
Vevsregenerasjon med amelogenin-klinisk erfaring og fremtidsperspektiver

JOHAN CASPAR WOHLFAHRT,
JANNE ELIN RESELAND OG
STÅLE PETTER LYNGSTADAAS

Klinisk erfaring med bruk av amelogenin i odontologisk praksis

Amelogenin i form av emaljematrisderivatet Emdogain® (EMD, Straumann Inc., Basel, Sveits) har vært på markedet siden midten av 1990-tallet for å regenerere periodontale vev (cement, periodontalligament og alveolært ben). De første vitenskapelige undersøkelsene om klinisk bruk av emaljematrisproteiner ble publisert i 1997, og siden da har flere uavhengige forskningsgrupper arbeidet med å kartlegge virkningsmekanismene og utvikle det kliniske potensialet for amelogenin. Esposito og medarbeidere presenterte nylig en systematisk gjennomgang av den kliniske vitenskapelige dokumentasjonen som foreligger om bruk av EMD for periodontal regenerasjon (1). De konkluderer med at behandling med EMD gir stabil og forutsigbar regenerasjon av tapt peridontalt feste og redusert festetap (målt klinisk i form av minsket lommedybde). De oppgir at resultatet etter kirurgisk behandling med EMD er tilsvarende det som tidligere har vært oppnådd ved optimal bruk av membraner i såkalt styrt vevsregenerasjon (GTR) prosedyrer.

Det begynner nå også å komme rapporter med langtidsoppfølginger etter regerativ behandling med EMD. Nylig publiserte He-

den og Wennström en oppfølging av en serie pasienter med i alt 107 periodefekte behandlet med Emdogain (2). De rapporterer stabil periodontal festegevinst og forbedring i lommedybdemåling ved 5-års kontroll sammenliknet med ettårskontrollen.

Kasusseleksjon og prognosevurdering i henhold til EMD-potensiale for periodontal regenerasjon fremstilles ofte av tannleger som relativt vanskelig. Det ble nylig blant annet foreslått å bruke en radiologisk målbar defektvinkel (vinkelen mellom rot-overflaten og bendefektens vertikale overflate) til å bedømme prognosen for regenerasjon med EMD = spare between lines. Det er dog selvsagt viktig å trekke frem andre faktorer som for eksempel tobakksbruk, systemiske tilstander, defekt- og rotmorfologi som også bør vurderes før EMD brukes. Lengre klinisk erfaring med EMD og derigjennom en bedret kirurgisk teknikk, særlig med hensyn på flap-design, mykvevsmanipulering og grundig depurasjon fremholdes også ofte som viktige faktorer for et godt resultat.

Under studiene av effekten av EMD i periodontal regenerasjon har det fremkommet informasjon som indikerer at amelogenin også har andre funksjoner og potensielle bruksområder utover behandling av periodontale lesjoner. Vi ønsker her å belyse noen av amelogenins biologiske egenskaper og diskutere mulige fremtidige nye kliniske applikasjoner for amelogenin.

Cellulære og molekulære virkningsmekanismer

Senere års utvikling innen basal celledforskning har ført til et paradigmeskifte også innen forskning på periodontal regenerasjon. En nyere strategi for vevsregenerasjon er såkalt biomimikk, det vil si bruk av biologiske mediatorer for å etterligne naturens egne prosesser og mekanismer for tilheling og reparasjon, og derved utnytte kroppens eget potensiale for gjenskaping av tapt vev fullt ut. Med biologiske mediatorer forstår vi her biomolekyler som kan stimulere eller regulere vevsregenerasjon, som for eksempel

amelogenin. Andre eksempler på slike molekyler som anvendes i biomedisin for vevsregenerasjon er vekstfaktorer, hormoner, integrinbindende peptider („RGD-peptider“) og kollagener.

Biologiske mediatorer utøver sin effekt gjennom en rekke forskjellige mekanismer som påvirker cellers vekst og modning, evne til forflytning og adhesjon (til vev, strukturer og andre celler) og sekresjon av nye faktorer som regulerer andre cellers vekst og utvikling. De største fysiologiske utfordringene ved all vevsregenerasjon er mekanismer som påvirker det omkringliggende cellulære miljøet, tiden som er tilgjengelig, muligheten for opprettholdelse av struktur mens regenerasjonen pågår, og styrken til den nydannede vevsstrukturen. Summen av dette er at beinvev er svært vanskelig å erstatte da modning av cellene som står for oppbygning, mineralisering og remodellering av beinvev og vekst (osteoblaster), krever fem ganger lengre tid enn hva cellene som bryter ned og resorberer beinvev (osteoklaster), trenger.

Amelogenin er stabile, hydrofobe ekstracellulære matriseproteiner som i hovedsak skiller ut av ameloblaster under dannelsen av emalje. I emaljematrisen utgjør amelogenin om lag 90% av den organiske delen. Amelogenin er også antatt å være den viktigste aktive komponenten i EMD. Dette underbygges også med at både rekombinant amelogenin og rensset amelogenin har samme bioaktivitet som EMD i cellestudier.

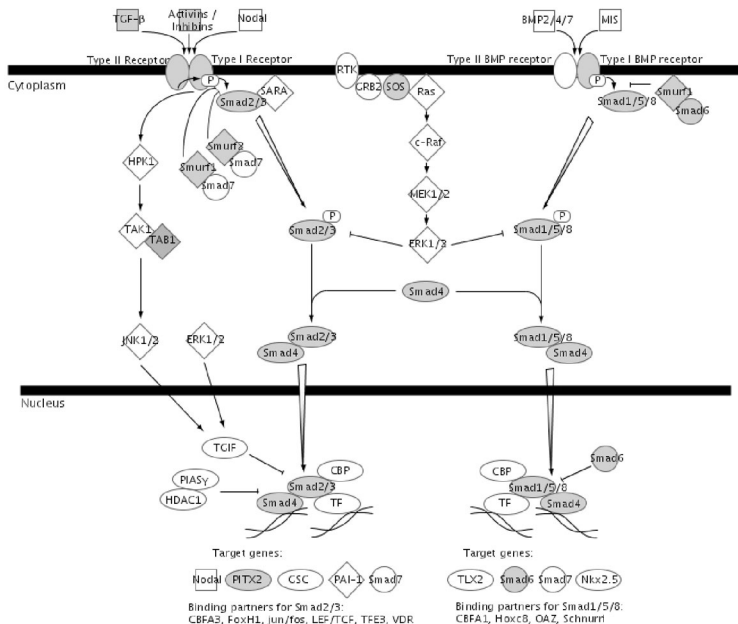
Mange *in vitro* og *in vivo* eksperimenter har vist at EMD og amelogenin påvirker flere celletyper som anses å være viktige for regenerasjon av tapt periodontalt vev, nydannelse av rotcement og nydannelse av periodontalligamentet og alveolart bein. Mens EMD og amelogenin er vist å stimulere celletyper av mesenky-malt opphav, bl.a. ved økt cementoblastaktivitet og stimulert cellevekst og modning av osteoblaster, hemmer de epitelcellers vekst og utvikling. Dette er viktig og interessant ettersom en av de antatt viktigste forutsetningene for en vellykket periodontal regenerasjon er eksklusjon av epitelceller til fordel for bindevevs-celler fra periodontalligamentet.

Tabell 1. De viktigste biologiske funksjonene og antall gener i osteoblaster reguleres mer enn tofold av EMD (3)

Funksjon	Antall gener regulert
Utvikling og funksjon av karsystemet	17
Celle til celle; signalering og interaksjon	25
Hvorav binding til andre celler	17
Cellulært forsvar og reparasjon	23
Cellulær vekst og proliferasjon	20
Hvorav proliferasjon	17
Hvorav vekst	5
Hvorav kolonidannelse (modning)	3
Molekylær transport	39
Hvorav mobilisering av Ca ²⁺	22
Cellulær signalisering	98
Celleforflytning	40
Hvorav cellerekruttering (homing)	34
Utvikling og funksjon av muskel-skjelettsystemet	19
Hvorav vevsutvikling	18

For å kunne forstå de ulike effektene amelogenin har på forskjellige vev, må man studere hvilke prosesser som påvirkes i de ulike cellene. Vi har vist at amelogenin tas opp aktivt av humane osteoblaster. Selv om ingen har påvist noen egen reseptor for amelogenin ennå, skjer det cellulære opptaket av amelogenin gjennom områder på cellemembranen som styrer reseptormediert opptak (3).

Etter at amelogenin er bundet til cellemembranen og tatt opp i cellen påvirker det cellenes evne til å uttrykke og skille ut proteiner som er viktig for nydannelse og vekst av vev. I Tabell 1 har vi forsøkt å gi en oversikt over antall og funksjon av gener i beindannende celler som øker vesentlig etter stimulering med amelogenin. Svært mange av disse genene er involvert i cellulære prosesser relatert til nydannelse og vekst, men en ikke ubetydelig del av produktene fra disse genene er også med å påvirke andre (nærliggende) cellers aktivitet, funksjon og struktur.



Figur 1. TGF-β-signalveien i beindannende celler er påvirket av EMD. Skraverte (grå) symboler representerer gener i denne signalveien som er regulert.

Det er tidligere blitt rapportert at EMD har TGF-β-lignende aktivitet, og at denne aktiviteten bidrar til EMDs effekter på ulike celler, men hvilke mekanismer som er involvert er ikke kjent. Vi finner at flere gener i TGF-β-signalveien i beindannende celler er påvirket av EMD (se Fig. 1).

I benvev øker amelogenin-uttrykket av vevsspesifikke modningsmarkører som alkalisk fosfatase (ALP), kollagen og osteoclastin. Parallelt med en stimulering av bendannelse reguleres også osteoclasters funksjon og aktivitet gjennom økt sekresjon av proteiner som IL-6 og osteoprotegrein. Nettoeffekten er økt bendannelse.

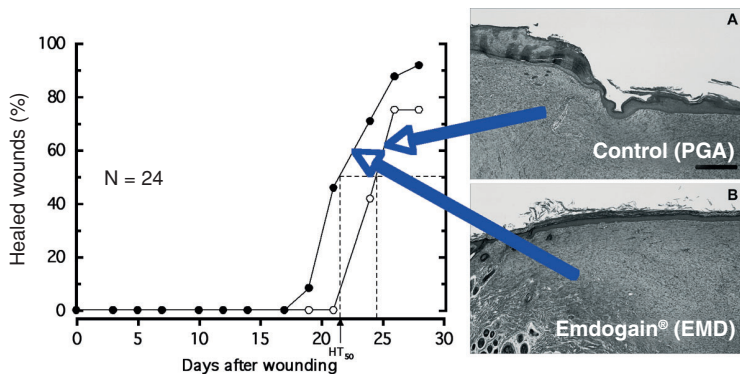
Den gjeldende dogmen har vært at amelogenins viktigste virkningsmekanisme er å initiere regenerasjon av periodontalt vev ved å rekruttere cementoblaste til den behandlede rotover-

flaten og stimulere disse til nydannelse av rotcement. Nydannelsen av rotcement vil så sekundært føre til regenerasjon av de andre periodontale vevene. Stadig flere studier viser nå imidlertid at amelogenin og EMD også interakterer direkte med mange andre typer celler. Man tror derfor nå at amelogenin har en mer direkte rolle i regenerasjonen av alle vevskomponentene i tenne-nes støtteapparat. Dette er særdeles interessant fordi det åpner for nye og spennende kliniske applikasjoner for amelogenin.

Fremtidige applikasjoner for amelogenin

Beinregenerasjon med EMD

I *in vitro* studier med primære humane beinceller har man vist at amelogenin alene kan stimulere til økt beindannelse (3). Videre har det også i *in vivo* studier av rotter blitt vist at EMD også kan appliseres i ekstraorale beindefekter (femur) og fremskynde dannelsen av trabekulært beinvev (4). Om disse og andre tilsvarende prekliniske funn viser seg å holde mål også i klinikken er ennå ikke bekreftet, men tanken er selvsagt meget interessant. Det er hittil publisert et fåtall vitenskapelige studier hvor man har testet kombinasjoner av EMD og amelogenin med ulike typer av beinrestatningsmaterialer, men resultatene er ikke entydige. Basert på disse dataene er det for tidlig å uttale seg om muligheten for å anvende amelogenin for induksjon av beindannelse i store bende-fekter, og det er langt fra cellestudier til klinisk appliserbare for-muleringer som både ivaretar amelogeninets biologiske aktivitet og samtidig har styrke og holdfasthet nok til å kunne anvendes i beindefekter i belastede knokler. Tiden fremover vil vise om re-sultatene fra de prekliniske studiene kan omsettes til klinisk bruk for regenerasjon av beinvev.



Figur 2. Sårtilheling med EMD; HT50 angir tidspunktet der halvparten av sårene har grodd og er dekket av epitel. Legg merke til at sårgruppen behandlet med EMD når HT50 3-4 dager før kontrollsårene. Se også at kontrollgruppens sår flater ut på 75% tilhelte sår, mens gruppen med EMD behandlede sår når 92 % tilheling etter 4 uker, og trenden er fortsatt økende (5).

Sårtilheling med EMD

En vanlig iakttakelse etter regenerasjonskirurgi med amelogenin er en usedvanlig god sårtilheling samt minimale subjektive postoperative symptomer. Det har vært foreslått flere grunner for dette, fra at amelogenin stimulerer bindevevsvekst til at formuleringen EMD er laget med hemmer bakterievekst. I 2004 presenterte Mirastschijski og medarbeidere en eksperimentell studie der man viste for første gang at amelogenin i form av EMD gir en forbedret sårtilheling (5) (Fig. 2).

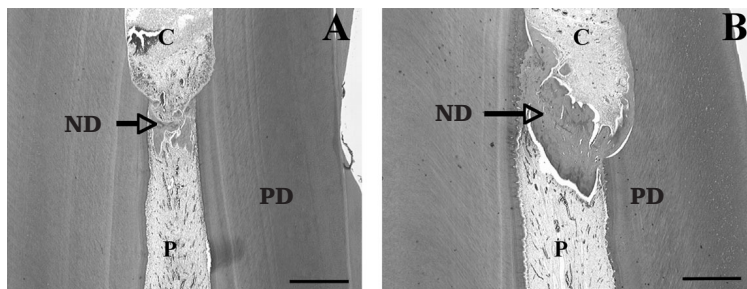
Særlig fremtredende var den kraftig økede forekomsten av granulasjonsvev som jo spiller en viktig rolle i sårtilhelingen og som danner basis for videre epitelialisering av såret. Hva dette beror på er ennå uklart, men det er foreslått at amelogenin stimulerer dannelsen av nye kapillærer ved å indusere økt sekresjon av *vascular endothelial growth factor* (VEGF) og *matrix metalloproteinase-2* (MMP-2) som i sin tur leder til økt angiogenese og produksjon av granulasjonsvev. Tilsvarende mekanisme er tidligere vist i

flere *in vitro* studier. Amelogenin i form av produktet Xelma® (Mölnlycke AB, Sverige) ble i 2005 introdusert på det europeiske markedet for behandling av kroniske leggsår. Kliniske fase to og tre studier har så langt vist lovende, stabile resultater uten bivirkninger, og det er forventet at dette produktet blir gullstandard for institusjonsbehandling av kroniske sår hos eldre og hos diabetes pasienter.

Behandling av pulpaskader med amelogenin

Det ble tidlig vist at amelogenin stimulerer bindevevsceller til proliferasjon og differensiering. Det har også vært kjent at amelogenin deltar i modning og vekst av pulpaceller og dannelse av dentin under tann dannelsen. Denne kunnskapen er interessant med tanke på sekundærdentindannelse etter traumatisering av pulpa med risiko for irreparable pulpaskader. Man har lenge visst at pulpavev har gode forutsetninger for å danne reparativt dentin, selv hos voksne pasienter. Mekanismene bak dette regenerative potensialet er ikke fullstendig klarlagt eller utnyttet, og per i dag baserer man behandling av blottlagt pulpa på at applisering av calciumhydroxid-holdige materialer kan lede til sekundærdentindannelse. Dette er kun til dels bevist, og i mange tilfeller er effekten i stedet interne resorpsjoner og pulpanekrose, med rotfylling som endelig resultat. Flere vitenskapelige undersøkelser som er blitt publisert siden 2001 viser at et alternativ til de pulpa-overkappings-materialer som er i bruk i dag, kan være amelogenin. Blant annet har *in vivo* studier av gris sammenlignet effekten av EMD med Dycal® ved pulpateksjon etter pulpotomi (6). De histologiske funnene er meget interessante og viser en signifikant bedre sekundærdentindannelse i tenner behandlet med amelogenin (se Fig. 3).

Pulpa behandlet med EMD viser ingen tegn på nekrose eller irreversible pulpaskader. Tilsvarende forsøk på friske pasienter



Figur 3. A viser grisetann (incisiv) etter pulpotomi og behandling med Dycal® etter 2 uker. B viser tilsvarende tann behandlet med amelogenin etter 2 uker. C er Kavitet, ND er Nytt Dentin, P er pulpa og PD er Primærdentinen. Skalabar er 1 mm.

(premolarer som skulle ekstraheres av kjeveortopediske årsaker) ble nylig presentert av Olsson og medarbeidere al. (7). Her viser forfatterne at tenner behandlet med EMD istedenfor calciumhydroksid gir mindre postoperativt ubehag og har signifikant økt nydannelse av pulpalt hardvev. Forfatterne konkluderer dog med at EMD i sin nåværende formulering ikke er praktisk anvendbar i klinikken da den ikke gir god nok mulighet for tett overfylling og dermed nedsatt beskyttelse mot invaderende mikroorganismer. Basert på disse interessante funn er det sannsynlig at amelogenin har et stort potensial som biologisk materiale for induksjon av dentinregenerasjon. Det burde derfor være en viktig oppgave å utvikle formuleringer med amelogenin som er praktisk anvendbare i endodontiske prosedyrer.

Reimplantasjon av eksartikulerte tenner med amelogenin

Allerede på et tidlig tidspunkt ble det spekulert i om man kunne behandle rotoverflaten på eksartikulerte tenner med EMD før reimplantasjon. Ideen var å utnytte amelogenins biologiske egenskaper for å unngå rotresorpsjoner og ankylose etter traumer.

Tidlige kliniske kasuistikker og dyreeksperimentelle studier viste til dels lovende resultater, men i løpet av de seneste årene er en hel del motstridende data blitt presentert. Blant annet har Araujo og medarbeidere utført en eksperimentell studie av hunder som viste at applisering av EMD ikke ga signifikant forskjell i forekomsten av rotresorpsjoner og ankylose for tenner reimplantert etter ekstraksjon med påfølgende fjerning av rothinnen (8). Tilsvarende funn er også gjort av Schjott og Andreassen i en klinisk studie (9). Her studerte forfatterne både behandling med EMD av tenner med en allerede etablert ankylose samt nye eksartikulerte tenner. De konkluderte med at EMD ikke fører til redusert forekomst av rotresorpsjoner, da samtlige behandlede tenner i denne studien viste tendens til rotresorpsjoner etter behandling. Så langt er derfor litteraturen uklar med hensyn til amelogenin-behandling av eksartikulerte tenner, og ytterligere studier er nødvendig for å utrede denne indikasjonen.

Primær tilheling rundt implantater i bein

Dentale implantater har en høy grad av klinisk suksess, men alt etter som denne type behandling blir mer vanlig øker krav til estetikk og funksjon både fra pasient og behandler. Fordi kliniske studier har vist så gode resultater med tannimplantater har man etter hvert dristet seg til å utvide indikasjonene for implantatbehandling til tidligere og mer kompromitterte kasus.

Utfordringene i dagens implantologi består i å plassere implantater i beinvev av dårlig kvalitet og hos pasienter som tidligere ikke fikk behandling av medisinske grunner. For å kunne sikre et vellykket resultat også i disse pasientgruppene har man begynt å utvikle nye strategier for modifikasjon av implantatoverflaten for derved å kunne få til en raskere og bedre osseintegrasjon.

Behandling av implantatoverflaten med ulike vekstfaktorer og andre biologiske mediatorer har vært forsøkt for å stimulere beinvekst inntil implantatene. En strategi har vært å anvende

amelogenin for å stimulere beindannelse på implantatoverflaten, men forsøk som er utført har så langt ikke gitt det ønskede resultat. Slike eksperimenter er selvsagt også av interesse fra et annet synspunkt, nemlig å undersøke effekten av amelogenin direkte på beinceller hvor det ikke foreligger periodontalligament og såkalt funksjonell adaptasjon (dvs. beindannelse sekundært til rot-cement- og periodontalligamentdannelse). En *in vivo* studie av Franke Stenport og Johansson hadde som mål å undersøke om applikasjon av EMD i forbindelse med innsetting av titanimplantater ga en bedret osseointegrasjon (10). Studien viste at overflatebehandling av implantatene med EMD ikke ga øket stabilitet eller beintilvekst omkring implantatene. I stedet viste disse implantatene en redusert kvalitet i innfestingen, noe som resulterte i signifikant lavere verdier i „shear strength“ og „removal torque“. I kontrast til denne studien har Shimizu-Ishiura og medarbeidere vist at EMD kan bidra til forbedret osseointegrasjon (11). Denne forskergruppen gjorde tilsvarende forsøk som beskrevet over, men viser isteden positive histologiske funn etter applisering av EMD. Særlig peker disse forskerne på den økte forekomsten av trabekulært bein både 14 og 30 dager etter behandlingen. Cangiini og Cortelini har også rapportert om bruk av EMD ved direkte post-ekstraksjon innsetting av implantater for å stimulere til bedre osseointegrasjon (12). Også her så man at kombinasjonen med konvensjonell membranteknikk var mer fordelaktig enn anvendelse av EMD alene.

Fremdeles er litteraturen uklar angående effekten av amelogenin for forbedret beintilheling og osseointegrasjon ved implantologi. Det er klart at ytterligere forskning og utvikling må til før amelogenin kan benyttes til denne indikasjonen. Det vil også være interessant å studere effekten av EMD ved direkte belastning av implantater for å se om belastning påvirker resultatet av å behandle implantatoverflater med amelogenin.

Kirurgisk behandling av peri-implantitt med amelogenin

Det har også vært diskutert hvorvidt amelogenin kan stimulere til re-osseointegrasjon ved kirurgisk behandling av periimplantitt. I dag finnes ingen studier som verifiserer eller avkrefter en slik strategi, men det har vært antydning at dette kan være en mulighet. Det er også blitt foreslått at applikasjon av EMD ikke nødvendigvis genererer mer bein eller gir defektutfylling rundt et implantat rammet av peri-implantitt, men at progresjonen av sykdommen stopper opp og situasjonen stabiliseres. Det gjenstår dog mye forskning før dette blir en indikasjon for amelogenin.

Veien fremover

Interessen for klinisk anvendelse av amelogenin har helt siden produktet ble kommersielt tilgjengelig i form av EMD vært meget stor innen det odontologiske og i den senere tid også i det medisinske forskersamfunnet. Man har siden 1950-årene utviklet og beskrevet flere strategier for regenerasjon av tapte vevskomponenter som for eksempel periodontal-ligamentet. Amelogenin er det første biologiske produktet på markedet som har som mål å gjenskape fullverdige funksjonelle hardvev. Det rapporteres også om klare effekter på sårtilheling og at amelogenin også kan ha antimikrobiell effekt. Hittil er dog utfallet av de kliniske studier som er utført på utradisjonelle indikasjoner (foruten sårtilheling), blandede og gir ingen klare indikasjoner om fremtidige anvendelser. Ytterligere utvikling og studier er av stor betydning for å kunne utvikle amelogenin for nye indikasjoner med like gode kliniske resultater som dem som foreligger innen de aksepterte indikasjonsområdene (vertikale periodefekter og sårtilheling). Amelogenin er uten tvil et godt eksempel på en basalvitenskapelig kunnskap omsatt til et klinisk appliserbart produkt. Fremtiden vil vise om den økende kunnskapsmengden om amelogenin rom-

mer ytterligere behandlingsmetoder og nye kliniske indikasjoner for dette spennende tann-proteinet.

REFERENSER

- 1 Esposito M, Coulthard P, Thomsen P, Worthington HV. Enamel matrix derivative for periodontal tissue regeneration in treatment of intrabony defects: a Cochrane systematic review. *J Dent Educ* 2004; 68 (8): 834-44.
- 2 Heden G, Wennstrom JL. Five-year follow-up of regenerative periodontal therapy with enamel matrix derivative at sites with angular bone defects. *J Periodontol* 2006; 77 (2): 295-301.
- 3 Reseland JE, Reppe S, Larsen AM, Berner HS, Reinholt FP, Gautvik KM et al. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts. *Eur J Oral Sci* 2006; 114 (Suppl 1): 205-11.
- 4 Kawana F, Sawae Y, Sahara T, Tanaka S, Debari K, Shimizu M et al. Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. *Anat Rec* 2001; 264 (4): 438-46.
- 5 Mirastschijski U, Konrad D, Lundberg E, Lyngstadaas SP, Jorgensen LN, Agren MS. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. *Wound Repair Regen* 2004; 12 (1): 100-8.
- 6 Nakamura Y, Hammarstrom L, Lundberg E, Ekdahl H, Matsumoto K, Gestrelus S et al. Enamel matrix derivative promotes reparative processes in the dental pulp. *Adv Dent Res* 2001; 15: 105-7
- 7 Olsson H, Davies JR, Holst KE, Schroder U, Petersson K. Dental pulp capping: effect of Emdogain Gel on experimentally exposed human pulps. *Int Endod J* 2005; 38 (3): 186-94.
- 8 Araujo M, Hayacibara R, Sonohara M, Cardaropoli G, Lindhe J. Effect of enamel matrix proteins (Emdogain[®]) on healing after re-implantation of „periodontally compromised“ roots. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (10): 855-61.
- 9 Schjott M, Andreasen JO. Emdogain does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: a clinical study. *Dent Traumatol* 2005; 21 (1): 46-50.

- 10 Franke Stenport V, Johansson CB. Enamel matrix derivative and titanium implants. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (4): 359-63.
- 11 Shimizu-Ishiura M, Tanaka S, Lee WS, Debari K, Sasaki T. Effects of enamel matrix derivative to titanium implantation in rat femurs. *J Biomed Mater Res* 2002; 60 (2): 269-76
- 12 Cangini F, Cornelini R. A comparison between enamel matrix derivative and a bioabsorbable membrane to enhance healing around transmucosal immediate post-extraction implants. *J Periodontol* 2005; 76 (10): 1785-92.