



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΙΣΗΓΗΣΗΣ

# Μεταμόσχευση αυτόλογων μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων μυελού φατνιακού οστού στην αναγεννητική θεραπεία των περιοδοντικών βλαβών. Κλινικές εφαρμογές σε ανθρώπους

## Transplantation of autologous alveolar bone marrow mesenchymal stem cells in the regenerative treatment of periodontal defects; human clinical applications

**Δανάη Α. Απατζίδου<sup>1</sup>,  
Αθηνά Μπακοπούλου<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Επίκουρη Καθηγήτρια Εργαστήριο Προληπτικής Οδοντιατρικής, Περιοδοντολογίας και Βιολογίας Εμφυτευμάτων, Οδοντιατρική Σχολή, Α.Π.Θ., Ελλάδα

<sup>2</sup> Επίκουρη Καθηγήτρια Εργαστήριο Ακίνητης Προσθετικής και Προσθετικής Εμφυτευματολογίας, Οδοντιατρική Σχολή, Α.Π.Θ., Ελλάδα

**Danae A. Apatzidou<sup>1</sup>,  
Athina Bakoroulou<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Assist. Professor. Department of Preventive Dentistry, Periodontology and Implant Biology, School of Dentistry, A.U.Th, Greece

<sup>2</sup> Assist. Professor. Department of Fixed Prosthesis & Implant Prosthodontics, School of Dentistry, A.U.Th, Greece

Η μελέτη του Global Burden of Disease (GBD) το 2010 με θέμα την παγκόσμια επιβάρυνση από νόσους είχε στόχο τη συστηματική ανάπτυξη συγκρίσιμων εκτιμήσεων για την επιβάρυνση από 291 νόσους και τραυματισμούς, καθώς και των συσχετισμένων 1.160 επιπτώσεων για την περίοδο 1990-2010 (Murray και συν., 2012a, b). Τα επιδημιολογικά στοιχεία σχετικά με την βαρεία περιοδοντίτιδα, τα οποία αφορούν τον επιπολασμό και τη συχνότητα για όλες τις χώρες, 20 ηλικιακές ομάδες και τα δύο φύλα κατά την περίοδο 1990-2010, αποκάλυψαν ότι ο επιπολασμός αυξάνεται σταδιακά με την ηλικία, εμφανίζοντας απότομη αύξηση μεταξύ της τρίτης και της τέταρτης δεκαετίας, η οποία οφείλεται σε μια κορύφωση στη συχνότητα στην ηλικία των 38 ετών περίπου (Kassebaum και συν. 2014). Οι συγγραφείς της μελέτης επισημαίνουν ότι οι υπεύθυνοι χάραξης πολιτικής χρειάζεται να είναι ενήμεροι για μια προβλέψιμα προχωρημένη επιβάρυνση από την βαρεία περιοδοντίτιδα. Η περιοδοντίτιδα συνιστά τη νόσο με τον έκτο υψηλότερο επιπολασμό στον κόσμο, λόγω της αύξησης του προσδόκιμου ζωής και της σημαντικής μείωσης στον επιπολασμό της συνολικής απώλειας δοντιών (Kassebaum και συν. 2014). Αυτές οι τάσεις στην προχωρημένη περιοδοντίτιδα είναι σημαντικές για τον σχεδιασμό οδοντιατρικών υπηρεσιών και εργατικού δυναμικού, καθώς και για την επικαιροποίηση των οδηγιών οδοντιατρικών σπουδών και τον ορισμό προτεραιοτήτων για έρευνα, ανάπτυξη, πολιτικές και χρηματοδότηση (Murray and Lopez, 1996, Murray και συν., 2012b).

The Global Burden of Disease (GBD) 2010 study aimed to systematically produce comparable estimates of the burden of 291 diseases and injuries and their associated 1,160 sequelae from 1990 to 2010 (Murray et al., 2012a, b). The epidemiological data regarding severe periodontitis in terms of prevalence and incidence for all countries, 20 age groups and both genders between 1990 and 2010 revealed that prevalence increased gradually with age, showing a steep increase between the third and fourth decades of life that was driven by a peak in incidence at approximately 38 years of age (Kassebaum et al. 2014). The authors of the study point out that policy makers need to be aware of a predictable increasing burden of severe periodontitis which constitutes the sixth-most prevalent condition in the world due to an increasing life expectancy and a significant decrease in the prevalence of total tooth loss (Kassebaum et al. 2014). These trends in advanced periodontitis are important for planning dental services and workforce, as well as for updating the dental curriculum and determine priorities for research, development, policies, and funding (Murray and Lopez, 1996; Murray et al., 2012b).

Early findings demonstrated that a limited and

Τα πρώτα ευρήματα έδειξαν μια περιορισμένη και απρόβλεπτη βελτίωση, σε ότι αφορά την απώλεια πρόσφυσης και την ακτινογραφική πλήρωση γωνιωδών βλαβών μετά την εφαρμογή μεθόδων μη χειρουργικής περιοδοντικής θεραπείας (Becker και συν. 1988). Μεγαλύτερη βελτίωση σε ότι αφορά την απώλεια πρόσφυσης και την οστική πλήρωση αναφέρθηκε μετά την εφαρμογή διαφορετικών διαδικασιών με κρημνό (Becker και συν. 1988), υποδηλώνοντας ότι τα στοιχεία γωνιωδών βλαβών που αφορούν 3 και 2 τοιχώματα, θεραπεύονται κατά προβλέψιμο τρόπο με υψηλό ποσοστό οστικής πλήρωσης (Polson και συν. 1978). Μια περισσότερο προηγμένη θεραπευτική προσέγγιση παρουσιάστηκε από τους Nyman και συν. (1982), οι οποίοι έδειξαν ότι είναι δυνατή η αναγέννηση οστικών βλαβών στους ανθρώπους σύμφωνα με τις αρχές της κατευθυνόμενης ιστικής αναγέννησης (Guided Tissue Regeneration - GTR). Με την πάροδο των ετών εφαρμόστηκαν διάφορες χειρουργικές τεχνικές για την αναγέννηση των ιστών μετά από περιοδοντίτιδα, χρήση μεμβρανών, οστικών μοσχευμάτων, βιοϋλικών με ιδιότητες οστεοεπαγωγής και οστεοκαθοδήγησης (Giannobile και συν. 2001, Tonetti και συν. 2002, Needleman και συν. 2006, Cortellini και συν. 2012, Khoshkam και συν. 2015). Ωστόσο, αυτές οι διαδικασίες έχουν ορισμένους περιορισμούς όσον αφορά στις δυνατότητες αποκατάστασης, την ενόχληση του ασθενή και τη σταθερότητα του αποτελέσματος με την πάροδο του χρόνου (Becker και συν. 1999, Bartold και συν. 2006, Tu και συν. 2012). Οι τελευταίοι υπογραμμίζουν την ανάγκη στην κλινική για εναλλακτικές θεραπείες που χρησιμοποιούν βελτιωμένα οστικά υποκατάστατα και στρατηγικές αποκατάστασης βασισμένες στα κύτταρα (Rao and Stegeman, 2013).

Η μηχανική ιστών και η αναγεννητική ιατρική είναι μια νέα θεραπευτική προσέγγιση που θα αξιολογηθεί για τις δυνατότητες αποκατάστασης της περιοδοντικής στήριξης σε μια κατηγορία ασθενών που πάσχουν από προχωρημένη περιοδοντίτιδα, μια χρόνια φλεγμονώδη νόσο που επηρεάζει σοβαρά το περιοδόντιο και οδηγεί σε σημαντική απώλεια των υποστηρικτικών ιστών γύρω από τα δόντια και -χωρίς θεραπεία- τελικά σε απώλεια δοντιών. Η περιοδοντίτιδα έχει περιγραφεί ως πολυπαραγοντική μη αντιστρεπτή και 'αθροιστική' πάθηση, η οποία ξεκινά και προκαλείται από βακτήρια και παράγοντες σχετικούς με τον ξενιστή, ενώ με την πάροδο των ετών έχουν προταθεί διάφορες εξελιγμένες διαγνωστικές και θεραπευτικές μέθοδοι (Kinane και συν. 2011). Λόγω της φύσης της προχωρημένης περιοδοντίτιδας, οι ασθενείς που προσβάλλονται από αυτή τη νόσο θα χρειαστούν πιθανόν αναγεννητική θεραπεία για την αποκατάσταση των περιοδοντικών βλαβών σε διάφορες φάσεις της ζωής τους. Ο πληθυσμός θα ωφεληθεί από αυτή τη νέα θεραπευτική προσέγγιση για διάφορους λόγους: τα αυτόλογα μετεγχευματικά βλαστικά κύτταρα μυελού (BM-MSC) που παράγονται είναι γενετικά πανομοιότυπα και θα αναπτυχθούν έτσι ώστε να προκύψουν επαρκείς ποσότητες για πολλαπλές εφαρμογές περιοδοντικής αναγεννητικής θεραπείας στη διάρκεια της ζωής τους. Αυτά τα κύτταρα θα αποτελέσουν

unpredictable amount of gain in clinical attachment level and radiographic bone fill of infrabony defects followed nonsurgical periodontal treatment modalities (Becker et al. 1988). A greater extent of clinical attachment level gain and bone fill has been reported following different flap procedures (Becker et al. 1988), indicating that the 3- and the 2- wall components of the infrabony defect predictably heal with a high degree of bone fill (Polson et al. 1978). A more sophisticated treatment approach was introduced by Nyman and co-workers (1982) who showed that it is possible to regenerate vertical osseous defects in humans according to the principles of GTR. Over the years regeneration of the diseased periodontal tissues has been sought by various surgical techniques, use of occlusive barrier membranes, bone grafts, biomaterials with osteoconductive and osteoinductive properties (Giannobile et al 2001; Tonetti et al. 2002; Needleman et al. 2006; Cortellini et al. 2012; Khoshkam et al. 2015). However, these procedures have certain limitations in terms of reparative potential, morbidity, and stability over time (Becker et al. 1999; Bartold et al. 2006; Tu et al. 2012). The latter underlies the need for alternative therapies using improved bone graft substitutes and cell-based repair strategies into the clinic (Rao and Stegeman, 2013).

Tissue engineering and regenerative medicine is a novel treatment approach that will be assessed for its periodontal apparatus repair potential in a category of patients that suffer from advanced periodontitis; a chronic inflammatory disease which severely affects the periodontium and results in considerable loss of supporting tissues around teeth and if left untreated finally leads to tooth loss. Periodontitis has been described as a multifactorial irreversible and cumulative condition, initiated and generated by bacteria and host factors and sophisticated diagnostic and treatment methods have been suggested over the years (Kinane et al. 2011). Due to the nature of advanced periodontitis, patients who are affected by this disease will probably be in need of regenerative treatment to repair periodontal defects on several occasions in their lives. The population will benefit from this novel treatment approach for a number of reasons; the derived autologous BM-MSCs are genetically identical and will be expanded to obtain adequate numbers for multiple applications of periodontal regenerative therapy throughout their lives; these cells will constitute a major source of cells for personal banking. In addition, the cells

σημαντική πηγή κυττάρων προς φύλαξη σε ατομική τράπεζα κυττάρων. Επιπλέον, θα είναι άμεσα διαθέσιμα χωρίς κανένα κίνδυνο λοίμωξης και, το πιο σημαντικό, θα αποφεύγεται η έντονη ενόχληση που συσχετίζεται με την επαναλαμβανόμενη ενδοστοματική συλλογή αυτόλογων μοσχευμάτων οστικών ή το πρόσθετο κόστος της χρήσης άλλων αναγεννητικών υλικών. Θα μπορούσαν να συλλέγονται βιοψίες οστών ή/και μαλακών ιστών από ασθενείς στη διάρκεια οδοντιατρικών διαδικασιών ρουτίνας (δηλαδή εξαγωγής δοντιού) κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής τους και τα αυτόλογα μετεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προκύπτουν θα μπορούσαν να υποβληθούν σε κρυοσυντήρηση μέχρις ότου χρειαστούν για μελλοντική χρήση στην περιοδοντική αναγέννηση.

Η παρουσίαση εστιάζει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αναπαραγωγή της περιοδοντικής στήριξης σε ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα, με στόχο την εφαρμογή της θεωρίας στην καθημερινή πρακτική, μέσω της ανάπτυξης εξατομικευμένων θεραπευτικών μεθοδολογιών και οδοντιατρικών διαδικασιών φιλικών προς τον χρήστη για τη φόρτωση των βλαστικών κυττάρων σε ικρίωματα για τοπική εφαρμογή. Προκλινικές μελέτες και πιλοτικές κλινικές μελέτες σε ανθρώπους που διενεργήθηκαν στο Εργαστήριο Προληπτικής Οδοντιατρικής, Περιοδοντολογίας και Βιολογίας Εμφυτευμάτων του ΑΠΘ, συμβάλλουν σε αυτό τον σκοπό παρέχοντας, από τη μια πλευρά, τη βιολογική θεωρία και τα στοιχεία που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα αυτών των κλινικών εφαρμογών και, από την άλλη, τυχόν θεραπευτικούς και μεθοδολογικούς περιορισμούς. Παρουσιάζεται η λεπτομερής περιγραφή νέων χειρουργικών διαδικασιών με σκοπό την ανάπλαση των μεσοδόντιων ενδοοστικών περιοδοντικών βλαβών και των περιοδοντικών μαλακών και σκληρών ιστών, με βάση κλινικές, ακτινολογικές, ανοσολογικές και μικροβιολογικές παραμέτρους. Επιπλέον, περιγράφεται βήμα προς βήμα η αιτιολόγηση της ανάπτυξης εργαστηριακών πρωτοκόλλων για τη δημιουργία βλαστικών κυττάρων κλινικού βαθμού που συμμορφώνονται με τις Ορθές Ιατρικές Διαδικασίες και τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Παρουσιάζονται επίσης η ανάπτυξη και ο σχεδιασμός βιοσυμβατών ικρίωμάτων ορισμένων ιδιοτήτων που, όταν φορτωθούν με βιώσιμα κύτταρα, παραμένουν σταθερά σε συνθήκες που μιμούνται αυτές μιας περιοχής με χρόνια περιοδοντίτιδα μέσω εξελιγμένων πειραμάτων *in-vitro* και *in-vivo*. Τα ευρήματα αυτών των προκαταρκτικών μελετών αναμένεται να καθοδηγήσουν τη μετάβαση από τον πάγκο του εργαστηρίου στην κλινική και να συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, οι οποίες μπορούν να επεκταθούν στην πλειοψηφία του πληθυσμού, ο οποίος θα είναι ο τελικός αποδέκτης αυτής της νέας τεχνολογίας.

are immediately available with no risk for infection and more importantly, high morbidity associated with repeated intra-oral collection of autologous bone grafts or additional costs for using other regenerative materials are avoided. Biopsies of bone and/or soft tissues could be harvested from individuals during routine dental procedures (i.e. tooth extraction) in the earlier years of their life and the derived autologous mesenchymal stem cells could be cryopreserved until needed for future use in periodontal regeneration.

The current presentation focuses onto novel treatment approaches in the reconstruction of the periodontal apparatus in chronic periodontitis patients aiming to bring theory to daily practice by developing personalized treatment methodologies and user-friendly chair-side procedures for loading stem cells onto scaffolds for locally delivery. Pre-clinical studies and pilot human clinical studies conducted in the Department of Preventive Dentistry, Periodontology and Implant Biology, Aristotle University of Thessaloniki contribute towards this end by providing the biological rationale and the evidence for the efficacy of these clinical applications on one hand, and any therapeutical and methodological limitations on the other hand. Detailed description of novel surgical procedures in order to reconstruct interdental intrabony periodontal defects and periodontal soft and hard tissues, are presented based on clinical, radiographic, immunological and microbiological parameters. In addition, the justification of the development of laboratory protocols for the establishment of clinical grade stem cells that are in accordance with Good Medical Procedures and the European Union regulations are described step-by-step. The development and the design of biocompatible scaffolds of certain properties that when loaded with viable cells they remain stable in conditions that mimic those of a diseased site with chronic periodontitis is also presented via sophisticated *in-vitro* and *in-vivo* experiments. The findings of these preliminary studies are expected to drive the transition from laboratory bench to the clinic and establish novel treatment approaches, which can be extended to the majority of the population, who will be the final recipient of this novel technology.



## Βιβλιογραφία - References

- Bartold P.M., Shi S., Gronthos S. (2006) Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology 2000* **40**: 164-172.
- Becker W, Becker BE, Larry B, Prichard JP, Caffesse R, Rosenberg E. (1988) New attachment after treatment with root isolation procedures: report for treated Class III and II furcations and vertical osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* **8**, 2-16.
- Becker W., Becker B.E. (1999) Periodontal regeneration: a contemporary evaluation. *Periodontology 2000*: 104-114.
- Cortellini P. (2012) Minimally invasive surgical techniques in periodontal regeneration. *Journal of Evidence-Based Dental Practice* **12** (3 Suppl): 89-100.
- Giannobile W.V., Lee C.S., Tomala M.P., Tejada K.M., Zhu Z. (2001) Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *Journal of Periodontology* **72**: 815-823.
- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. (2014) Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research* **93**: 1045-1053.
- Khoshkam V., Chan H.L., Lin G.H., Mailoa J., Giannobile W.V., Wang H.L., Oh T.J. (2015) Outcomes of Regenerative Treatment with rhPDGF-BB and rhFGF-2 for Periodontal Intrabony Defects: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* **42**: 272-280.
- Kinane D.F., Preshaw P.M., Loos B.G.; Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology (2011) Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology *Journal of Clinical Periodontology* **38**, Suppl 11: 44-8.
- Murray CJ, Lopez AD (1996). Evidence-based health policy: lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* **274**:740-743.
- Murray CJ, Ezzati M, Flaxman AD, Lim S, Lozano R, Michaud C, et al. (2012a). GBD 2010: design, definitions, and metrics. *The Lancet* **380**:2063-2066.
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. (2012b). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**:2197-2223.
- Needleman I., Worthington H.V., Giedrys-Leeper E., Tucker R. (2006) Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 2. Art. No.: CD001724. DOI: 10.1002/14651858.CD001724.pub2.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rilander H. (1982) New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **9**, 290-296.
- Polson AM, Heijl LC. (1978) Osseous repair in infrabony periodontal defects. *Journal of Clinical Periodontology* **5**: 13-23.
- Rao R.R., Stegemann J.P. (2013) Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy* **15**: 1309-1322.
- Tonetti M.S., Lang N.P., Cortellini P., Suvan J.E., Adriaens P., Dubravec D., Fonzar A., Fourmouis I., Mayfield L., Rossi R., Silvestri M., Tiedemann C., Topoll H., Vangsted T., Wallkamm B. (2002) Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. A multicentre randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **29**: 317-325.
- Tu Y-K., Needleman I., Chambrone L., Lu H-K., Faggion C.M. Jr. (2012) A Bayesian network meta-analysis on comparisons of enamel matrix derivatives, guided tissue regeneration and their combination therapies. *Journal of Clinical Periodontology* **39**: 303-314.