευση των πολυδύναμων κυττάρων σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (από Hughes και συν. 2006).

**Figure 2:** Simplified schematic diagram of the osteoblastic commitment of the mesenchymal stem cells. Transcription factors (Myo-D, PPAR-γ, Runx-2, Sox-9, TAZ) guide commitment of multipotent cells to specific lineages (from Hughes et al. 2006).

να κύτταρα υποδεικνύουν ότι τα προγονικά κύτταρα του περιριζίου είναι η κύρια πηγή για την αναγέννηση των περιοδοντικών ιστών (Hosoya και συν. 2008).

Στο σύνολό τους αυτά τα στοιχεία τονίζουν ότι το περιριζίο είναι πλούσιο σε αδιαφοροποίητα κύτταρα που έχουν την ικανότητα αναγέννησης όλων των περιοδοντικών ιστών και επίσης ότι το περιριζίο δεν είναι απλά ένα κλειστό σύστημα κυττάρων. Αντίθετα, φαίνεται να υπάρχει ένας συνεχής κύκλος ανανέωσης που περιλαμβάνει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των ώριμων κυττάρων και της μετανάστευσης νέων κυττάρων από το μυελό στο περιριζίο όπου μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε ώριμους τύπους κυττάρων. Αυτή η προφανής υψηλή αναγεννητική ικανότητα του περιριζίου θέτει το ερώτημα κατά πόσο η συνήθης απουσία πλήρους αναγέννησης κατά την επούλωση είναι το αποτέλεσμα της έλλειψης επαρκών κυττάρων με αναγεννητικό δυναμικό, ή αν η ερευνητική πρόκληση είναι να βρούμε τρόπους για να ξεκλειδώσουμε το εγγενές δυναμικό του περιριζίου για αναγέννηση.

### Σηματοδότηση κυττάρων και αυξητικοί παράγοντες στην περιοδοντική αναγέννηση

Η βασική σημασία της κατανόησης της φύσης των μηχανισμών της κυτταρικής σηματοδότησης είναι η αναγνώριση ότι τα μεμονωμένα κύτταρα δεν ενεργούν αυτόνομα, αλλά υπόκεινται σε μηχανισμούς ελέγχου που εξασφαλίζουν τη συντονισμένη κυτταρική λειτουργία μέσα στην πολυπλοκότητα ενός οργανισμού. Έτσι, εκτός από την κατανόηση της φύσης των κυττάρων του περιριζίου και των δυνατοτήτων τους, είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε τα σήματα που ελέγχουν τη λειτουργία τους, ειδικά γιατί η διαχείριση αυτών των σηματοδοτικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε μια χρήσιμη μέθοδο για την επαγωγή ενός επιθυμητού επουλωτικού αποτελέσματος.

Σε γενικές γραμμές, τα μοριακά σήματα τα οποία μπορούν

gest that progenitor cells within the PDL are the main source for the regeneration of periodontal tissues (Hosoya et al. 2008).

Taken together, these data emphasize that the PDL is rich in undifferentiated cells with the capacity to regenerate all the periodontal tissues and also that the PDL is not a closed system of cells. Instead, there appears to be a continual cycle of turnover, including programmed cell death of mature cells and migration of new cells into the ligament from marrow spaces, where they can undergo further cell division and differentiation into mature cell types. This apparent high regenerative potential of the PDL raises the question of whether the normal absence of complete regeneration during healing is the result of the lack of sufficient cells of regenerative potential, or whether the research challenge is to find a way to unlock the body's inherent potential for the PDL to regenerate.

### Cell signalling and growth factors in periodontal regeneration

The essential importance of understanding the nature of cell signaling mechanisms is the recognition that individual cells do not act autonomously, but rather are subject to controlling mechanisms to ensure the coordinated function of cells within the complexities of the organism. Thus, in addition to understanding the nature of the PDL cells and their potentials, it is necessary to understand the signals that control their function, particularly because manipulation of these signalling factors may provide a useful method to promote a desired wound healing outcome.

In general terms, the molecular signals that can

να ελέγχουν την διαφοροποίηση των κυττάρων (Hughes 1995) περιλαμβάνουν:

- διαλυτούς παράγοντες (π.χ. ορμόνες και κυτοκίνες)
- μόρια εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
- άμεσες διακυτταρικές επαφές
- εξωτερικά ερεθίσματα (π.χ. μηχανική διέγερση)

Ειδικότερα, ο ρόλος των διαλυτών παρακρινών μορίων, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, έχουν μελετηθεί εκτενώς και η πιθανή θεραπευτική εφαρμογή τους είναι κάτω από συνεχή έρευνα. Σε γενικές γραμμές, τα μόρια αυτά είναι πεπτίδια που λειτουργούν σαν συνδέτες δεσμεύοντας υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια και ενεργοποιούν συγκεκριμένες αλληλουχίες ενδοκυτταρικών μηχανισμών σηματοδότησης με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης για τον έλεγχο κυτταρικών λειτουργιών που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Κατά τη διάρκεια της επούλωσης, οι αυξητικοί παράγοντες απελευθερώνονται τοπικά από διάφορες πηγές που περιλαμβάνουν τα αιμοπετάλια, τα γειτονικά ώριμα κύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα είτε από απομακρυσμένες θέσεις του οστού και του συνδετικού ιστού, σαν αποτέλεσμα του ανασχηματισμού.

Το ευρύ φάσμα των αυξητικών παραγόντων που μπορεί να ρυθμίζει τη διαδικασία της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών έχει μελετηθεί εκτενώς (Hughes και συν. 2006). Κατά τη διάρκεια των διαδικασιών δέσμευσης των βλαστικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών υπάρχει μία προσεκτικά ελεγχόμενη και συντονισμένη έκφραση μιας σειράς αυξητικών παραγόντων που καθοδηγεί τη δέσμευση των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την κλωνική ενίσχυση των προγονικών κυττάρων και τελικά την παραγωγή και απελευθέρωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ) του οστού (Εικόνα 2, Πίνακας 2). Επιπλέον, η δραστηριότητα πολλών αυξητικών παραγόντων μπορεί να ρυθμιστεί περαιτέρω με την παραγωγή ανταγωνιστικών κατασταλτικών μορίων που εμποδίζουν τις δραστηριότητές τους (Hughes και συν. 2006). Λόγω της σημασίας αυτών των παραγόντων κατά τη διάρκεια σχηματισμού οστού, πολλοί από αυτούς έχουν ερευνηθεί για τη δυνατότητά τους να ενεργοποιήσουν την ιστική αναγέννηση θεραπευτικά, όπως αναλύεται παρακάτω.

### Εφαρμογές της ιστικής μηχανικής στην περιοδοντική αναγέννηση

Η πρόκληση για την ιστική μηχανική είναι να επιτύχει ένα σωστό συνδυασμό από κύτταρα, σήματα και το κατάλληλο πλέγμα που θα επιτρέπει, τόσο την αναγέννηση των ιστών, όσο και το σχηματισμό της κατάλληλης μορφολογίας των νέων ιστών. Ενώ αυτά τα ζητήματα έχουν διευθετηθεί σε πολλές προκλινικές μελέτες με πειραματόζωα, ενδέχεται να υπάρχουν σημαντικά εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν πριν από την κλινική εφαρμογή.

#### Βιοϋλικά πλέγματα

Η χρήση της κυτταρικής θεραπείας για την περιοδοντική ιστική μηχανική μπορεί να μειώνει την ανάγκη για προσέλευση κυττάρων και ρυθμιστικών παραγόντων στην περιοχή, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από ένα υπόστρωμα που επιτρέπει τα κατάλληλα κύτταρα και τα ρυθμιστικά μηνύματα να ενσωματωθούν και να μεταφερθούν στη βλάβη. Ανάλογα με την αναγεννητική τεχνική που υιοθετείται, τα πλέγματα πρέπει να πληρούν κάποιες ιδιότητες που περιλαμβάνουν τις ακόλουθες:

control the differentiation of cells (Hughes 1995) include the following:

- soluble factors (e.g., hormones and cytokines)
- extracellular matrix molecules
- direct cell-cell contacts
- external stimuli (e.g., mechanical stimulation)

In particular, the role of soluble paracrine signaling molecules, such as growth factors, has been extensively studied and their potential therapeutic application is under continuous investigation. In general, these molecules are peptides that act as ligands and bind to their cell surface receptors, activating specific cascades of intracellular signaling mechanisms and ultimately resulting in regulation of gene expression in the cell to control cellular functions, including proliferation and differentiation. During wound healing, growth factors are released locally from a number of sources, including platelets, adjacent mature cells, and infiltrating inflammatory cells, and are also released from sequestered sources in the bone and connective tissue matrix as a result of remodeling.

The wide range of growth factors that may regulate the processes of osteoblast differentiation have been studied extensively (Hughes et al. 2006). During the processes of stem cell commitment and osteoblast differentiation, there is a carefully controlled, coordinated expression of a range of growth factors that directs the osteoblastic commitment of mesenchymal stem cells, the proliferation and clonal amplification of progenitor cells, and ultimately the production and release of bone-related extracellular matrix (ECM) (Figure 2, Table 2). In addition, the activity of many of these growth factors is further regulated by the production of antagonistic inhibitor molecules that may block their activities (Hughes et al. 2006). In view of the importance of these factors during bone formation, many have been investigated for their potential to stimulate tissue regeneration therapeutically, as discussed in the following section.

### Application of tissue engineering in periodontal regeneration

The challenge for tissue engineering is to achieve the correct combination of cells and signals and a suitable material scaffold to deliver them to the defect and allow both tissue regeneration and formation of an appropriate shape of the new tissues. Although these questions have been addressed in many preclinical and animal studies, there may be major hurdles to overcome prior to clinical application.

#### Biomaterial scaffolds

The use of cell therapy for periodontal tissue engineering may diminish the need for cell and regulatory factor recruitment at the site, but is highly dependent on a substratum that enables the appropriate cells and instructive messages to be incorporated and delivered to the defect. Depending on the overall regenerative strategy used, scaffolds may be required to have a number of properties, including the following:

- πορώδης δομή που επιτρέπει την ανάπτυξη κατάλληλων κυττάρων και αιμοφόρων αγγείων
- βιοαπορροφησιμότητα
- ρύθμιση ιστικού σχηματισμού (π.χ. οστεοεπαγωγή)
- κατάλληλο σχήμα για τη βλάβη που πρέπει να αναγεννηθεί, με προσαρμοστικότητα, διαμόρφωση ή in vivo προσχηματισμό
- αργή απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων ή άλλων μορίων σηματοδότησης
- προσθήκη αυτολόγων βλαστικών κυττάρων που έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί in vitro

Το ιδανικό πλέγμα για την περιοδοντική αναγέννηση δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη, αλλά έχουν περιγραφεί οι πρόσφατες πρόοδοι σε αυτόν τον τομέα. Σε γενικές γραμμές, τα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα προέρχονται από ζωική ΕΘΟ όπως το βόειο κολλαγόνο, συνθετικά απορροφήσιμα πολυμερή και υλικά με βάση το φωσφορικό ασβέστιο. Επιπλέον, έχουν επίσης περιγραφεί σύνθετα υλικά που ενσωματώνουν φωσφορικό ασβέστιο σε πολυμερές υπόστρωμα. Τα πλέγματα ΕΘΟ έχουν το πλεονέκτημα της βιολογικής αναγνώρισης που μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων (Kurihara και Nagamune 2005). Ωστόσο, μπορούν να δημιουργήσουν ανοσοαντίδραση, ενώ συνήθως ο έλεγχος των μηχανικών ιδιοτήτων τους είναι πιο δύσκολος. Η διαδικασία διασταυρούμενων συνδέσεων της ΕΘΟ για βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων είχε σαν αποτέλεσμα την περιχαράκωση που εμπόδισε τη διάσπαση και οδήγησε σε λιγότερο ικανοποιητική περιοδοντική αναγέννηση.

Κατά τη διάρκεια της διάσπασης απελευθερώνονται βιολογικά ενεργά προϊόντα όπως οι αυξητικοί παράγοντες και οι συγκολλητικές πρωτεΐνες (π.χ., αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας και φιβρονεκτίνη) (Badylak 2004). Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί πεπτίδια με αντιβακτηριακές και χημειοτακτικές ιδιότητες που μπορούν να δράσουν σε προγονικά κύτταρα. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι πολύ ελκυστικά λόγω του μεγάλου μικροβιακού φορτίου που ανιχνεύεται στα περιοδοντικά τραύματα και για την πιθανή χρήση των προγονικών κυττάρων του περιρριζίου για ιστική μηχανική. Τα πλέγματα των πολυμερών είναι επίσης ελκυστικοί υποψήφιοι, λόγω της μεγάλης ευελιξίας τους αλλά και για τη δυνατότητα ελέγχου κάποιων ιδιοτήτων όπως η αντοχή, ο ρυθμός αποδόμησης και η μικροδομή.

Ο θερμικά προκαλούμενος διαχωρισμός προκαλεί αύξηση του πορώδους του πλέγματος σε 95% (Zhang και συν. 1999), αυξάνοντας έτσι την επιβίωση των οστεοβλαστών και τα επίπεδα έκφρασης της οστικής σιαλοπρωτεΐνης και της οστεοκαλσίνης (Ma και Choi 2001). Η χρήση σφαιριδίων παραφίνης για τη δημιουργία ενός δικτύου πόρων που είναι κρίσιμο για την ομοιόμορφη διασπορά των κυττάρων, έχει επίσης παρουσιαστεί (Ma και Choi 2001). Νέες τεχνικές, όπως η ταχεία πρωτοτυποποίηση, μπορούν να παράγουν πιο πολύπλοκα τρισδιάστατα πολυμερή πλέγματα, αλλά με χαμηλή ανάλυση και δύσκολο έλεγχο των μηχανικών ιδιοτήτων. Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί τροποποιήσεις της επιφάνειας του πολυμερούς για να ενισχυθεί η βιολογική αναγνώρισή του. Οι θεραπείες με αλκάλια και η προσκόλληση πεπτιδίων (Cook και συν. 1997, Gao και συν. 1998), προκαλούν αλλαγή στην επιφάνεια του πολυμερούς από υδρόφοβο σε υδρόφιλο και επιτρέπουν την περαιτέρω προσθήκη συγκεκριμένων μορίων για να ικανοποιηθούν οι συγκεκριμένες ανάγκες για την εφαρμογή του.

- porous structure, allowing growth of appropriate cells and blood vessels
- biodegradability
- regulation of tissue formation (e.g., osteoinduction)
- appropriate shape for the defect to be regenerated by being adaptable, moldable, or preformed in vivo
- slow release of growth factors or other signaling molecules
- addition of autologous stem cells that have been isolated and expanded in vitro

The ideal scaffold for periodontal regeneration is yet to be developed, but recent advances in this field have been described. In general, scaffold materials to date have consisted of an animal-derived ECM such as bovine collagen, synthetic bioresorbable polymers, and calcium phosphate-based materials. In addition, composite materials that incorporate calcium phosphates in polymeric materials have also been described. ECM scaffolds have the advantage of biological recognition that may be crucial for cell survival (Kurihara and Nagamune 2005). However, they may exhibit immunogenicity and their mechanical properties are more difficult to control. The process of chemical cross-link of ECM to enhance its mechanical properties led to the encapsulation of the scaffold, preventing degradation and resulting in less successful regeneration of the periodontal tissues.

During degradation, biologically active products such as growth factors and adhesive proteins (e.g., vascular endothelial cell growth factor and fibronectin) have been shown to be released (Badylak 2004). In addition, peptides with antibacterial and chemoattractant properties that can act on progenitor cells have also been identified. Such characteristics are very attractive for the high bacterial load found in periodontal wounds and for the possible use of PDL progenitor cells for periodontal tissue engineering. Polymeric scaffolds are also attractive candidates because of their great flexibility and because of the possibility of controlling their properties, such as strength, degradation rate, and microstructure.

Thermally induced separation has produced a porosity of 95% in scaffolds, increasing osteoblast survival and the expression levels of bone sialoprotein and osteocalcin (Ma and Choi 2001). The use of paraffin spheres to generate a totally interconnected pore network, critical for uniform cell seeding, has also been developed (Ma and Choi 2001). New techniques such as rapid prototyping may produce more complex three-dimensional polymer scaffolds, but with low resolution and weak control of mechanical properties. Finally, modifications of polymer surfaces have been carried out to enhance their biological recognition. Treatments with alkali and the attachment of peptides (Cook et al. 1997, Gao et al. 1998) change the surface of the polymer from hydrophobic to hydrophilic and allow further attachment of certain molecules to meet the specific needs for its application.

### Αυξητικοί παράγοντες

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη φαρμακολογική εφαρμογή των ανασυνδυασμένων αυξητικών παραγόντων στην αναγέννηση των ιστών. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι αυξητικοί παράγοντες δρουν σε συντονισμένες ομάδες για τον έλεγχο της αναγέννησης των ιστών, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε αντίθεση, οι αυξητικοί παράγοντες που εφαρμόζονται θεραπευτικά συνήθως απαιτούν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ακόμη, απαιτούν κάποιου είδους φορέα που να διατηρεί τη βιοδραστική συγκέντρωσή τους για επαρκώς μεγάλα χρονικά διαστήματα για να έχουν θεραπευτική δράση. Εναλλακτικά, πειραματικές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει τη δυνατότητα μακροπρόθεσμης απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων με τη γονιδιακή θεραπεία, όπου τα αυτόλογα κύτταρα που επιμολύνονται με το γονίδιο του αυξητικού παράγοντα και επανεμφυτεύονται στους ιστούς, οδηγούν στη μακροπρόθεσμα ελεγχόμενη απελευθέρωση του αυξητικού παράγοντα (Jin και συν. 2003, 2004).

Περίληπτικά, ένα ευρύ φάσμα αυξητικών παραγόντων που περιλαμβάνουν τη BMP-2, τη BMP-7, τη BMP-14 (παράγοντας αύξησης και διαφοροποίησης 5), τον PDGF, τον PDGF με τον ινσουλινικό αυξητικό παράγοντα-1, τον TGF- $\beta$  και τον FGF-2, έχουν δοκιμαστεί σε μελέτες με ζώα και όλοι έχουν αποδείξει τον ευνοϊκό έλεγχο της περιοδοντικής αναγέννησης (Ripamonti και συν. 1994, 1996, Sigurdsson και συν. 1996, Kim και συν. 1997, 2009, Kinoshita και συν. 1997, Moore και συν. 2010). Για τους περισσότερους από αυτούς τους παράγοντες υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα από μελέτες σε ανθρώπους που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητά τους. Ωστόσο, σε μια RCT με τρία σκέλη και 180 ασθενείς, όπου το  $\beta$ -τριφωσφορικό ασβέστιο χρησιμοποιήθηκε σαν φορέας, ο PDGF επέδειξε σημαντικά αυξημένη εναπόθεση νεόπλαστου οστού σε σύγκριση με το  $\beta$ -τριφωσφορικό ασβέστιο που χρησιμοποιήθηκε μόνο του σαν μάρτυρας (Nevins και συν. 2005). Επιπλέον, η ιστολογική ανάλυση σε ανθρώπους παρέχει σαφή τεκμηρίωση για πραγματική περιοδοντική αναγέννηση από την εφαρμογή των αυξητικών παραγόντων (Nevins και συν. 2003). Το υλικό αυτό, ενώ απέκτησε ήδη άδεια για χρήση στην περιοδοντική αναγέννηση στις Ηνωμένες Πολιτείες, δεν έχει ακόμη Ευρωπαϊκή άδεια. Πιο πρόσφατα, μια RCT με τέσσερα σκέλη και 254 ασθενείς, ανέφερε ότι ο FGF-2 που εφαρμόστηκε με ένα φορέα γέλης, οδήγησε σε αυξημένη οστική πλήρωση σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου, χωρίς όμως κέρδος κλινικής πρόσφυσης (Kitamura και συν. 2010). Μολονότι πολλοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν αποδείξει ξεκάθαρα τη βιολογική τους δράση, η πλήρης δυνατότητα περιοδοντικής αναγέννησης με καθοδήγηση των αυξητικών παραγόντων στον ευρύτερο τομέα της ιστικής μηχανικής δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως.

Σε γενικές γραμμές, οι αυξητικοί παράγοντες αποτελούν μια ομάδα μορίων που ενεργοποιούν διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η χημειοταξία, η διαφοροποίηση και η παραγωγή πρωτεϊνών ΕΘΟ. Συνεπώς, οι αυξητικοί παράγοντες, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλες τεχνολογίες μπορεί να είναι ικανοί για αναγέννηση περιριζίου, νεόπλαστου οστού και οστεΐνης. Μια πρόσφατη ανασκόπηση (Trombelli και Farina 2008) υπέδειξε ότι η συνδυασμένη εφαρμογή του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου PDGF-BB και του πεπτιδίου P-15 σε ενδοστικές βλάβες οδήγησε σε ευνοϊκά αποτελέσματα. Ωστόσο, αναφέρθηκαν αντιφατικά αποτελέσματα για το αιμοπεταλιακό πλάσμα και

### Growth factors

There is considerable interest in the pharmacological application of recombinant growth factors for tissue regeneration. Under normal conditions, growth factors act in coordinated groups to control tissue regeneration at very low concentrations. In contrast, therapeutically applied growth factors tend to require an application of greatly increased concentrations. Furthermore, they require some sort of delivery system to maintain bioactive concentrations for sufficiently long periods to have a therapeutic effect. Alternatively, experimental animal studies have suggested the long-term potential of delivering growth factors by gene therapy, whereby autologous cells are transfected with the growth factor gene and then reimplanted into the tissues, resulting in longer term controlled delivery of the growth factor (Jin et al. 2003, 2004).

Briefly, a wide range of growth factors, including BMP-2, BMP-7, BMP-14 (growth differentiation factor 5), PDGF, PDGF and insulin-like growth factor-1, TGF $\beta$ , and FGF-2, have been tested in animal studies and have all been shown to favorably regulate periodontal regeneration (Ripamonti et al. 1994, 1996, Sigurdsson et al. 1996, Kim et al. 1997, 2009, Kinoshita et al. 1997, Moore et al. 2010). For most of these factors, there are little or no clinical data obtained from human studies that demonstrate their effectiveness. However, a 180-subject, three-arm RCT of PDGF for periodontal regeneration, in which  $\beta$ -tricalcium phosphate was used as a carrier, has shown a marked increase in new bone formation and increased bone height compared with the use of  $\beta$ -tricalcium phosphate alone as a control (Nevins et al. 2005). Furthermore, human histological analysis has provided clear evidence of true periodontal regeneration following the application of growth factors (Nevins et al. 2003). This material is now licensed for periodontal regeneration in the United States, although it does not at present have a European license. Most recently, a report of a 254-subject, four-arm RCT on the effect of FGF-2 in a gel delivery system has shown increased bone fill compared with control groups but without clinical attachment level gain (Kitamura et al. 2010). Even though many of these factors have clearly demonstrated their biological activity, the full potential of growth factor-mediated periodontal regeneration within a tissue engineering environment remains to be fully demonstrated.

In general, growth factors comprise a class of molecules that may stimulate a variety of cellular events such as proliferation, chemotaxis, differentiation, and production of ECM proteins. Therefore, growth factors individually or in combination with other technologies may be capable of regenerating PDL, new bone, and cementum. A recent review (Trombelli and Farina 2008) indicated that the combined use of recombinant human PDGF-BB with the peptide P-15 graft biomaterial has resulted in beneficial effects in intrabony defects. However, conflicting results were reported for platelet-rich plasma and graft combina-

τους συνδυασμούς μοσχευμάτων, ενώ περιορισμένη τεκμηρίωση υποστηρίζει τη χρήση αυξητικών παραγόντων, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με μοσχεύματα ή ΚΙΑ στην αντιμετώπιση μεσορριζικών βλαβών (Trombelli και Farina 2008).

### Εμφύτευση βλαστικών κυττάρων

Σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η αναγεννητική δυνατότητα του περιοδοντίου, έχει διερευνηθεί η εμφύτευση αυτόλογων βλαστικών κυττάρων σε ένα κατάλληλο σύστημα φορέα σε μελέτες με ζώα. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από το μυελό των οστών αλλά και από οδοντικούς ιστούς που περιλαμβάνουν τον οδοντικό πολφό και το περιρριζίο. Οι απομονωμένες καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων μπορεί να εμπλουτιστούν χρησιμοποιώντας μια σειρά από επιφανειακούς κυτταρικούς δείκτες που εκφράζουν, όπως οι Stro-1, CD-146 και CD-90 (Seo και συν. 2004, 2005). Μέσω επισήμανσης ανοσοφθορισμού αυτών των δεικτών, μπορούν να ληφθούν εμπλουτισμένες καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων με την τεχνική της κυτταρομετρικής ροής. Μολονότι τα βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, μια ακόμη πρόκληση είναι η διατήρηση του αδιαφοροποίητου φαινότυπού τους στην καλλιέργεια, που θα επιτρέψει τη μεγάλη αύξηση του αριθμού των κυττάρων που απομονώθηκαν αρχικά, πριν την επανεμφύτευση. Αν και αυτός ο ερευνητικός τομέας είναι σχετικά νέος, κάποιες μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η επανεμφύτευση τέτοιων κυττάρων μπορεί να συμβάλλει στην περιοδοντική αναγέννηση (Seo και συν. 2004, Liu και συν. 2008, Silverio και συν. 2008 Lin και συν. 2009).

### Οι προκλήσεις του μέλλοντος

Η πλήρης αναγέννηση των περιοδοντικών ιστών με την κατάλληλη περιοδοντική θεραπεία εξακολουθεί να αποτελεί μια ανεκπλήρωτη αποστολή και μια εξαιρετικά δύσκολη πρόκληση, παρά την εκτεταμένη έρευνα στον τομέα αυτό και την κατανόηση του βιολογικού υπόβαθρου. Ειδικότερα, σαν θεραπευτές επιζητούμε θεραπείες που θα βελτιώσουν την προβλεψιμότητα της παρέμβασης και θα βελτιώσουν το μέγεθος του αποτελέσματος της θεραπείας. Ακόμη πιο σημαντικά, θα πρέπει να επεκτείνουμε μακροπρόθεσμα τις ενδείξεις για θεραπεία πέρα από τις περιγεγραμμένες βλάβες, στην υπεροστική αναγέννηση, η οποία θα έχει θετικές επιδράσεις και στους μαλακούς ιστούς των ούλων. Παρά το γεγονός ότι η προσέγγιση της ιστικής μηχανικής με συνδυασμό κυττάρων, σηματοδοτικών μορίων και πλεγμάτων φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη, υπάρχουν ακόμη ορισμένα βασικά ζητήματα που πρέπει να διευθετηθούν.

Δεν είναι σαφές, για παράδειγμα, αν το μυστικό της επιτυχίας βρίσκεται στην αποκωδικοποίηση του εγγενούς αναγεννητικού δυναμικού των ιστών, ή στην προσθήκη εξωγενών βλαστικών κυττάρων που καλλιεργούνται πριν την επανεμφύτευση. Παρόμοια, δεν είναι ξεκάθαρο αν η προσθήκη των ανασυνδυασμένων αυξητικών παραγόντων θα ήταν απαραίτητη, ακόμη και αν πραγματοποιηθεί επανεμφύτευση βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, είναι πιθανό το πιο σημαντικό ζήτημα να είναι η χρήση του κατάλληλου υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή του πλέγματος.

Τέλος, είναι πολύ σημαντικό να μην επεκτείνουμε τα αποτελέσματα από τις προκλινικές μελέτες και τις μελέτες με ζώα σε κλινικές καταστάσεις, χωρίς την πραγματοποίηση εκτεταμένων RCTs για αυτές τις θεραπευτικές παρεμβάσεις. Όποια και να

tions, and limited evidence supports the use of growth factors either alone or in association with grafts or GTR for the treatment of furcation defects (Trombelli and Farina 2008).

### Stem cell implantation

In an attempt to increase the regenerative potential of the periodontium, the implantation of autologous stem cells in a suitable carrier system has been proposed and investigated in some animal studies. Mesenchymal stem cells can be isolated from bone marrow aspirates, but also potentially from dental tissues, including pulp and PDL. Isolated cultures with stem cell populations may be enriched by using a number of cell surface markers that they express, such as Stro-1, CD-146, and CD-90 (Seo et al. 2004, 2005). By fluorescent labeling of these markers, enriched stem cell cultures can be obtained by sorting the cells by flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting). Although stem cells are normally self-renewing, a further challenge in culture is to maintain their undifferentiated phenotype sufficiently to allow a large expansion in the cell numbers originally isolated prior to reimplantation. Although this area of research is relatively new, a number of animal studies have demonstrated that reimplantation of such cells can contribute to periodontal regeneration (Seo et al. 2004, Liu et al. 2008, Silverio et al. 2008, Lin et al. 2009).

### The challenges of the future

The complete regeneration of periodontal tissues following appropriate treatment remains an unmet task and has presented a remarkably difficult challenge to solve, given the extensive research and our current understanding of the biological background. In particular, as clinicians, we look for treatments that will improve the predictability of the procedure; improve the magnitude of the effect of treatment. Perhaps most importantly in the long term we have to extend the indications for treatment beyond the need for single enclosed bony defects to allow suprabony regeneration, preferably with beneficial effects on the gingival soft tissues. Although combining cells, signaling molecules, and scaffolds by tissue engineering approaches appears to be promising, there remain a number of basic questions to address.

It is not clear, for example, whether the secret to success is to better unlock the inherent regenerative potential of the existing tissues, or to add exogenous stem cells grown in culture prior to reimplantation. Similarly, it is not clear whether the addition of recombinant growth factors would be a requirement even in cases where stem cell reimplantation was carried out. Furthermore, it is possible that the most important issue may turn out to be the correct material being used as a scaffold.

Finally, it is vital that we do not extrapolate results from preclinical and animal studies into clinical situations, without conducting extensive RCTs to test these therapeutic procedures. Whatever the outcomes,

είναι τα αποτελέσματα, η περιοδοντική αναγέννηση παραμένει ένας στόχος που αξίζει να επιτύχουμε για τους ασθενείς μας.

### **Δηλώσεις/Ευχαριστίες**

Οι συγγραφείς ευχαριστούν την Ιωάννα Τσιλιγκρού και την Ιωάννα Αποστολίδου για την βοήθειά τους στην προετοιμασία του χειρόγραφου. Δεν υπάρχουν οικονομικές ή άλλες αντιθέσεις συμφερόντων σε σχέση με την παρούσα δημοσίευση.

periodontal regeneration remains a goal worth pursuing for our patients.

### **Acknowledgments**

The authors thank Ioanna Tsiligrou and Ioanna Apostolidou for their help in the preparation of the manuscript. There are no financial or other conflicts of interest related to this publication.



## Βιβλιογραφία - References

- Aichelmann-Reidy, M. E. & Yukna, R. A. (1998) Bone replacement grafts. The bone substitutes. *Dental Clinics of North America* **42**, 491-503.
- Arceo, N., Sauk, J. J., Moehring, J., Foster, R. A. & Somerman, M. J. (1991) Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *Journal of Periodontology* **62**, 499-503.
- Aspriello, S. D., Ferrante, L., Rubini, C. & Piemontese, M. (2011) Comparative study of DFDBA in combination with enamel matrix derivative versus DFDBA alone for treatment of periodontal intrabony defects at 12 months post-surgery. *Clinical Oral Investigations* **15**, 225-232.
- Badylak, S. F. (2004) Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology* **12**, 367-377.
- Belal, M. H., Al-Noamany, F. A., El-Tonsy, M. M., El-Guindy, H. M. & Ishikawa, I. (2005) Treatment of human class II furcation defects using connective tissue grafts, bioabsorbable membrane, and resorbable hydroxylapatite: a comparative study. *Journal of the International Academy of Periodontology* **7**, 114-128.
- Beresford, J. N., Bennett, J. H., Devlin, C., Leboy, P. S. & Owen, M. E. (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of Cell Science* **102**, 341-351.
- Beresford, J. N., Joyner, C. J., Devlin, C. & Triffitt, J. T. (1994) The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Archives of Oral Biology* **39**, 941-947.
- Bosshardt, D. D. (2008) Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 87-105.
- Camargo, P. M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Nedic, M., Vasilic, N., Wolinsky, L. E., Kenney, E. B. (2000) A controlled re-entry study on the effectiveness of bovine porous bone mineral used in combination with a collagen membrane of porcine origin in the treatment of intrabony defects in humans. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 889-896.
- Camargo, P. M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Kenney, E. B., Vasilic, N., Madzarevic M (2001) The effectiveness of enamel matrix proteins used in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects in humans. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 1016-22.
- Camargo, P. M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M., Kenny, E. B. (2005) A reentry study on the use of bovine porous mineral, GTR and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **25**, 49-59.
- Caton, J. G & Greenstein, G. G. (1993) Factors related to periodontal regeneration. *Periodontology 2000* **1**, 9-15.
- Caton, J, Zander, H. A. (1976) Osseous repair of a infrabony pocket without new attachment of connective tissue. *Journal of Clinical Periodontology* **3**, 54-58.
- Caton, J., Nyman, S. & Zander, H. (1980) Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *Journal of Clinical Periodontology* **7**, 224-231.
- Chambrone, L., Chambrone, D., Lima, L. A. & Chambrone, L. A. (2010) Predictors of tooth loss during long-term periodontal maintenance: a systematic review of observational studies. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 675-684.
- Cook, A. D., Hrkach, J. S., Gao, N. N., Johnson, I. M., Pajvani, U. B., Cannizzaro, S. M. & Langer, R. (1997) Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research* **15**, 513-523.
- Deliberator, T. M, Nagata, M. J. H., Furlaneto, F. A. C., Melo, L. G. N, Okamoto, T., Sundefeld, M. L. M. M. and Fucini, S. E. (2006) Autogenous bone graft with or without a calcium sulfate barrier in the treatment of Class II furcation defects: a histologic study in dogs. *Journal of Periodontology* **77**, 780-789.
- Dennis, J. E. & Charbord, P. (2002) Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* **20**, 205-214.
- Dori, F., Nikolidakis, D., Huszar, T., Arweiler, N. B., Gera, I. & Sculean, A. (2008) Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative and a natural bone mineral. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 44-50.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. & Karsenty, G. (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 677-680.
- Esposito, M., Grusovin, M. G., Papanikolaou, N., Coulthard, P. & Worthington, H. V. (2009) Enamel matrix derivative (Emdogain®) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, CD003875.
- Friedenstein, A. J. (1976) Precursor cells of mechanocytes. *International Reviews in Cytology* **47**, 327-359.
- Friedenstein, A. J., Chailalhyan, R. K. & Gerasimov, U. V. (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and Tissue Kinetics* **20**, 263-272.
- Gao, J., Niklason, L. & Langer, R. (1998) Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **5**, 417-424.
- Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. & Lindhe, J. (1984) New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 494-503.
- Harris, R. J. (1999) Treatment of furcation defects with DFDBA combined with GTR: human histologic evaluation of a case. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **19**, 225-231.
- Hong, J. H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., Mueller, E., Benjamin, T., Spiegelman, B. M., Sharp, P. A., Hopkins, N. & Yaffe, M. B. (2005) TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **309**, 1074-1078.
- Hosoya, A., Ninomiya, T., Hiraga, T., Zhao, C., Yoshida, K., Yoshida, N., Takahashi, M., Okabe, T., Wakitani, S., Yamada, H., Kasahara, E., Ozawa, H. & Nakamura, H. (2008) Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar. *Bone* **42**, 350-357.
- Hughes, F. J. (1995) Cytokines and cell signalling in the periodontium. *Oral Diseases* **1**, 259-265.
- Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G. & Martuscelli, G. (2006) Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000* **41**, 48-72.
- Jin, Q., Anusaksathien, O., Webb, S. A., Printz, M. A. & Gianobile, W. V. (2004) Engineering of tooth-supporting structures by delivery of PDGF gene therapy vectors. *Molecular Therapy* **9**, 519-526.

- Jin, Q. M., Anusaksathien, O., Webb, S. A., Rutherford, R. B. & Giannobile, W. V. (2003) Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *Journal of Periodontology* **74**, 202-213.
- Kim, T. G., Wikesjo, U. M., Cho, K. S., Chai, J. K., Pippig, S. D., Siedler, M. & Kim, C. K. (2009) Periodontal wound healing/regeneration following implantation of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) in an absorbable collagen sponge carrier into one-wall intrabony defects in dogs: a dose-range study. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 589-597.
- King, G. N., King, N., Cruchley, A. T., Wozney, J. M. & Hughes, F. J. (1997) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *Journal of Dental Research* **76**, 1460-1470.
- Kinoshita, A., Oda, S., Takahashi, K., Yokota, S. & Ishikawa, I. (1997) Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *Journal of Periodontology* **68**, 103-109.
- Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofujii, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Kido, J., Nagata, T., Kurihara, H., Takashiba, S., Sibutani, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., Ioroi, K., Arai, T., Nakagawa, T., Ito, K., Oda, S., Izumi, Y., Ogata, Y., Yamada, S., Shimauchi, H., Kunimatsu, K., Kawanami, M., Fujii, T., Furuichi, Y., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Omae, M., Yamada, S., Watanuki, M. & Murakami, S. (2011) FGF-2 stimulates periodontal regeneration: Results of a multi-center randomized clinical trial. *Journal of Dental Research* **90**, 35-40.
- Kobayashi, M., Takiguchi, T., Suzuki, R., Yamaguchi, A., Deguchi, K., Shionome, M., Miyazawa, Y., Nishihara, T., Nagumo, M. & Hasegawa, K. (1999) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *Journal of Dental Research* **78**, 1624-1633.
- Kurihara, H. & Nagamune, T. (2005) Cell adhesion ability of artificial extracellular matrix proteins containing a long repetitive Arg-Gly-Asp sequence. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100**, 82-87.
- Lecic, P., Rojas, J., Birek, C., Tenenbaum, H. & McCulloch, C. A. (2001) Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *Journal of Periodontal Research* **36**, 71-79.
- Lekovic, V., Camargo, P. M., Weinlaender, M., Kenney, E. B., Vasilic, N. (2001) Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *Journal of Periodontology* **72**, 583-589.
- Lin, N. H., Gronthos, S. & Mark Bartold, P. (2009) Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000* **51**, 239-251.
- Liñares, A., Cortellini, P., Lang, N. P., Suvan, J., Tonetti, M. S. (2006) European Research Group on Periodontology (Ergo-Perio). Guided tissue regeneration/deproteinized bovine bone mineral or papilla preservation flaps alone for treatment of intrabony defects. II: radiographic predictors and outcomes. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 351-358.
- Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P. M., Gronthos, S., Shi, S. & Wang, S. (2008) Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells* **26**, 1065-1073.
- Ma, P. X. & Choi, J. W. (2001) Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Engineering* **7**, 23-33.
- Maniatopoulos, C., Sodek, J. & Melcher, A. H. (1988) Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and Tissue Research* **254**, 317-330.
- McCulloch, C. A. (1993) Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology 2000* **1**, 16-25.
- McCulloch, C. A. & Heersche, J. N. (1988) Lifetime of the osteoblast in mouse periodontium. *The Anatomical Record* **222**, 128-135.
- McCulloch, C. A., Narayanan, S. A. (1994) Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *Journal of Periodontal Research* **29**, 81-94.
- McCulloch, C. A., Nemeth, E., Lowenberg, B. & Melcher, A. H. (1987) Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *The Anatomical Record* **219**, 233-242.
- Melcher, A. H. (1976) On the repair potential of periodontal tissues. *Journal of Periodontology* **47**, 256-260.
- Moore, Y. R., Dickinson, D. P. & Wikesjo, U. M. (2010) Growth/differentiation factor-5: a candidate therapeutic agent for periodontal regeneration? A review of pre-clinical data. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 288-298.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17-29.
- Needleman, I., Tucker, R., Giedrys-Leeper, E. & Worthington, H. (2005) Guided tissue regeneration for periodontal intrabony defects -- a Cochrane Systematic Review. *Periodontology 2000* **37**, 106-123.
- Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K. & Lynch, S. E. (2003) Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *Journal of Periodontology* **74**, 1282-1292.
- Nevins, M., Giannobile, W. V., McGuire, M. K., Kao, R. T., Mellonig, J. T., Hinrichs, J. E., McAllister, B. S., Murphy, K. S., McClain, P. K., Nevins, M. L., Paquette, D. W., Han, T. J., Reddy, M. S., Lavin, P. T., Genco, R. J. & Lynch, S. E. (2005) Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* **76**, 2205-2215.
- Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. & Lindhe, J. (1982a) The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology* **9**, 257-265.
- Nyman, S., Lindhe, J., Karring T & Rylander, H. (1982b) New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **9**, 290-296.
- Owen, M. & Friedenstein, A. J. (1988) Stromal cells: marrow-derived osteogenic precursors, *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues*. Editors: Evered D. & Harnett S., John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK, pp. 42-53.
- Parashis, A., Andronikaki-Faldami, A. & Tsiklakis, K. (2004) Clinical and radiographic comparison of three regenerative procedures in the treatment of intrabony defects. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **24**, 81-90.
- Pitaru, S., McCulloch, C. A. & Narayanan, S. A. (1994) Cellular

- origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *Journal of Periodontal Research* **29**, 81-94.
- Polimeni, G., Xiroupaidis, A. V. & Wikesjö, U. M. E. (2006) Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology* **2000** **41**, 30-47.
- Reynolds, M. A., Aichelmann-Reidy, M. E., Branch-Mays, G. L. & Gunsolley, J. C. (2003) The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**, 227-265.
- Ripamonti, U., Heliotis, M., Rueger, D. C. & Sampath, T. K. (1996) Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Archives of Oral Biology* **41**, 121-126.
- Ripamonti, U., Heliotis, M., van den Heever, B. & Reddi, A. H. (1994) Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon (*Papio ursinus*). *J Periodontal Res* **29**, 439-445.
- Satoh, A., Suzuki, M., Amano, T., Tamura, K. & Ide, H. (2005) Joint development in *Xenopus laevis* and induction of segmentations in regenerating froglet limb (spike). *Developmental Dynamics* **233**, 1444-1453.
- Sculean, A., Kiss, A., Miliauskaitė, A., Schwarz, F., Arweiler, N. B. & Hannig, M. (2008b) Ten-year results following treatment of intra-bony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 817-824.
- Sculean, A., Schwarz, F., Chiantella, G. C., Donos, N., Arweiler, N. B., Brex, M. (2007) Five-year results of a prospective, randomised controlled study evaluating treatment of intrabony defects with a natural bone mineral and GTR. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 72-77.
- Sculean, A., Windisch, P., Szendroi-Kiss, D., Horvath, A., Rosta, P., Becker, J., Gera, I. & Schwarz, F. (2008a) Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix derivative combined with a biphasic calcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects. *Journal of Periodontology* **79**, 1991-1999.
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. & Shi, S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149-155.
- Seo, B. M., Miura, M., Sonoyama, W., Coppe, C., Stanyon, R. & Shi, S. (2005) Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *Journal of Dental Research* **84**, 907-912.
- Sigurdsson, T. J., Nygaard, L., Tatakis, D. N., Fu, E., Turek, T. J., Jin, L., Wozney, J. M. & Wikesjö, U. M. (1996) Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **16**, 524-537.
- Silverio, K. G., Benatti, B. B., Casati, M. Z., Sallum, E. A. & Nociti, F. H., Jr. (2008) Stem cells: potential therapeutics for periodontal regeneration. *Stem Cell Reviews* **4**, 13-19.
- Stavropoulos, A., Sculean, A. & Karring, T. (2004) GTR treatment of intrabony defects with PLA/PGA copolymer or collagen bioresorbable membranes in combination with deproteinized bovine bone (Bio-Oss). *Clinical Oral Investigations* **8**, 226-232.
- Stavropoulos, A., Windisch, P., Szendroi-Kiss, D., Peter, R., Gera, I. & Sculean, A. (2010) Clinical and histologic evaluation of granular beta-tricalcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects: a report on five cases. *Journal of Periodontology* **81**, 325-334.
- Tal, H., Artzi, Z., Moses, O., Nemcovsky, C. & Kozlovsky, A. (2005) Guided periodontal regeneration using bilayered collagen membranes and bovine bone mineral in fenestration defects in the canine. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **25**, 509-518.
- Tonetti, M. S., Cortellini P, Lang N.P., Suvan, J. E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmoussis, I., Rasperini G, Rossi R, Silvestri M, Topoll H, Wallkamm B, Zybutz M (2004) Clinical outcomes following treatment of human intrabony defects with GTR/bone replacement material or access flap alone. A multicenter randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 770-776.
- Trombelli, L. & Farina, R. (2008) Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 117-135.
- Vouros, I., Aristodimou, E., Konstantinidis, A. (2004) Guided tissue regeneration in intrabony periodontal defects following treatment with two bioabsorbable membranes in combination with bovine bone mineral graft. A clinical and radiographic study. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 908-917.
- Weintraub, H. (1993) The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks and thresholds. *Cell* **75**, 1241-1244.
- Wolpert, L. (1988) Stem Cells : a problem in assymetry. *Journal of Cell Science* **10**, 1-19.
- Yukna, R. A., Krauser, J. T., Callan, D. P., Evans, G. H., Cruz, R. & Martin, M. (2000) Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of Periodontology* **71**, 1671-1679.

**Επικοινωνία:** Δομνίκη Χατζοπούλου, Turner Street, E1 2AD, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο, Τηλ: +44 20-78828639, Fax: +44 20-73777064, e-mail: d.chatzopoulou@qmul.ac.uk

**Correspondence:** Domniki Chatzopoulou, Turner Street, London E1 2AD, UK, Tel: +44 20-78828639, Fax: +44 20-73777064, e-mail: d.chatzopoulou@qmul.ac.uk