



Untersuchung der Zementogenese im Hinblick auf die Mikrozirkulation



Takahiro Nobuto, DDS, PhD¹/Hiromi Tanda, DDS, PhD²
 Takaharu Shimizu, DDS, PhD³/Tomoo Kono, DDS, PhD⁴
 Fumihiko Suwa, DDS, PhD⁵/Hisao Imai, DDS, PhD⁶

In dieser Studie wurde mithilfe von mikrovaskulären Corrosion-Casts das Mikrozirkulationssystem während der Ablagerung von Zement nach einem Lappeneingriff dreidimensional beobachtet und die permeable Struktur des vaskulären Endothels untersucht. Aufgrund der sukzessiven vaskulären Veränderungen bestätigte sich, dass die Wundheilung nach einem Lappeneingriff in zwei Phasen abläuft. Der Übergang zwischen diesen Phasen erfolgte drei Wochen nach dem Eingriff. Dabei verschwanden neue Blutgefäße und eine Frühphase der Akkumulation von neuem Zement war zu erkennen. Die fibröse Reparatur erfolgte also in der ersten Phase und die Reparatur des Hartgewebes (d. h. die Bildung von Zement) in der zweiten Phase. Offenbar ist die metabolische Aktivität bei der Zementogenese aufgrund des Zustands der Blutgefäße niedrig, weshalb die Bildung von neuem Zement erschwert wird. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2009;29:251–259.)

¹ Privatpraxis, Osaka, Japan; Dozent, Division of Prosthetic Dentistry, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Universität Asahi, Gifu, Japan.

² Privatpraxis, Osaka, Japan.

³ Privatpraxis, Hyogo, Japan; Dozent, Department of Anatomy, Osaka Dental University, Osaka, Japan.

⁴ Dozent, Department of Periodontology, Osaka Dental University, Osaka, Japan.

⁵ Professor und Leiter, Department of Anatomy, Osaka Dental University, Osaka, Japan.

⁶ Professor und Leiter, Department of Periodontology, Osaka Dental University, Osaka, Japan.

Korrespondenz an: Takahiro Nobuto, 1-5-44, Tarumi-cho, Suita-shi, Osaka 564-0062, Japan; Fax: +81-6-6387-6506; E-Mail: fkaxt100@cwk.zaq.ne.jp, nobuto-t@bc5.sonet.ne.jp

Entzündete Zahnfleischtaschen werden mit verschiedenen Verfahren zur parodontalen Regeneration behandelt, zusätzlich zum apikal verschobenen Lappen und anderen Methoden zu ihrer Eliminierung¹. Für die parodontale Regeneration ist die Ablagerung von neuem Zement erforderlich, der Kollagenfasern enthält²⁻⁴. Zement hat allerdings keine Mikrozirkulation. Er braucht die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff für die Zementoblasten durch die Diffusion aus den Blutgefäßen im umliegenden Gewebe. Deshalb kann sich Zement nicht so leicht regenerieren wie Knochen⁵. Auf der Oberfläche des Alveolarknochens wurden nach Lappeneingriffen morphologische Veränderungen des periostalen Gefäßgeflechts im Zusammenhang mit der Knochenresorption/-bildung beobachtet. Die vaskulären Veränderungen in jeder Phase des Knochenmetabolismus wurden beschrieben⁶. Um die Osteoklasten an der Knochenoberfläche wurden nach einem Lappeneingriff sinusoidal strukturierte neue Blutgefäße beobachtet. Gleichzeitig wurden im Endothel der Blutgefäße Fenestrations mit hoher Permeabilität festgestellt⁶. Um neue Osteoblasten wurden im vaskulären Endothel vesiculär-vakuoläre Organellen (VVO)⁷ mit hoher Permeabili-



Abb. 1 Ergebnisse nach der Entfernung der Parodontalfasern und des Zements von der Wurzeloberfläche mit einer Kürette. Mit einem Parodontalmeißel wurde 1 mm Alveolarknochen entfernt. Der Mukoperiostlappen wurde reponiert und vernäht.

tät beobachtet. Das periostale Gefäßgeflecht versorgte diese osteogenen Zellen mit Energie⁶.

Im Bereich der Parodontaltherapie wurden zur Mikrozirkulation bisher nur wenige Studien mithilfe von vaskulären Corrosion-Casts durchgeführt. Es steht nur eine Serie mit Berichten zur Verfügung^{6, 8-14}. Bei der Verwendung von vaskulären Corrosion-Casts wird hydrophiler Kunststoff niedriger Viskosität in die Blutgefäße injiziert und das umliegende Weichgewebe mit Natriumhypochlorit oder Protease aufgelöst. Dies ermöglicht die dreidimensionale (3-D) Betrachtung der Beziehung zwischen der Mikrovaskulatur und dem Hartgewebe wie Zähnen und Knochen¹⁵⁻¹⁷ mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM). Um die Ablagerung von neuem Zement nach einem Lappeneingriff zu untersuchen, betrachteten die Autoren die sukzessiven Veränderungen in den Blutgefäßen um die Wurzeloberfläche (die 3-D-Mikrovaskulatur) und untersuchten die permeable Struktur des vaskulären Endothels. Aufgrund dieser Beobachtungen konnte die morphologische Beziehung zwischen der Zementogenese und der Mikrozirkulation definiert werden.

Material und Methode

Die Tiere

In der Studie wurden 48 bilaterale obere Schneidezähne (I1 bis I3) von acht ausgewachsenen männlichen und weiblichen Beagles (Körpergewicht: 10,5 bis 12,3 kg; Alter: 12 bis 16 Monate) verwendet. Die unbehandelten oberen Zähne dienten zur Kontrolle. Die Hunde erhielten während des Studienzeitraums Trockenfutter. Die Maulhöhle wurde gereinigt, indem dreimal wöchentlich die Zähne geputzt wurden. Die Hunde wurden bei allen Experimenten mit einer intramuskulären Injektion von 0,5 % Chlorpromazinhydrochlorid (0,3 ml/kg) vorbehandelt und mit einer intramuskulären Injektion von Ketaminhydrochlorid (0,4 ml/kg) betäubt. Die Experimente wurden gemäß den Richtlinien der Osaka Dental University für Tierversuche durchgeführt.

Methoden

Vorbereitung

Zur Plaquebeseitigung wurde in den drei Wochen vor dem Experiment mit 0,2 % Chlorhexidin gespült. Dreimal wöchentlich wurden die Zähne geputzt. Unmittelbar vor den

Experimenten erfolgte ein Full-Mouth-Scaling mit Ultraschallinstrumenten. Damit hatte jedes Tier ein klinisch gesundes Parodont (Plaque-Index = 0, Gingiva-Index = 0)¹⁹. Außerdem wurde der Eingriffsbereich mit einem Schutz aus einer Silberlegierung versehen⁸.

Chirurgisches Vorgehen

Um die Beobachtung während der experimentellen Periode zu ermöglichen, wurde an den oberen Schneidezähnen auf jeder Seite ein Lappen gelöst. Die Gingiva der oberen Schneidezähne wurde mit Povidon-Jod desinfiziert. Die örtliche Betäubung erfolgte mit 2 % Lidocain (das 1:80000 Epinephrin enthielt). Es wurden vom Gingivarand von I1 zu I3 interne Schrägschnitte geführt. Distal wurde mit einer vertikalen Inzision der Mukoperiostlappen gelöst. Mit einem Parodontalmeißel wurde 1 mm Alveolarknochen entfernt, dann wurden mit einer Kürette die Parodontalfasern und der Zement von der Wurzeloberfläche entfernt. Der Mukoperiostlappen wurde reponiert und vernäht (Abb. 1). Eine mit einem Eugenol-freien Parodontalverband gefüllte Schutzvorrichtung⁸ wurde mit Kompositkleber an der Krone der Schneidezähne fixiert. Zur Vorbeugung gegen Infektionen wurde intramuskulär Penicillin G (200000 Einheiten) gegeben. Der Parodontalverband und die Nähte wurden nach sieben Tagen entfernt.

Biopsatpräparation für TEM und REM

Als experimentelle Zeiträume waren zwei, drei, vier und acht Wochen nach dem Eingriff geplant. Für jeden Zeitraum wurden zwei Hunde verwendet. Nach einer Heparin-Natrium-Injektion (400 Einheiten/kg)

in die Oberschenkelvene unter Vollnarkose (intravenöse Injektion von Natriumpentobarbital (0,4 ml/kg)) ließ man die Tiere ausbluten. Die histologischen Biopsate für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und die mikrovaskulären Corrosion-Cast-Biopsate für die REM wurden folgendermaßen präpariert: Nach der Perfusionsfixierung mit 2,5 % Glutaraldehyd (0,05 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2) aus der Halsschlagader wurden die Biopsate für die TEM mit salzsäuregepufferter 5 % Ethylendiamintetraessigsäure-4Na (pH 7,2, 4 °C) entkalkifiziert. Anschließend wurden die Biopsate in Stücke geschnitten, mit 2 % Osmiumsäure postfixiert, dehydriert und in Epon 812 eingebettet. Es wurden ultradünne Schnitte angefertigt, die mit Uranylacetat und Bleicitrat eingefärbt und mit dem TEM betrachtet wurden. Die mikrovaskulären Corrosion-Casts¹⁵⁻¹⁷ wurden durch die Injektion von Kunststoff niedriger Viskosität über die bilateralen Halsschlagadern bei einem Druck von ≤ 170 mmHg präpariert. Nach der Harzpolymerisation wurde das Weichgewebe mit 4 % Natriumhypochlorit und 5 % Trypsin entfernt, um die am Knochen befestigten vaskulären Corrosion-Casts zu präparieren. Die Biopsate wurden dehydriert, gefriergetrocknet²⁰ und für die REM-Betrachtung mit Gold beschichtet.

Ergebnisse

Kontrollgruppe

In den Kontrollbiopsaten wurde unter dem inneren Epithel ein flaches Netz aus Kapillargefäßen beobachtet, das sich vom Gingivarand bis zum äußeren Rand des Epithels entlang der Zahnoberfläche ausbreitete (Abb. 2a). Nach Entfernung der

Zähne zeigte sich bei der Beobachtung der Alveole von der Wurzel aus unter dem Epithel eine flache Vaskulatur. Sie war in ein zaunartiges vaskuläres Netzwerk unter dem sulkulären Epithel und ein hexagonförmiges vaskuläres Netzwerk unter dem Saumeepithel unterteilt. Das vaskuläre Netzwerk verschwand am äußeren Rand des inneren Epithels, und die Breite des vaskulären Netzwerks unter dem sulkulären und dem Saumeepithel sowie des vaskulären Geflechts des Bindegewebsattachments waren ähnlich (Abb. 2b). Die Vaskulatur des Bindegewebsattachments umfasste ein grobes Geflecht von Kapillargefäßen, das sich auf dem Zement gebildet hatte, mit einem kontinuierlichen Endothel und einer fast nicht permeablen Struktur (Abb. 2c).

Experimentelle Gruppe

Zwei Wochen postoperativ

Histologisch war im Bindegewebe unter dem Saumeepithel ein leicht entzündliches Zellinfiltrat zu erkennen. Auf der Wurzelseite war keine Ablagerung von neuem Zement zu beobachten. Dort waren geformtes Bindegewebe und neue Blutgefäße parallel ausgerichtet. Um diese durchgehenden neuen Blutgefäße waren undifferenzierte mesenchymale Zellen erkennbar (Abb. 3a). Bei der Betrachtung der vaskulären Corrosion-Casts zeigten sich glomerulusartige neue Blutgefäße mit komplizierten Formen unter dem Saumeepithel. Die Blutgefäße hatten sich teilweise in ein spongioses Kapillarnetzwerk differenziert. In den Bereichen des neuen Bindegewebsattachments waren sinusoidal strukturierte neue Blutgefäße in geordneter Form zu erkennen. Auch parallel zur Wurzeloberfläche waren Blutgefäße zu sehen (Abb. 3b).

Abb. 2 Biopsate der Kontrollgruppe.



Abb. 2a Die bukkolinguale durchgeschnittene Oberfläche eines mikrovaskulären Corrosion-Casts. Die Kapillaren unter dem inneren Epithel (Pfeile) bilden ein flaches Netzwerk, das sich vom Gingivarand bis zum äußeren Rand des Epithels entlang der Zahnoberfläche ausbreitet. E = Schmelz; D = Dentin; G = Gingiva; CA = Bindegewebsattachment; AL = Alveolarknochen; PDL = parodontales Ligament.

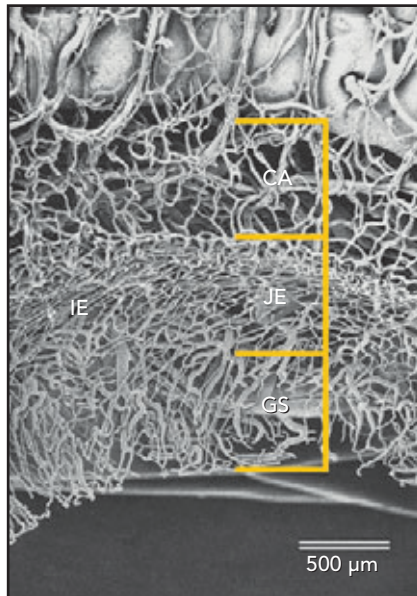


Abb. 2b Das vaskuläre Netzwerk breitet sich nach der Entfernung der Zähne von der Wurzelseite her in der Alveole aus. Das vaskuläre Netzwerk unter dem sulkulären (GS) und dem Saumepithel (JE) und das vaskuläre Geflecht des Bindegewebsattachments (CA) waren fast gleich breit. IE = vaskuläres Netzwerk unter dem inneren Epithel.

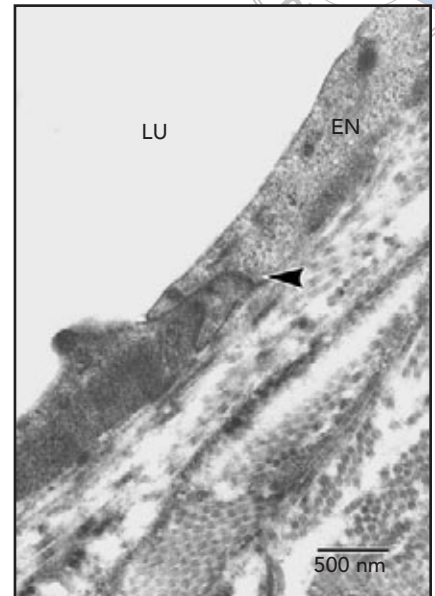


Abb. 2c An den Kontaktstellen der endothelialen Zellen ist ein deutlicher, enger Kontakt (Pfeil) zu erkennen. Es gibt fast keine permeable Struktur. Im Endothel (EN) sind einige Vesikel erkennbar. LU = Lumen.

Abb. 3 2 Wochen postoperativ.

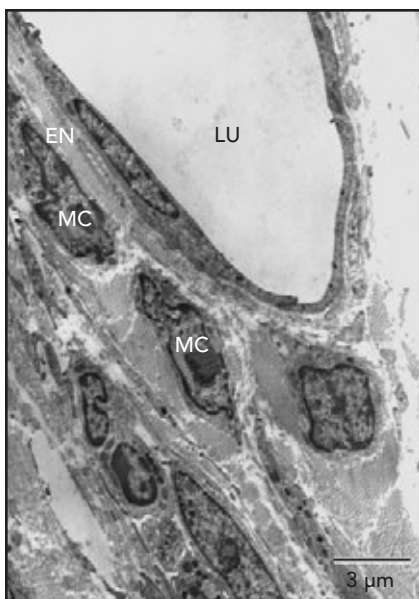


Abb. 3a (links) Um die neuen Blutgefäße sind undifferenzierte mesenchymale Zellen (MC) zu erkennen. EN = Endothel; LU = Lumen.

Abb. 3b (rechts) Betrachtung von der Wurzelseite. In dem vaskulären Netzwerk unter dem Saumepithel (JE) liegen glomerulusartige Blutgefäße (Sternchen) und spongiöse Blutgefäße (Pfeile) vor. Im Bereich des neuen Bindegewebsattachments (CNA) sind Blutgefäße zu erkennen, die parallel zur Wurzeloberfläche verlaufen (eingekreister Bereich). PDL = parodontales Ligament.



Abb. 4 3 Wochen postoperativ.

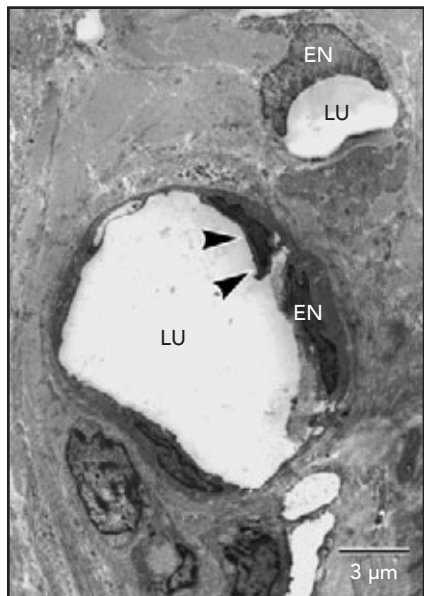


Abb. 4a (links) Regression der neuen Blutgefäße. In den endothelialen Zellen (EN), sind eine Reduzierung des Zytoplasmas, ein Hervortreten (Pfeile) des Kerns im Lumen (LU) und eine Kondensierung des Kerns zu erkennen.

Abb. 4b (rechts) Zementoblasten (CB), die eine Matrix bilden, sind an der Wurzeloberfläche (D) angeordnet.

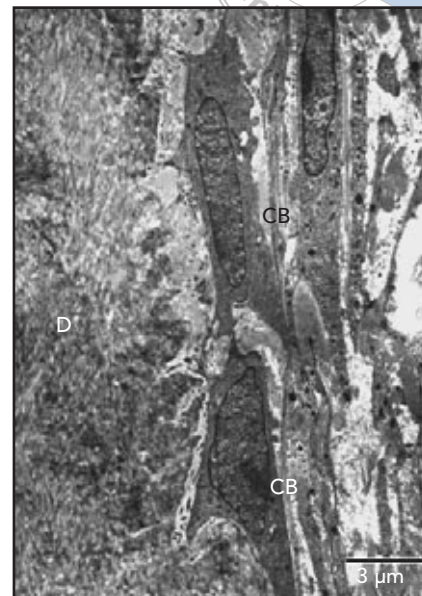
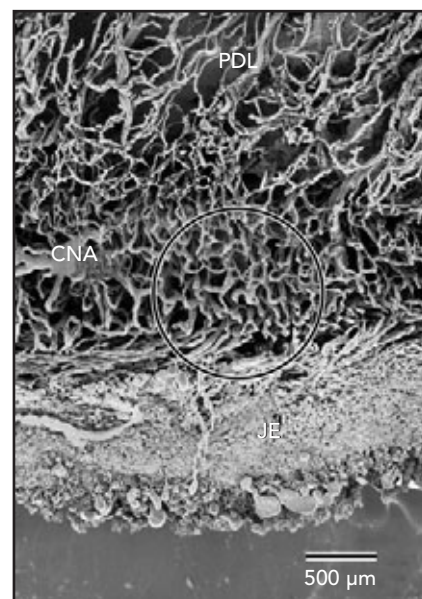


Abb. 4c (links) Im Endothel der neuen Blutgefäße sind mikrovillenähnliche Projektionen (Pfeilspitzen) und Vakuolen (Pfeile) zu erkennen. LU = Lumen.

Abb. 4d (rechts) Betrachtung von der Wurzelseite. Das vaskuläre Netzwerk unter dem Saamepithel (JE) ist abgeflacht. Im Bereich des neuen Bindegewebsattachments (CNA) (eingekreister Bereich) haben sich zur Wurzeloberfläche hin viele Schlingen gebildet. PDL = parodontales Ligament.



Drei Wochen postoperativ

Die Organisation geformten Bindegewebes war in die Bereiche des neuen Bindegewebsattachments vorgedrungen und die Regression der neuen Blutgefäße war offensichtlich (Abb. 4a). Auf der Wurzel-

oberfläche waren relativ aktive Zementoblasten angeordnet. Sie bildeten Kollagenfibrillen, die unregelmäßig auf der Wurzelseite verliefen (Abb. 4b). Das Endothel der neuen Blutgefäße um die Zementoblasten war kontinuierlich aufgebaut. Es wa-

ren einige mikrovillenähnliche Projektionen und Vakuolen zu erkennen (Abb. 4c). An den vaskulären Corrosion-Casts war zu erkennen, dass das vaskuläre Netzwerk unter dem Saamepithel aus Kapillargefäßen mit einem Durchmesser von 10

Abb. 6 8 Wochen postoperativ.

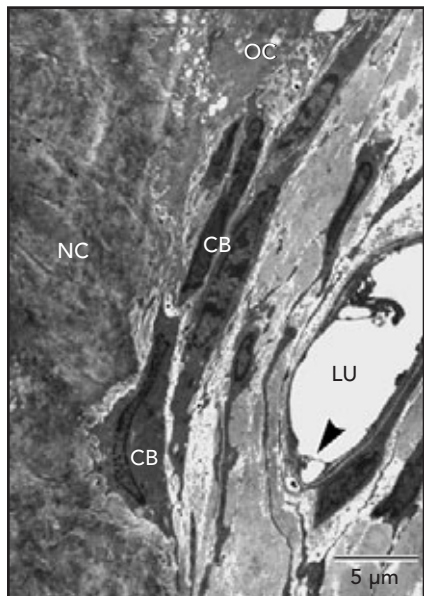
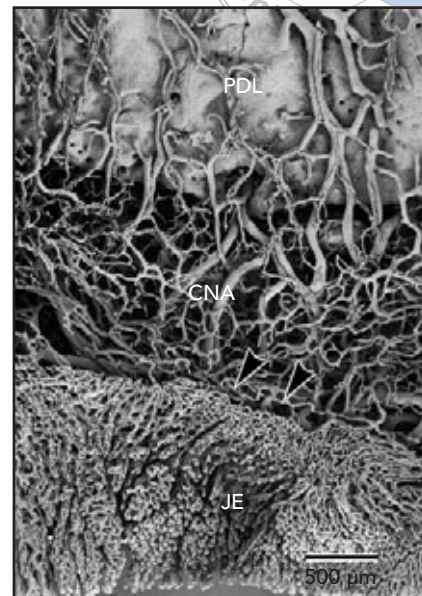


Abb. 6a (links) An der Oberfläche des neuen Zements (NC) sind Zementoblasten (CB) angeordnet. Auch in der Matrix des neuen Zements sind Zementoblasten zu sehen. Im Endothel sind mikrovillenähnliche Projektionen (Pfeil) zu erkennen. LU = Lumen; OC = Odontoklasten.

Abb. 6b (rechts) Betrachtung von der Wurzelseite. Zwischen dem vaskulären Netzwerk unter dem Saumepithel (JE) und dem vaskulären Geflecht im Bereich des neuen Bindegewebsattachments (CNA) hat sich ein deutlicher Rand (Pfeile) gebildet. Das Gefäßgeflecht des parodontalen Ligaments (PDL) ist zu erkennen.



ments⁵. Während der Zementogenese nach einem Lappeneingriff finden in den Blutgefäßen um die Zahnwurzel Veränderungen statt, die bisher nicht beschreiben wurden. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie die Mikrozirkulation im Zusammenhang mit diesem Prozess untersucht. Dazu wurden vaskuläre Corrosion-Casts mit dem REM untersucht. Die permeable Struktur des Endothels und die vaskuläre Funktion wurden mit dem TEM untersucht. In der Kontrollgruppe wurde unter dem sulkulären Epithel ein zaunartiges und unter dem Saumepithel ein hexagonförmiges vaskuläres Netzwerk beobachtet. Embryologisch stammen diese Netzwerke aus dem reduzierten Schmelzepithel des Zahnkeims. Das orale Epithel^{11, 21, 22} und das parodontale Ligament in den Bereichen des Bindegewebsattachments hatten ein relativ umfangreiches vaskuläres Geflecht. Anhand dieser morphologischen Informationen kann man die biologische Breite^{23, 24} mes-

sen, die dazu verwendet wird, das Ergebnis eines Parodontaleingriffs zu prognostizieren.

Bei den behandelten Tieren wurden in der zweiten Woche nach dem Eingriff repariertes Bindegewebe und neue Blutgefäße beobachtet, die parallel zur Wurzeloberfläche verliefen. Um die neuen Blutgefäße waren undifferenzierte mesenchymale Zellen zu erkennen, aber es wurde keine Zementogenese festgestellt. Nach drei Wochen hatte sich das reparierte Gewebe weiter organisiert. Außerdem wurde eine Regression der neuen Blutgefäße festgestellt. Es wird angenommen, dass die Gefäßregression das Ergebnis der apoptotischen Eliminierung der Blutgefäße und der abnehmenden metabolischen Aktivität der Fibroblasten bei zunehmender Organisation ist. Eine solche Apoptose der Blutgefäße wird im Heilungsprozess nach einem Lappeneingriff⁶ oder einem freien Gingivatransplantat¹⁰ beobachtet. Vermutlich handelt es sich dabei

um einen Teil des Ablaufs in der Gewebeheilung.

In der nächsten Heilungsphase verschwinden die neuen Blutgefäße, die parallel zur Wurzeloberfläche und um sie verlaufen, und bilden Kapillarschlingen, die die Zementoblasten an der Wurzeloberfläche mit Nährstoffen versorgen. Dies kann als frühes Stadium der Akkumulation von Zement betrachtet werden. Diese Kapillarschlingen bilden sich zur Wurzeloberfläche hin. Sie sind in den Bereichen mit aktiver Zementbildung an der Wurzeloberfläche bei Ratten zu finden^{25, 26}. Außerdem wurden an der Zahnwurzel bei Ratten Fenestraktionen mit äußerst hoher Permeabilität im Endothel der Kapillarschlinge beobachtet, die sich gegenüber dem Bereich der Zementakkumulation befinden. Dies deutet auf eine aktive Matrixbildung der Zementoblasten hin. In der vorliegenden Studie wurden jedoch nach dem Lappeneingriff an der Wurzeloberfläche keine Fenestratio-



nen und VVO⁷ mit hoher Permeabilität festgestellt. Trotzdem zeigten sich ähnliche schlingenartige Blutgefäße neben einigen Vakuolen und mikrovillenähnlichen Projektionen. Das deutet darauf hin, dass die metabolische Aktivität bei der Zementogenese niedrig ist. Der Unterschied zwischen den vorliegenden Ergebnissen und denen früherer Studien kann auch durch den Mechanismus der Zementakkumulation im Wachstumsprozess verursacht sein, im Vergleich zum Heilungsmechanismus. Auch die Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten können eine Rolle spielen. Trotzdem zeigte die Akkumulation von Zement keine Reaktion, die der mikrovaskulären Reaktion ähnelt. Diese begleitet den Knochenmetabolismus, der zu- und dann in relativ kurzer Zeit wieder abnimmt (sieben bis 14 Tage nach dem Eingriff)⁶. Die Autoren beobachteten allerdings permeable Bahnen über Vakuolen und mikrovillenähnliche Projektionen, wobei die Permeabilität in der vierten und achten Woche nach dem Eingriff niedrig war. Offenbar erfolgt die Zementakkumulation langsam über einen langen Zeitraum hinweg.

Bei der Rekonstruktion des neuen Bindegewebsattachments war in der vierten Woche postoperativ in den Bereichen des epithelialen und des Bindegewebsattachments kein deutlicher morphologischer Unterschied erkennbar. In der achten Woche war er aber deutlich zu erkennen⁸. Der Rand der beiden vaskulären Netzwerke verlief allerdings nicht geradlinig. Das weist darauf hin, dass sich das Attachment nicht in einer speziellen Region entwickelte. Die morphologische Untersuchung des vaskulären Netzwerks ermöglichte die dreidimensionale Beobachtung des Gewebes in diesem Bereich und nicht

nur die zweidimensionale Beobachtung von Gewebefragmenten. Mit dieser Methode wurde bestätigt, dass das epitheliale und das Bindegewebsattachment ein küstentlinienähnliches Muster in einer bestimmten Breite bildeten. Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die metabolische Aktivität bei der Zementogenese niedrig ist. Die Entwicklung von Attachmenthilfen, die die Akkumulation von neuem Zement ermöglichen, bleibt daher schwierig.

Danksagung

Wir danken Dr. Yoshihiro Ono, dem Präsidenten des Japan Institute for Advanced Dental Studies, für seine wertvolle Beratung zum Thema. Auch Dr. Yoichiro Taguchi danken wir für seine nützlichen Ratschläge.

Literatur

1. Nevins M. The essentials of periodontal treatment planning for adult chronic periodontitis. In: Nevins M, Mellonig JT (eds). *Periodontal Therapy: Clinical Approaches and Evidence of Success*, vol 1. Chicago: Quintessence, 1998:1–27.
2. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J Periodontol* 1993;64:254–260.
3. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defect. II. Re-entry procedures and bone measures. *J Periodontol* 1993;64:261–268.
4. Nevins M. Periodontal regeneration: Clinical application. In: Nevins M, Mellonig JT (eds). *Periodontal Therapy: Clinical Approaches and Evidence of Success*, vol 1. Chicago: Quintessence, 1998:249–263.
5. Freeman E. Periodontium. In: Ten Cate AR (ed). *Oral Histology: Development, Structure, and Function*, ed 5. St. Louis: Mosby, 1998:253–288.

6. Nobuto T, Suwa F, Kono T, et al. Microvascular response in the periosteum following mucoperiosteal flap surgery in dogs: Angiogenesis and bone resorption and formation. *J Periodontol* 2005;76:1346–1353.
7. Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001;49:419–431.
8. Nobuto T, Tokioka T, Imai H, Suwa F, Ohta Y, Yamaoka A. Microvascularization of gingival wound healing using corrosion casts. *J Periodontol* 1987;58:240–246.
9. Nobuto T, Imai H, Yamaoka A. Ultrastructural changes of subepithelial capillaries following graft epithelialization. *J Periodontol* 1988;59:570–576.
10. Nobuto T, Imai H, Yamaoka A. Microvascularization of the free gingival autograft. *J Periodontol* 1988;59:639–646.
11. Nobuto T, Tanda H, Yanagihara K, Nishikawa Y, Imai H, Yamaoka A. The relationship between connective tissue and its microvasculature in the healthy dog gingiva. *J Periodontol Res* 1989;24:45–52.
12. Nobuto T, Yanagihara K, Teranishi Y, Minami-bayashi S, Imai H, Yamaoka A. Periosteal microvasculature in the dog alveolar process. *J Periodontol* 1989;60:709–715.
13. Nobuto T, Imai H, Suwa F, et al. Microvascular response in the periodontal ligament following mucoperiosteal flap surgery. *J Periodontol* 2003;74:521–528.
14. Nobuto T, Suwa F, Kono T, et al. Microvascular response in the periosteum following mucoperiosteal flap surgery in dogs: 3-dimensional observation of an angiogenic process. *J Periodontol* 2005;76:1339–1345.
15. Ohta Y, Okuda H, Suwa F, Okada S, Toda I. Plastic injection method for preparing microvascular corrosion casts for SEM and its practical application. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1990;66:301–311.
16. Aharinejad SH, Lametschwandtner A. Producing optimal microvascular corrosion casts: A practical guide. In: Aharinejad SH, Lametschwandtner A (eds). *Microvascular Corrosion Casting in Scanning Electron Microscopy. Techniques and Applications*. Wien: Springer-Verlag, 1992:52–102.
17. Suwa F. What is discovered from microvascular corrosion cast-bone specimens. *Electron Microsc* 1999;34:168–172.
18. Egelberg J. Local effect of diet on plaque formation and development of gingivitis in dogs. I. Effect of hard and soft diets. *Odontol Revy* 1965;16:31–41.
19. Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967;38:610–616.
20. Katoh M. Freon-TF freeze drying method for SEM sample. *J Electron Microsc* 1978;27:329–330.
21. Kishi Y. The development of the vascular network under the inner epithelium of the dog gingiva using resin casts and scanning electron microscopy. *Jpn J Oral Biol* 1982;24:706–726.
22. Matsuo M, Takahashi K. Scanning electron microscopic observation of microvasculature in periodontium. *Microsc Res Tech* 2002;56:3–14.
23. Gargiulo AW, Wentz FM, Orban BJ. Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. *J Periodontol* 1961;32:261–267.
24. Nevins M, Skurow HM. The intracrevicular restorative margin, the biologic width, and the maintenance of the gingival margin. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1984;4:30–49.
25. Imai H, Ri S, Nobuto T, Tanda H, Yanagihara K, Yamaoka A. A study on periodontal microvasculature. *J Jpn Soc Periodontol* 1994;36:578–585.
26. Ohnishi K. Age changes in the microvasculature of the periodontal ligament of the rat molar. *Japan J Conserv Dent* 1996;39:149–162.