

Danube Private University Krems

Österreich

Stammzellen in der Knochenregeneration

„Ein Update in der dentalen Implantologie“

Masterthesis

zur Erlangung des akademischen Grades

„Master of Science Orale Chirurgie/Implantologie“ (MSc)

vorgelegt

2016

von

Dr. med. dent. Dirk Krischik, Dinslaken

Prüfer : Prof. Dr. Dr. Ralf Gutwald

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Allgemeine Grundlagen und Eigenschaften von Stammzellen	4
1.2	Zur Knochenregeneration in der Implantologie.....	6
2	Fragestellung	8
3	Material und Methode	9
4	Ergebnisse	11
4.1	Tissue Engineering.....	11
4.1.1	Einteilung / Strategien für Knochen-Tissue-Engineering.....	12
4.2	Knochentransplantate und Knochenregeneration.....	13
4.3	Charakteristische Eigenschaften von embryonalen Stammzellen (ESC).....	19
4.4	Charakteristische Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen (MSC).....	20
4.5	Charakteristische Eigenschaften von fettabgeleiteten Stammzellen (ADSC)	23
4.6	Osteoblastizitäre Differenzierung von MSCs.....	24
4.6.1	L-Ascorbat.....	28
4.6.2	Dexamethason.....	28
4.6.3	β -Glycerolphosphat	28
4.6.4	Cytokine.....	29
4.6.4.1	Insulin-Like-Growth Factor (IGF) und Insulin.....	29
4.6.4.2	Fibroblast Growth Factor (FGF)	30
4.6.4.3	Epidermal Growth Factor (EGF).....	30
4.6.4.4	Platet Derived Growth Factor (PDGF)	30
4.6.4.5	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	31
5	Diskussion	32
6	Literaturverzeichnis	38
7	Zusammenfassung	47
8	Summary	49

1 Einleitung

Die dentale Implantologie hat sich als fester Bestandteil in der modernen Zahnmedizin innerhalb der letzten Jahre als sichere und vorhersagbare Methode etabliert. Prothetische Konzepte zu festsitzenden Versorgungen konnten immer sicherer erweitert werden, um den Patienten anspruchsvollen, ästhetischen und vor allem festen Zahnersatz zu ermöglichen. Damit mit Implantaten suffiziente Versorgungen erzielt werden können, müssen bekanntlich ausreichende Knochendimensionen (vertikal und horizontal) vorhanden sein. Die Therapie verlorengangender Gewebe (Knochen) bedingt durch Traumata, Unfällen, malignen Erkrankungen sowie auch atrophischen Alterungsprozessen – insbesondere in zahnlosen Kieferabschnitten - verursachen häufig größere chirurgische Interventionen, um funktionelle zufriedene Ergebnisse zu erreichen. Bemühungen dieses Gewebe (Knochen) zu ersetzen bzw. zu regenerieren sind weitestgehend bekannt. Von lokalen Dehnungstechniken über verschiedene An- und Auflagerungsplastiken bis hin zur Distraktionsosteogenese und Rekonstruktionen mittels Eigenknochen erstrecken sich die heute gängigen Möglichkeiten (AGHALOO und MOY 2007). Es gilt hierbei zu beachten, dass die verschiedenen Techniken mit einem individuellen chirurgischen Aufwand, aber auch Komplikationen und Risiken behaftet sind (CHIAPASCO et al. 2006).

In den letzten Jahren hat sich das relativ junge Forschungsgebiet der Stammzellbiologie durch vielversprechende Studien in vitro sowie in vivo für die verschiedenen Disziplinen in der Medizin als hochinteressant herausgestellt. Durch Fortschritte in der Stammzellforschung und dem *Tissue Engineering* zeigten sich auch für die Zahnmedizin attraktive Optionen um „Zahn bzw. Zahnstrukturen und Knochen“ zu regenerieren. Hierbei rückten immer stärker zukunftsweisende Behandlungsmöglichkeiten mit verschiedenen Stammzellen in den Fokus der zahnmedizinischen Wissenschaft. Zunächst sollen die Arten von Stammzellen sowie deren Eigenschaften kurz dargestellt werden.

1.1 Allgemeine Grundlagen und Eigenschaften von Stammzellen

Als Stammzellen werden Körperzellen bezeichnet, die für die Regeneration von Körpergeweben sorgen. Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die keinem endgültigen Zelltyp angehören (WIESE 2013). Im Prinzip zeichnen Sie sich durch zwei wichtige Eigenschaften aus. Stammzellen besitzen die Selbsterneuerung als wichtige Funktion, d.h., dass sie über die Fähigkeit verfügen, auch nach zahlreichen Zellteilungen einen undifferenzierten Zustand beizubehalten. Sie sind somit potentiell unsterblich. Erreicht wird dies durch die sogenannte asymmetrische oder auch symmetrische Zellteilung. Bei der asymmetrischen Teilung entsteht eine neue Stammzelle als auch eine bereits differenzierte Zelle. Die symmetrische Zellteilung bringt zwei neue identische Stammzellen hervor (MORSCZECK und GOSAU 2013). Des Weiteren sind Stammzellen Vorläuferzellen von hochdifferenzierten Zellen. Sie können über verschiedene Einteilungsmuster klassifiziert werden. Eine bedeutende Einteilung erfolgt nach dem Differenzierungsspektrum der Zellen, d.h. dem Potential, verschiedene Gewebe zu bilden. Man differenziert totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente Stammzellen. Totipotente (lat. totus = ganz, ungeteilt) Zellen können einen ganzen Embryo mit seinen drei Keimblättern sowie extraembryonales Gewebe wie Plazenta und Nabelschnur bilden. Die befruchtete Eizelle sowie auch die Blastozysten Zellen bis zum Achtzellstadium sind totipotent und somit auch in der Lage einen Embryo zu bilden. Können sich Zellen in alle Gewebe der drei Keimblätter differenzieren, so werden sie als pluripotente (lat. plures = Mehrzahl) Zellen bezeichnet. Pluripotente Zellen besitzen jedoch keine Fähigkeit extraembryonales Gewebe zu bilden und sind auch nicht in der Lage einen gesamten Organismus hervorzubringen. Multipotente (lat. multi = viele) Zellen besitzen die Fähigkeit, sich in Abkömmlinge verschiedener Gewebe auszubilden, aber nicht in alle drei Keimblätter. Stammzellen die unipotenten (lat. unus = eins, ein einziger) Charakter haben, können nur einen einzigen differenzierten Zelltyp liefern. (WOLF 2011).

Eine andere Möglichkeit ist die Einteilung der Stammzellen nach ihrem Ursprung. Hierbei werden embryonale Stammzellen von adulten Stammzellen unterschieden. Embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESCs) sind pluripotent, können sich also in alle Körpergewebe differenzieren und sich theoretisch unendlich oft teilen (MORSCZECK et al. 2007). Gewinnen kann man sie aus frühen Blastozystenstadien

Einleitung

(ca. 4. Tag in der Embryonalentwicklung) mittels Immunchirurgie aus der inneren Zellmasse. Ethisch ist die Nutzung embryonaler Stammzellen höchst umstritten, da mit ihrer Gewinnung die Zerstörung früher menschlicher Embryonen verbunden ist. Adulte Stammzellen hingegen gelten als ethisch unbedenklich, jederzeit verfügbar und sind mittlerweile in fast allen Organen des Körpers nachgewiesen (GÖTZ 2012). In nur sehr geringer Zahl sitzen sie im Gewebe in sogenannten Stammzellnischen. Hier „schlafen“ diese Zellen, bis sie entsprechend ihrer Stimulierung aktiviert werden. Adulte Stammzellen lassen sich weiter kategorisieren. Die hämatopoetischen Stammzellen sind schon lange bekannt und typische adulte Stammzellen des Knochenmarks. Hingegen wurden die mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cell, MSC*) erst viel später entdeckt. Der deutsche Pathologe Conheim äußerte schon 1897 die Hypothese von nicht hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, jedoch gelang es Friedenstein erst in den 70er Jahren die ersten Vorarbeiten zur Isolierung der humanen mesenchymalen Stammzellen durchzuführen. Ihm folgten in den 80er Jahren weitere Arbeitsgruppen, wie z. B. von Owen, Cheng, Caplan und Rickard (JÄGER et al. 2002). Weiterhin sollen die fettabgeleiteten Stammzellen (*adiposed-derived stem/stromal cells, ADSC*) aufgezählt werden. Sie sind ähnlich wie die mesenchymalen Stammzellen und können gut aus Liposuktionsflüssigkeit gewonnen werden. Das Fettgewebe scheint dahingehend in ausreichender Menge zu beschaffende Quelle für Stammzellen zu sein. Abschließend soll die frühkindliche Stammzelle aus Nabelschnurblut - „unrestringierte somatische Stammzelle“ (*unrestringated som atic stem cell, USSC*) erwähnt werden. Ihre Bezeichnung erfährt die Zelle aufgrund des hohen Regenerationspotentials.

In der Fortsetzung zu den verschiedenen Stammzellen, soll die sich in jüngster Zeit für den klinischen Einsatz favorisierte „induzierte pluripotente Stammzelle, iPS“ erläutert werden. Sie kann als Alternative zu den embryonalen Stammzellen gesehen werden, indem sie durch gentechnologische Verfahren in Form einer Reprogrammierung aller reifen Zellen gesunder und kranker Menschen in ihrem Stammzellstatus zurückversetzt werden (GÖTZ 2012). Ein „Protein-Cocktail“ macht diese Prozedur möglich. Aus diesen erneut zurückgesetzten pluripotenten Zellen lassen sich wieder alle verschiedenen Zellarten entwickeln. Ein maßgeblicher Erfinder der iPS, ist der japanische Stammzellforscher Yamanaka, der dafür kürzlich den Nobelpreis erhalten hat (MORSCZEK und GOSAU 2013). Eine Publikation aus dem Jahr 2010 eines chinesisch-amerikanischen Forscherteams, veröffentlichte die Anwendung dieser

Einleitung

Zellen in der Zahnmedizin. Es konnte gezeigt werden, dass mit iPS neuer Alveolarknochen, Wurzelzement und Desmodont gebildet wurde (GÖTZ 2012).

Ein weiterer Zweig der Stammzellforschung ist das sogenannte „*Stammzell-Homing*“. Hier wird versucht präexistente Stamm- oder Progenitorzellen vor Ort zu aktivieren und zur Wanderung an den gewünschten Ort zu bewegen. Mit Hilfe von Scaffolds, chemotaktischen Molekülen sowie bioaktiven Faktoren sollen die Zellen angelockt und zur Differenzierung vor Ort gebracht werden.

1.2 Zur Knochenregeneration in der Implantologie

Von entscheidender Bedeutung ist, dass für die Implantation ein ausreichendes Knochenlager zu Verfügung steht. In den „Anfängen der Implantatologie“ richtete sich die Implantatposition nach der gegebenen Kiefermorphologie. Heute orientiert sich die moderne Implantologie primär nach prothetischen Kriterien, sog. Backward-Planning (HANDELSMANN 2006).

Um Implantate primärstabil inserieren zu können, ist ein suffizientes Knochenlager unabdingbar. Eine ausreichende Dimensionierung des Hartgewebslagers ist leider nicht immer anzutreffen, so dass häufig knochenaufbauende Maßnahmen erfolgen müssen. Um die knöchern Situation für die implantologische Rehabilitation zu verbessern sind verschiedene Techniken bekannt, denen alle die Neubildung von körpereigenem Knochen gemeinsam ist. Neben der direkten Kieferkammerhöhung durch Auflagerungsplastiken, der Distractionsosteogenese, der krestalen Knochenspaltung und -spreizung (Bone-Splitting) wird häufig über die gesteuerte Knochenregeneration (GBR), Socket Preservation und Sinusbodenaugmentation berichtet. Allen diesen Therapiemaßnahmen liegen folgende zellbiologischen Mechanismen zu Grunde:

- Osteogenese: direkte Knochenneubildung durch die Verpflanzung von vitalen körpereigenen knochenbildenden Zellen oder durch Distractionsosteogenese

Einleitung

- Osteoinduktion: indirekte Knochenneubildung durch den Einfluss von Knochenmatrixproteinen, so genannten BMPs (bone morphogenetic proteins). Hierbei differenzieren pluripotente Stammzellen zu knochenbildenden Osteoblasten.
- Osteokonduktion: indirekte Knochenneubildung durch eine Leitstruktur, in die dann das umliegende Knochengewebe und die Gefäße einwachsen können.

Die aufgezählten Techniken zur Knochenregeneration sind häufig und ausreichend in der Literatur beschrieben worden. Zum späteren Zeitpunkt werden die gängigen Verfahren zur Verbesserung des Implantatlagers, bezogen auf die Knochentransplantate und die gesteuerte Knochenregeneration separat beleuchtet. Sie sollen nicht unerwähnt bleiben, damit Sachverhalte im Hinblick auf die stammzellbasierte Knochenregeneration mit ihren Hintergründen besser verstanden werden.

Stammzellen als sog. Vorläuferzellen mit verschieden Differenzierungspotential scheinen gerade für die „Knochenregeneration“ von großem Interesse zu sein. Ziel der Masterthese war, die Literatur nach neuen Ansätzen, Ergebnissen, Abläufen und Aussichten der Stammzellen in der dentalen Implantologie zu recherchieren und zusammenzufassen.

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Masterthese war es, eine Übersicht über das Thema der Stammzellen in der Knochenregeneration mit direktem Bezug zur Implantologie zu erhalten. Dabei sollten die charakteristischen Eigenschaften von Stammzellen näher erläutert werden und eine Aufarbeitung der aktuellen Literatur in Anlehnung an die Knochenregeneration erfolgen. Die Arbeit beschreibt und diskutiert verschiedene Publikationen und Literaturstellen, um somit ein Update der Knochenregeneration durch Stammzellen innerhalb der Implantologie zu erhalten.

3 Material und Methode

Im Rahmen, der für diese Arbeit notwendigen Literaturbeschaffung, wurde eine systematische Recherche in der Datenbank PubMed und Google Scholar mit gelisteten Titeln zum Thema Stammzellen und Knochenregeneration sowie den Bezug zur Implantologie durchgeführt. Weiteres Quellenmaterial erschloss sich durch Verweise in der so vorgeschlagenden Literatur nach dem Schneeballprinzip und wurde ergänzend hinzugezogen. Folgende Schlüsselwörter waren Ausgangspunkt bei der Datenbankrecherche und sind in Tabelle 1 in einer Gesamtübersicht dargestellt. Dabei wurden zunächst die Publikationen anhand der Überschriften, im zweiten Schritt anhand der Abstracts und letztendlich anhand des vollen gesamten Textes beurteilt. Es wurde bei der Suche kein Zeitfenster gesetzt und auch die Ausschlusskriterien wurden einfach gehalten. Keinen Informationsgehalt zu Stammzellen und zur Knochenregeneration mit subjektiven transferierenden Bezug zum implantologischen Sachverhalt ließ demnach Artikel ausscheiden. Es wurden Veröffentlichungen in englischer und deutscher Sprache berücksichtigt.

Schüsselwörter	Treffer	Ausgeschlossen (Überschrift)	Potentielle Anzahl
<i>PubMed</i>			
dental stem cells regenerativ	358	335	23
dental stem cells bone regeneration	406	374	32
stem cells implantology	13	5	8
dental stem cells tissue engineering	569	542	27
<i>Google Scholar</i>			
Stammzellen Zahnmedizin	571	552	19
Stammzellen dentale Implantologie	212	206	6
Knochenregeneration Stammzellen	285	274	11
Stammzellen Oralchirurgie	29	17	12
Gesamt	2443	2305	138

Tab. 1: Schlüsselwörter Datenbankrecherche

Material und Methode

Aus den potentiell 138 ausgewählten Artikeln wurden nach intensiverer Durchsicht der Abstracts weiterhin 76 Artikel als nicht weiter relevant eingestuft und somit auch nicht in dieser Arbeit berücksichtigt. Die Tab. 1. gibt lediglich die Vorgehensweise sowie die Ergebnisse der Treffer bei der Literatursuche in den genannten Datenbanken wieder. Weiterführende literarische Verweise nach dem Schnellballprinzip sowie die Handsuche sind zahlenmäßig nicht zusätzlich erfasst worden.

4 Ergebnisse

In der Literatur findet man zur Zeit äußerst viele Publikationen zu Stammzellen. Sie werden folglich als undifferenzierte Zellen definiert, welche die Attribute der Vermehrung, der Selbsterneuerung, die vielzählige Produktion von Tochterzellen und auch die Regeneration von Gewebe mit sich bringen. Langezeit ist man davon ausgegangen, dass lediglich embryonale Stammzellen (ESCs) pluripotent sind, da diese Fähigkeit zur Plastizität während der frühen Entwicklung von kritischer Bedeutung ist. Es gibt mittlerweile viel Material, was diese Eigenschaft von den embryonalen Stammzellen *in vitro* als auch *in vivo* belegt.

Den adulten Stammzellen wurde viele Jahre nachgesagt, das sie hinsichtlich ihres Differenzierungs- und Regenerationspotentials auf das Gewebe beschränkt seien, in dem sie vorzufinden sind (BERTRAM 2002). Heute ist diese Annahme nicht mehr aufrecht zuhalten. Experimentelle Daten konnten zeigen, dass eine Zellpopulation welche dem Knochenmark entstammt, nicht allein verantwortlich für die Erneuerung des hämatopoetischen Systems ist, sondern auch zur Erneuerung von Muskel, Gehirn, Leber, Herz und vaskulärem Endothel beiträgt (PETERSON et al. 1999, FERRARI et al. 1998, ORLIC et al. 200 BERTRAM 2002). Viele Untersuchungen legen nahe, dass die Stammzellbiologie allgemein ein Gebiet beschreibt was noch in vielen Sachverhalten unverstanden ist.

4.1 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering (TE) beschreibt einen interdisziplinären Bereich, welches die Spezialgebiete der Medizin, die Materialwissenschaft, die Zellbiologie, die Genetik, die Biotechnologie und die Chemie zusammenführt, um gemeinsam Gewebe oder Organe *de novo* herzustellen, wiederherzustellen oder zu verbessern (FARGALI 2006). Beim Tissue Engineering handelt es sich um ein Anzüchten von lebenden Geweben, das die Funktion des zuvor destruierten Gewebes übernehmen soll. Das TE kann sowohl *in vivo* (im Körper) als auch *in vitro* (im Labor) erfolgen. Entnommene Zellen werden außerhalb des Körpers vermehrt und kultiviert.

Ergebnisse

Die Kultivierung der Zellen erfolgt hierbei auf sogenannten Scaffolds (dt. Gerüst). Diese bestehen aus Biomaterialien, auf denen die Zellen verpflanzt und gegebenenfalls durch Zugabe z. B. verschiedener Wachstumsfaktoren modifiziert werden, welche dann folgend wieder in den Körper eingebracht werden. Die Biomaterialien sollten während des Anzüchtungsprozesses des Gewebes die Zelladhäsion, die Zellproliferation und die Differenzierung anregen können. Es ist wichtig, dass sie eine hohe Porosität aufweisen, damit die darauf adhärent wachsenden Zellen Platz für den Aufbau des Gewebes bekommen. Auch zur Sicherstellung der Vaskularisation ist dies nötig, damit der Nährstofftransport zu den Zellen sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten gewährleistet wird. Zudem soll das Trägermaterial mechanische Stabilität besitzen, um die angenommene Form des gezüchteten Gewebes aufrecht zu erhalten. Weiterhin sollten Scaffolds leicht an die erforderliche Form anpassbar sein (LIU 2010). Scaffolds können von Geweben (Haut, Knochen, Schleimhaut) entstammen oder als biologische Polymere (Kollagen, Alginat, Hyalonsäure, Fibrin), mineralische Substanzen (Hydroxylapatit), Metalle (Titan) und auch synthetische Polymere (Polylaktide, Polyglycolide) konstruiert sein. Aufgrund der leichten Verfügbarkeit und ihrer Eigenschaften eignen sich humane mesenchymale Stammzellen als zelluläre Ressource für das Tissue Engineering, insbesondere im Rahmen der Knochenregeneration. Die Anwendung der MSC bietet Hoffnung (WARNKE et al. 2006). Studien in Tiermodellen haben nachgewiesen, dass die Transplantation von MSC die Rekonstruktion von solchen Knochendefekten (auch vorwiegend des *critical size defects* – Defekte $> 5\text{cm}^3$) wesentlich beschleunigt (MANKANI et al. 2001, TSUCHIDA et al. 2003).

4.1.1 Einteilung / Strategien für Knochen-Tissue-Engineering

In den vergangenen Jahren haben sich drei Methoden im Tissue- Engineering von Knochen durchgesetzt und etabliert, die durch BRUDER und FOX 1999 beschrieben wurden. Die erste Strategie beschreibt das *matrixbasierte Verfahren*. Verlorene Knochensubstanz wird durch synthetische Materialien wie Titan, Hydroxylapatit und / oder Tricalciumphosphat ersetzt. Die osteoinduktiven Eigenschaften fehlen hier jedoch gänzlich. Die zweite Strategie um eine Knochenregenerationen von Defekten durchzuführen ist die *proteinbasierte/ faktororientierte Methode*. Den Schlüssel zum

Erfolg bringen hier die sogenannten Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren, die einen zum Teil starken osteoinduktiven Stimulus vermitteln. Die Grundlage für diese Strategie setzte Urist im Jahre 1965 mit der Entdeckung der Bone Morphogenetic Proteins (BMP's). Als letzte Strategie kommt der *zellbasierte Ansatz* „ins Spiel“. Hier werden in den knöchernen Defekt direkt Zellen mit knochenbildenden Eigenschaften eingebracht, die dort eine Knochenheilung initiieren (KOCHEL 2004). Hier greifen die Stammzellen ins Geschehen ein und zeigen großes Potential für die Zukunft.

4.2 Knochentransplantate und Knochenregeneration

Limitierte Knochenangebote der Kiefer lassen häufig keine Implantatversorgungen zu, ohne zuvor entsprechende Rekonstruktionen der Lager durchführen. Das Knochentransplantat deckt für diesen Bereich (vor allem bei größeren Defekten) diese Aufgabe ab. Dabei stellt das autogene Knochentransplantat oftmals noch den „Goldstandard“ unter den Knochenaugmentationsverfahren dar. Ein Knochendefekt wird mit eigenem Knochengewebe (Knochenblock) ausgefüllt. Allgemein differenziert man spongiöse Knochentransplantate mit vitalen Knochenbälkchen und lebenden Zellen, von kortikalen Transplantaten aus äußerem kortikalen Knochen mit struktureller Festigkeit. Kortikospöngiöse Transplantate enthalten beide Anteile. Weiterhin kann ein avaskuläres Transplantat von einem mikrovasculär anastomosiertes Transplantat unterschieden werden. Freie avaskuläre Transplantate kommen meist aus dem Beckenkamm, den Rippen, der Schädelkalotte, dem Tibiakopf sowie dem Unterkiefer zum Einsatz (BETZ 2012). Bei ausgedehnten Defekten, z.B. nach Tumorsektion finden häufig mikrovasculär anastomosierte Transplantate ihre Anwendung. Neben dem Vorteil, dass das Transplantat nicht abgestoßen wird (Spender und Empfänger identisch) und kein großes Infektionsrisiko besteht, wird es oftmals auch aufgrund seiner guten osteogenen, osteokonduktiven und -induktiven Eigenschaften bevorzugt transplantiert.

Für den extraoralen Bereich hat sich für das avaskuläre Knochentransplantat der vordere sowie auch der hintere Bereich des Beckenkamms als praktisch und nützlich

Ergebnisse

erwiesen. Hierbei bietet die Crista illiaca posterior vor allem wegen der Gewinnung bzw. Entnahme größerer spongiöserreicher Blöcke sowie der geringen Komplikationsrate Vorteile. Der niedergelassene implantologisch tätige Zahnarzt bedient sich hier primär den intraoralen Spenderregionen. Entnahmeregionen sind vorzugsweise das Kinn, die retromolare Region, die Tuber, Spina nasalis anterior, Crista zygomatica und der Proc. coronoideus.

Überlebende Osteoblasten innerhalb des freien Knochentransplantats bewirken die Osteogenese.

Eine Alternative zum „Goldstandard“ bietet das allogene Knochentransplantat. Das Knochenmaterial ist humanen Ursprungs, stammt jedoch von einem anderen Spender. Es kommt als frisch gefrorener (*fresh frozen bone*, FFB), gefriergetrockneter allogener Knochen (*freeze-dried bone allograft*, FDBA) oder demineralisierte gefriergetrockneter allogener Knochen (*demineralized freeze-dried bone allograft*) vor (JENSEN et al. 2010). Als Nachteil dieses allogenen Materials wird oftmals die mögliche Immunreaktion sowie eine nicht mit Sicherheit auszuschließende Erregerübertragung genannt. Zu den möglichen infektiösen Agenzien gehören, z.B. Hepatitisviren, das Human Immunodeficiency Virus (HIV) und die Kreuzfeld – Jakob Erkrankung (Übertragung durch Prionen). Der Vorteil dieser genannten Transplantate besteht darin, dass es in großen Mengen innerhalb verschiedener Knochenbanken zur Verfügung steht. Ein Zweiteingriff zur Entnahme kann somit beim allogenen Transplantat vermieden werden. Die allogenen Materialien zeigen sowohl osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften. Dabei zeigt sich, dass allogenes Spongiosamaterial osteokonduktiv und osteoinduktiv ist, während nicht gefriergetrocknete Kortikalistransplantate rein osteokonduktiv sind. Als hoch osteoinduktiv wiederum zeigt sich hierbei die entmineralisierte Konchenmatrix (GOLDBERG 2000). Damit immunologisch aktive und auch infektiöse Strukturen zerstört werden, müssen die Knochentransplantate unterschiedlichen physikalischen und chemischen Behandlungen ausgesetzt werden. Lyophilisierung, Kryokonservierung, und das Autoklavieren sind die meistverwendeten Verfahren um diese Transplantate zu behandeln. Trotz aller Sicherheitsmaßnahmen sind Infektionsübertragungen bekannt geworden. In Deutschland hat diese „Form der Knochenregeneration“ mit allogenen Materialien eine untergeordnete Rolle. Das Risiko einer Krankheitsübertragung, die Kosten einer Knochenbank und aufwendige

Ergebnisse

vorhergehende Untersuchungen, lassen auf andere Alternativen zurückgreifen (BETZ 2012).

In der Fortsetzung zu den autogenen und allogenen Knochentransplantaten, schließen sich die sogenannten xenogene Knochentransplantate an. Das Material wird nicht von einer humanen, sondern von artfremden Spendern (Spezies) gewonnen. Xenogene Transplantate besitzen den Vorteil, der leichten Sterilisierbarkeit, unbegrenzten Verfügbarkeit sowie einfachen Lagerung. Zur Herstellung xenogener Transplantate bedient man sich überwiegend boviner und koralliner Herkunft, die in ihrer Mineralstruktur dem humanen Knochen ähneln. Durch die Aufbereitung werden hier sämtliche Proteinstrukturen entfernt, sodass nur eine anorganische Matrix ohne zelluläre oder organische Elemente zurückbleibt. Ihre Wirkung ist daher rein osteokonduktiv. Immunologische Reaktionen und Infektionsübertragungen sind auszuschließen (GLASS et al. 2008). Die Übertragung von BSE (bovine spongiforme Enzephalopathie) wird weiterhin durch die Verarbeitung von Tieren aus BSE- freien Ländern vermieden.

Das bovine anorganische Knochenmaterial ist ein Hydroxylapatitskelett. Durch eine Sinterung kommt es zu einer Verdichtung der Poren. Hierdurch wird es mechanisch stabiler, sein Resorptionsverhalten aber verschlechtert. Die Wärmebehandlung kann mit hohen Temperaturen (über 1000° Celsius) gesintert werden oder auch mit niedrigeren Temperaturen (über 300° Celsius) durchgeführt werden. Letzteres kommt in seiner Gerüstarchitektur dem natürlichen Knochen sehr nahe.

Zu den bekanntesten xenogenen Produkten in der Zahnmedizin gehören Osetograft/N®, Algapore® und BioOss®. BioOss® gilt als am besten wissenschaftlich dokumentiert und ist das am meisten verwendete Knochenersatzmaterial in der Zahnmedizin (Knochenregeneration). Gute klinische Resultate konnten beim Auffüllen parodontaler Defekte (CAMELO et al. 1998), Sinusbodenaugmentationen oder auch kleinerer Knochendefekte (SCHWARTZ et al. 2000) gezeigt werden.

Xenogene Transplantate können für augmentative Verfahren alleine, aber auch unter Beimischung von autogenen Knochen sowie von rekombinanten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren eingesetzt werden. Durch diese Kombination kann die Einheilzeit des Materials verkürzt und die Regeneration auch größerer Knochendefekte im ersatzschwachen Lager erreicht werden (TERHEYDEN 2002).

Ergebnisse

Die letzte Gruppe bilden die alloplastischen Knochentransplantate. Diese Knochenersatzmaterialien repräsentieren eine große Gruppe von auf Kalzium basierenden Biomaterialien teilsynthetischen oder vollsynthetischen Ursprungs. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen und mechanischen Eigenschaften, ihrer Struktur und ihrer chemischen Zusammensetzung. Im Rahmen der Kieferkammaugmentation spielen vor allem Hydroxylapatit-Keramiken, α - und β -Tricalciumphosphat-Keramiken sowie Biogläser eine Rolle. Hydroxylapatit (HA) ist eine nichtdegradierbare (unlösliche) Kalziumphosphatkeramik. Aufgrund seiner kristallinen Struktur und meist zu geringer Mikroporositäten, ist es oft noch lange Jahre histologisch wie auch radiologisch nachweisbar. Es findet kaum ein Abbau statt, so dass es für die Regeneration des Implantatlagers nicht mehr in Frage kommt. Allgemein gilt HA als osteokonduktiv und nicht resorbierbar. Die Tricalciumphosphate (TCP) werden den löslichen Kalziumphosphatkeramiken zugeteilt und unterliegen in wässrigem Milieu einem chemischen-physikalischen Zerfallsprozess. Die dabei entstehenden Partikel werden durch Phagozytose abgebaut (GLASS et al. 2008). Die α - und β -Modifikationen ergeben sie durch die Hoch- und Tieftemperaturphasen. Bei einer Sintertemperatur um 1200° Celsius (Tieftemperaturform) entsteht β -Tricalciumphosphat (z.B. Cerasorb®). Die Hochtemperaturform (Sintertemperatur zwischen 1125° und 1430° Celsius) bringt das α -Tricalciumphosphat hervor (z.B. Biobase). β -Tricalciumphosphat ist das am häufigsten verwendete alloplastische Knochenersatzmaterial in der Implantologie. Die unterschiedlichen Resorptionsraten mit β -TCP lassen aber nicht immer vorhersagbare Ergebnisse zu. Im Vergleich zu HA weisen TCP ebenfalls gute osteokonduktive Eigenschaften auf, sie werden aber schneller resorbiert.

Die als Knochenersatzmaterialien eingesetzten Biogläser (z.B. Biogran®, PerioGlas®) sind amorphe ("gestaltlos"), nicht kristalline und nicht poröse Materialien. Die Hauptbestandteile sind Kalziumsalze, Phosphate und Siliziumoxid. Eine Degradation findet nach klinischer Applikation nicht statt (SIMONOVSKA 2010). Die

Ergebnisse

Gläser binden Knochen durch oberflächenreaktive Siliziumdioxid-, Kalzium- und Phosphatgruppen, die hierfür typisch sind. Hierbei soll dem Siliziumdioxid eine Schlüsselrolle zu fallen. Bioaktive Gläser sind ausgesprochen biokompatibel (JENSEN 2010). Leider konnte bis heute keine ausreichende Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von Keramiken und Biogläsern durch die Modifikationen der kristallinen Eigenschaften erreicht werden. Eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften wird jedoch von Verbundwerkstoffen aus Keramik und Polymeren erwartet. Als Polymer werden Polyglykolid, Polylaktid und Polydioxanon verwendet. Innerhalb der zahnärztlichen Chirurgie sind zur Zeit nur wenige resorbierbare Komposite als Knochenersatzmaterial im klinischen Einsatz. Als großer Vorteil gilt bei den alloplastischen Materialien synthetischer Natur, dass sie definitiv keine Krankheiten übertragen können.

Neben den verschiedenen Knochentransplantaten und Knochenersatzmaterialien hat sich in den 1980er und Anfang der 1990er Jahre ergänzend ein neues operatives Verfahren entwickelt. Das Konzept der membrangeschützten Knochenregeneration (*guided bone regeneration, GBR*) wurde eingeführt. Eine Initiierung der GBR erfolgte auf der von NYMAN et al. 1982 entwickelte GTR Technik (*guided tissue regeneration*) zur parodontalen Regeneration. Die GBR ist eine weitverbreitete Methode zur Knochenregeneration in der Implantologie und zahnärztlichen Chirurgie. Das Prinzip beruht auf der Kombination von Transplantationsmaterial mit einem Membranschutz um Knochengewebe optimal regenerieren zu lassen. Knochengewebe wächst relativ langsam, so dass Fibroblasten als auch Epithelzellen die Möglichkeit haben, den

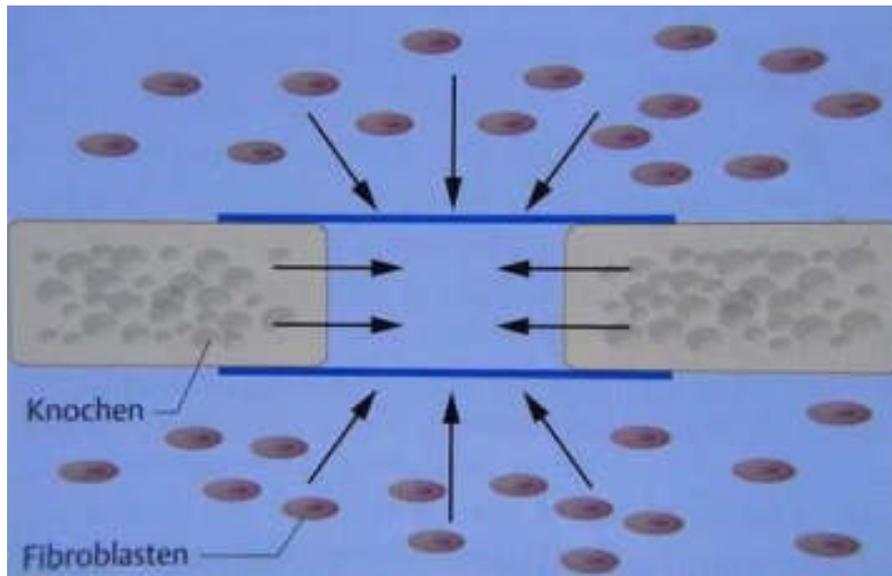


Abb. 1: Prinzip der gesteuerten Geweberegeneration. Selektiver Ausschluss der Fibroblasten durch zelloklusiven Charakter der Membran (aus Hoffmann 2009)

verfügbaren Raum effektiver zu besetzen und weitaus schneller Bindegewebe zu bilden, als das der Knochen wachsen kann. Der Mechanismus dieses Verfahrens besteht im Ausschluss unerwünschter Zellen aus dem Wundgebiet bzw. der Wundumgebung, damit Zellen des Knochengewebes in den mit Blut gefüllten Raum unter der Barrieremembran proliferieren können (Abb. 1). Ist ein langer Verschluss durch die Membran gegeben und ist diese nicht der Mundhöhle ausgesetzt, bestehen optimale Bedingungen für die Differenzierung von Stammzellen und Knochenvorläuferzellen in Osteoblasten (BOSSHARDT und SCHENK, 2010). Damit die membrangeschützte Knochenregeneration erfolgen kann, sollte die Barrieremembran verschiedenen Eigenschaften genügen. Biokompatibilität, Zellokklusion, Gewebeintegration, Raumschaffung und –sicherung sowie eine gute intraoperative Handhabung. Neben den nichtresorbierbaren Membranen (z.B. Polytetrafluorethylen) sind heute auch die resorbierbaren Membranen (Polymere, Kollagene) weit verbreitet. Auf die verschiedenen Eigenschaften, den Vorteilen und auch Nachteilen soll nicht näher eingegangen werden, sondern primär die Funktionsweise der Knochenregeneration mit Hilfe der Membranen vermittelt werden. Die GBR hat in letzter Zeit großen Einfluss auf die knochenregenerative Implantologie gehabt mit der gute vorhersagbare und ästhetisch anspruchsvolle Ergebnissen erzielt wurden. Die Grundprinzipien sollen weiter als Grundlage für die Arbeit der knöchernen Regeneration mit Stammzellen dienen.

4.3 Charakteristische Eigenschaften von embryonalen Stammzellen (ESC)

Es ist länger als 20 Jahre her, als es erstmals gelang ESC aus der Maus zu isolieren und zu kultivieren. ESC stellen die Hauptvertreter der toti- und pluripotenten Stammzellen dar (HANDSCHEL 2007). Wie bereits erwähnt, gewinnt man die embryonalen Stammzellen aus der inneren Zellmasse von Blastozysten, die als Hauptvertreter der toti- und pluripotenten Stammzellen gelten und sich im Laufe der Ontogenese in verschiedene Zelllinien des Organismus differenzieren können (siehe Abb. 2)

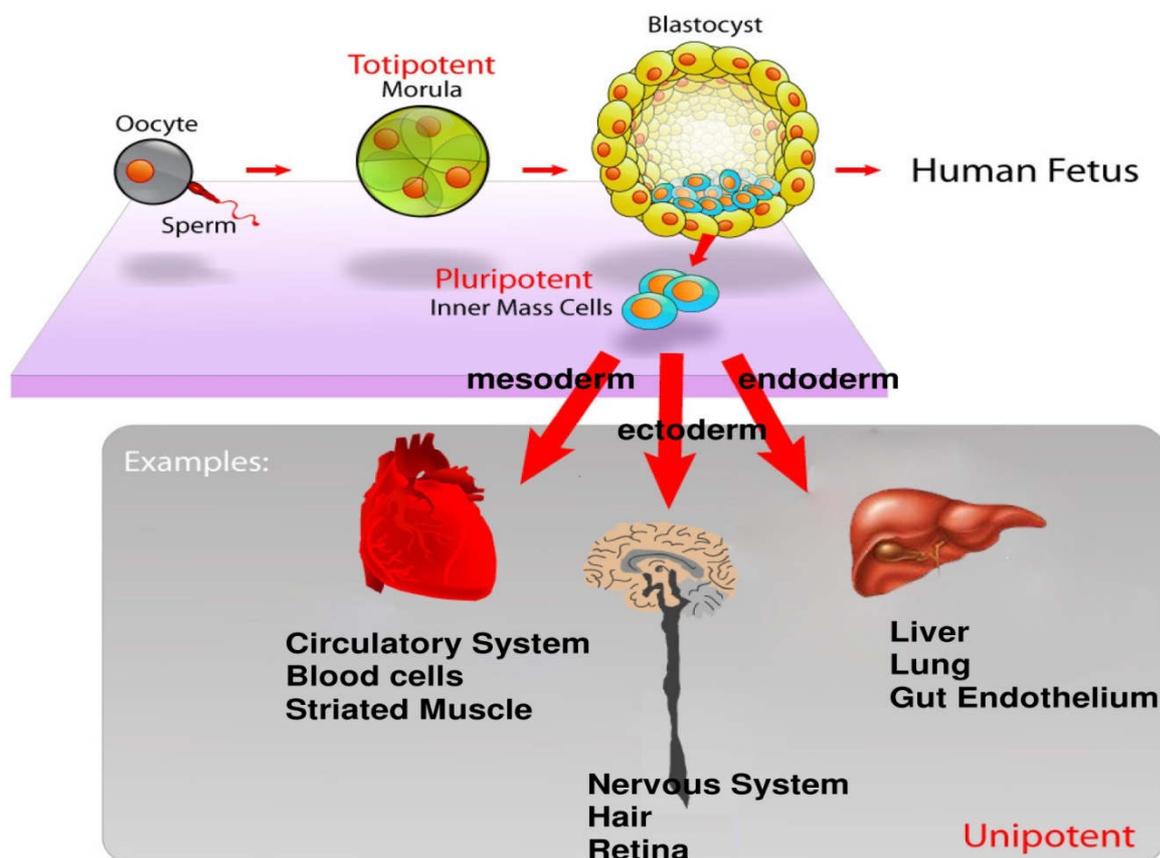


Abb. 2: Gewinnung von ESC aus der inneren Zellmasse und deren Differenzierung (aus Steffen 2008)

Ergebnisse

Eine gezielte Differenzierung von ESC in Kardiomyozyten (KLUG et al. 1996), glatte Muskelzellen (DRAB et al. 1997) und auch Neurone (MC DONALD et al. 1999) ist beschrieben worden. Hieran anschließend konnte unter bestimmten Kulturbedingungen gezeigt werden, dass ESC zu osteoblastenähnlichen Zellen differenzieren können (HENG et al. 2004, CHAUDHRY et al. 2004). Um eine gezielte osteoblastäre Differenzierung von ESC zu induzieren, ist der Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat zum Nährmedium notwendig. Aber auch bestimmte Zytokine wie BMP-2 oder Vitamin D3 wirken hier fördernd (ZUR NIEDEN et al. 2005). Die Frage der Immuntoleranz bei der Verwendung von ESC stimmt hoffungsvoll. Die Untersuchungen von BURT et al. 2004 zeigten Ergebnisse, die weder klinische noch histologische Anzeichen einer Abstoßungsreaktion beobachteten. Dennoch publizierten andere Autoren über die maligne Entartung der Zellen (TROUNSON, 2002). Hierbei wurde beschrieben, dass transplantierte undifferenzierte ESC in Tieren das Auftreten von Teratomen und Teratokarzinomen erhöhen können. Hingegen konnte Zhang und Mitarbeiter (ZHANG et al., 2001) bei Untersuchungen in vivo mit ESC keine Hinweise auf tumorähnlichen Entartungen finden. Ethische und damit auch rechtliche Bedenken der ESC sind in der Einleitung schon einmal aufgezählt worden. In der Bundesrepublik Deutschland ist mit dem Embryonenschutzgesetz (ESchG, in der Fassung vom 13.12.1990) eher eine zurückhaltende Verwendung mit und von humanen ESC vorhanden. Dennoch ist mittelfristig davon auszugehen, dass bedingt durch die Plenarsitzung am 15.6.2006 vom Europäischen Parlament (Forschung mit humanen ESC unter bestimmten Kriterien zu fördern), mit einer Lockerung bezüglich der Gewinnung und Verwendung von ESC zu rechnen ist (HANDSCHEL 2007).

4.4 Charakteristische Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen (MSC)

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente, undifferenzierte Zellen. Unter definierten Bedingungen können sich MSC in vitro in Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Muskelzellen und in Blutzellbildung unterstützende Stromazellen differenzieren (GLUCKMAN et al. 2004; PHINNEY et al. 1999; PARK et al. 1999, LIU 2009). (Abb. 3).

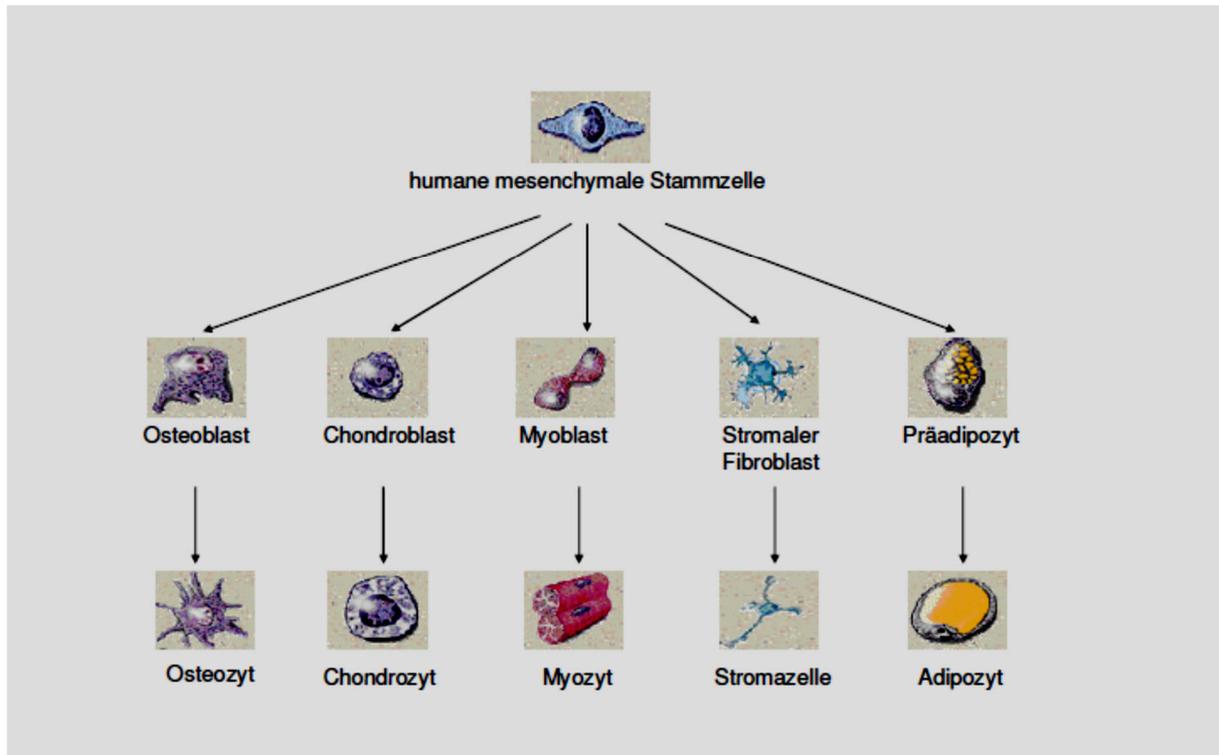


Abb. 3: Differenzierungspotential der humanen mesenchymalen Stammzellen. MSC sind in der Lage, sich in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Stromazellen und Myozyten zu differenzieren. (Abbildung nach Pittinger et al 2001; modifiziert, aus LIU 2009)

MSC können aus verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers isoliert werden. Im Knochenmark beträgt die Menge an MSC ca. 1-0,05 Zellen pro 100000 Knochenmarkszellen (CAPLAN 1994). Diese Zahl ist jedoch vom Alter als auch vom Gesundheitszustand abhängig.

Eine genaue Definition ist für die MSC heutzutage noch schwierig. Das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for cellular Therapy* (ISCT) veröffentlichte minimale Kriterien für die Definition von (humanen) MSC, die sowohl für präklinische Studien als auch für wissenschaftliche Untersuchungen geeignet sind. Dabei sollten sie Plastikadhärenz, Differenzierungspotential und das Oberflächenexpressionsmuster besitzen (DOMINICI et al. 2006).

Die Plastikadhärenz zeigt sich unter normalen Zellkulturbedingungen durch ein Anhaften am Plastik der Zellkulturflasche sowie die Ausbildung der dabei typischen Morphologie (SCHÖNBERGER 2009). Hämatopoetische Stammzellen zeigen diese Eigenschaft nicht. Diese Tatsache kann in der Praxis zur Isolation der MSC verwendet werden.

Ergebnisse

Das zweite Kriterium ist, dass die MSC ein Differenzierungspotential besitzen müssen, welches ihnen eine osteogene, eine chondrogene und auch eine adipogene Differenzierung erlaubt (RINGE et al. 2002).

Die dritte Eigenschaft beschreibt das Expressieren von bestimmten Oberflächenantigenen. Mesenchymale Stammzellen müssen dabei positiv bzw. negativ für einige Oberflächenmarker wie CD13, CD29, CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD90, CD 105, CD106, CD166, HLA-DR sein. Die Abkürzung CD steht für „Cluster of Differentiation“, Oberflächenmoleküle der MSC.

Während für hämatopoetischen Stammzellen der Oberflächenmarker CD34 zur Identifikation dient, konnte für mesenchymalen Stammzellen ein solcher Marker nicht eruiert und gefunden werden. Hier zeigte sich vielmehr ein komplexes Expressionsmuster von Oberflächenantigenen. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über das Expressionsprofil.

Positiv	Negativ
CD13, CD29, CD44, CD49a,b,c,d,e,f, CD51, CD54, CD58, C106, CD71, CD73, CD90, CD102,CD105, CD119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, P75, TGFb1R, TGFbIIIR, HLA-A,B,C, SSEA-3, SSEA-4, D7	CD3, CD4, CD6, CD9, CD,10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD80,CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1

Tab. 2: Charakteristisches Oberflächenexpressionsprofil für mesenchymale Stammzellen (aus SCHÖNBERGER 2009)

Fortführend ist auch eine immunmodulierende Eigenschaft der MSC bekannt. Bei der allogenen Transplantation von MSC sind bis heute keine bekannten Abstoßungsreaktionen oder Immunantworten beschrieben worden. Auch ist nicht bekannt, dass mesenchymale Stammzellen transplantationsimmunologisch spezifische Oberflächenmarker wie MHC II, CD40 und CD40-Ligand oder B7-1 und B7-2 exprimieren. Weiterhin wurde aufgezeigt, dass MSC die

Lymphozytenproliferation im Empfänger unterdrücken. Verantwortlich hierfür ist die Produktion von Interleukinen (IL-2 und IL-10), Hepathocyte growth factor (HGF) und Transforming growth factor β -1 (TGF β -1) (SCHÖNBERGER 2009). Ohne weiter und tiefer auf diese nennenswerte Eigenschaft einzugehen, kann allgemein festgehalten werden, dass MSC immunsuppressive und immunmodulierende Wirkung besitzen.

4.5 Charakteristische Eigenschaften von fettabgeleiteten Stammzellen (ADSC)

Eine neue Alternative zu MSC aus dem Knochenmark stellt eine Population von Zellen im menschlichen Fettgewebe dar. Sie konnten als sogenannte „processed lipoaspirate cells“ (PDA) isoliert werden. Diese Zellen scheinen ähnliche Eigenschaften wie mesenchymale Stammzellen aufzuweisen und können aus Liposuktionsflüssigkeit oder nativem Fettgewebe isoliert werden. Die internationale *Fat Applied Technology Society* empfiehlt die Namensgebung solcher fettabgeleiteter Stammzellen als „*adipose-derived stem/stromal cells*“ (ASC oder ADSC) (NAKAGAMI et. al 2006). Weiterhin scheint das Fettgewebe auch sehr ergiebig für die Gewinnung für Stammzellen zu sein. 1g Fettgewebe enthält ca. 5×10^3 Stammzellen, was fünfhundert mal mehr Stammzellen sind als in einem Gramm Knochenmark (MIZUNO 2009). Fettgewebe stellt zusammenfassend gesagt eine ausgiebige Quelle dar, um in ausreichender Menge Stammzellen zu beschaffen. Als Vorteil gegenüber den MSC aus dem Knochenmark ist die einfache Isolierung in großer Anzahl, ohne größere Schmerzen für den Patienten zu nennen. Der Entnahmeeingriff ist weniger invasiv und kann oftmals in lokaler Betäubung erfolgen. Typisch für ADSC gegenüber MSC ist ihr länger anhaltendes Proliferationsverhalten bis zur 13. Passage sowie einer geringen Sterblichkeitsrate in hohen Passagen (ZUK et.al 2001). In Arbeiten von ZUK et. al 2001 und 2002 konnte gezeigt werden, dass es kunststoffadhärente, fibroblastenähnliche Zellen sind, die sich zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myozyten ausdifferenzieren können. Durch die Fähigkeit von ADSC mehrere Zelltypen aller drei Keimblätter zu bilden, werden sie von verschiedenen Forschergruppen vermehrt zu den pluripotenten Zellen gezählt und stellen somit eine echte Alternative zu embryonalen Stammzellen dar. Spezifische Oberflächenmarker für undifferenzierte ADSC wurden analog zu den MSC nicht gefunden. Jedoch sind

auch hier fast immer wieder bestimmte Oberflächenmarker vorhanden, so dass man auf bestimmte Kombination von Oberflächenmarkern Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Stammzellen schließen kann. Die wichtigsten Oberflächenantigene zur Identifikation von ADSC sind CD13, CD 29, CD 90, CD 44, CD 49d, CD 105, CD 166 und STRO 1 (JAECKEL 2012)

4.6 Osteoblastizitäre Differenzierung von MSCs

Knochengewebe hat einen ca. 30%igen organischen und 70% anorganischen Anteil. Die anorganische Substanz besteht vorwiegend aus Hydroxlyapatit, der kristallinen Form des Kalziumphosphats. Der organische Teil wird überwiegend vom Kollagen (im Wesentlichen Kollagen Typ-I, jedoch auch Kollagen III, V, VI und X) sowie einigen nichtkollagenösen Proteinen wie z.B. Osteocalcin, Osteonektin, und Bone Sialoprotein gebildet.

Der Präosteoblast, der Osteoblast, der Osteozyt und die sogenannten „Lining Cells“ sind die am einfachsten, bekanntesten und meist differenzierten Zelltypen der Osteoblastenfamilie. Hinweise über den möglichen Entwicklungsablauf gehen auf Arbeiten von Friedenstein et. al 1987 zurück und erhielten von OWEN 1985 und CAPLAN 1991 weitestgehend Unterstützung. Die Autoren äußerten vereinfacht ausgedrückt, dass zwei Formen von Osteoprogenitorzellen existieren. Zum einen die determinierte osteogene Vorläuferzelle (DOPC) und zum anderen die induzierbare osteogene Vorläuferzelle (IOPC) (Abb. 4).

Ergebnisse

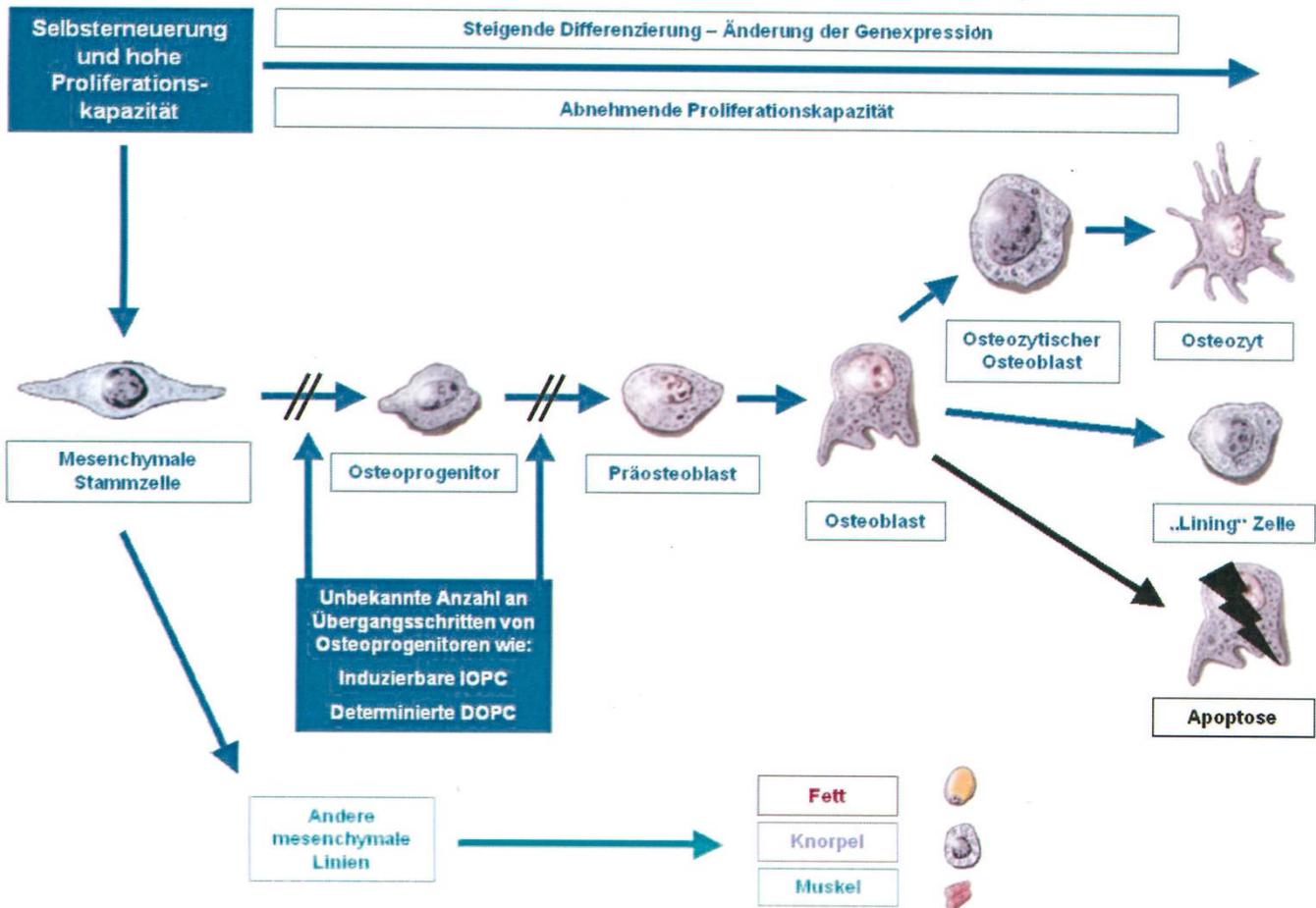


Abb. 4: Schematische Abbildung Entwicklung Osteoblastenlinie (aus BERTRAM 2002)

Die DOPC ist innerhalb des Knochenmarks als Mitglied der Stromazellfamilie vorzufinden. Sie besitzt fibroblastenähnliche Morphologie, ist stark proliferativ, in ihrer Natur klonogen und in der Lage in Knochen-, Knorpel-, fibröse Bindegewebe und Fettgewebe zu differenzieren, wenn sie in vivo implantiert wird. Dem Gegenüber ist die IOPC in lymphoiden Geweben, zwischen peritonealen Makrophagen und im Blut zu finden. Sie ist ebenfalls klonogen, proliferativ und in der Lage bei direktem Kontakt mit osteoinduktiven Agenzien (wie z.B. Knochenmatrix) osteogen zu differenzieren (BERTRAM 2002). Viele Arbeitsgruppen sind derzeit mit Untersuchungen beschäftigt, regulatorische Mechanismen aufzuschlüsseln, welche die Differenzierung dieser multipotenten mesenchymalen Vorläuferzellen kontrollieren.

Allgemein lassen sich bei der Entwicklung der osteoblastoiden Zelllinie vier Zellstadien definieren: Osteoprogenitor, Präosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten. Osteoprogenitorzellen zeichnen sich durch eine hohe Mitoseaktivität aus,

Ergebnisse

exprimieren jedoch keine Alkalische Phosphatase (ALP) und kein Kollagen Typ-I. Die Präosteoblasten zeichnen sich ebenfalls durch eine Zellteilungsaktivität aus, sind aber ALP positiv, synthetisieren Bone Sialoprotein (BSP) und Kollagen Typ-I. Sobald das Stadium des Osteoblasten erreicht ist, verliert sich die Fähigkeit zur Zellteilung, produziert werden jedoch verschiedene Matrixkomponenten zur Knochenbildung. Während dieses Stadiums ist eine starke Expression Osteocalcin und BSP nachweisbar. Aus diesem Stadium heraus entwickeln sich ca. 10 - 20 % der gesamten Osteoblasten in Osteozyten. Weiterhin erfolgt eine Entwicklung in sogenannte „Lining Cells“. Der überwiegende Teil der Osteoblasten (ca. 65%) unterliegt nach Erfüllung Ihrer Aufgabe dem vorprogrammierten Zelltod, der Apoptose. Ein wichtiger Schlüsselfaktor der osteogenen Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) bzw. CBFA1 (*Core Binding Faktor Alpha subunit 1*). Von der mesenchymalen Stammzelle bis zum reifen Osteoblasten werden einige Transkriptionsfaktoren und Matrixproteinen in einer bestimmten zeitlichen Abfolge tätig. CBFA1 bzw. RUNX2 ist nicht nur ein essentieller Transkriptionsfaktor, sondern in der Knochenentstehung auch schon früh nachweisbar. In der gesamten Bildungreihe ist CBFA1 existent und zeigt seinen signifikanten Einfluss (Abb. 5). Weiterhin wird vermutet das CBFA1 die Expression von Osteocalcin, Osteopontin und Kollagen I reguliert. Osteonectin wird von verschiedenen Zelltypen wie Osteoblasten, Fibroblasten, Chondrozyten und glatten Muskelzellen sekretiert. In der Osteoblastenlinie wird es von reifen Osteoprogenitorzellen zu reifen Osteoblasten exprimiert. Osteonectin ist äußerst wichtig für die Knochenumwandlung sowie den Erhalt der Knochenmasse. Es stellt innerhalb des Knochens das stärkste nichtkollagene, extrazelluläre Matrixprotein dar. Ein weiteres bedeutendes nichtkollagenes Matrixprotein ist das Osteocalcin. Sehr häufig wird es postproliferativ gebildet. Osteoblasten, Präosteozyten und reife Osteozyten, aber auch Odontoblasten sind zur Bildung fähig. Er gilt als knochenspezifischer Marker, der die Osteoblastenaktivität in Bezug auf Osteoidbildung und Knochenumwandlung widerspiegelt (NACK 2013).

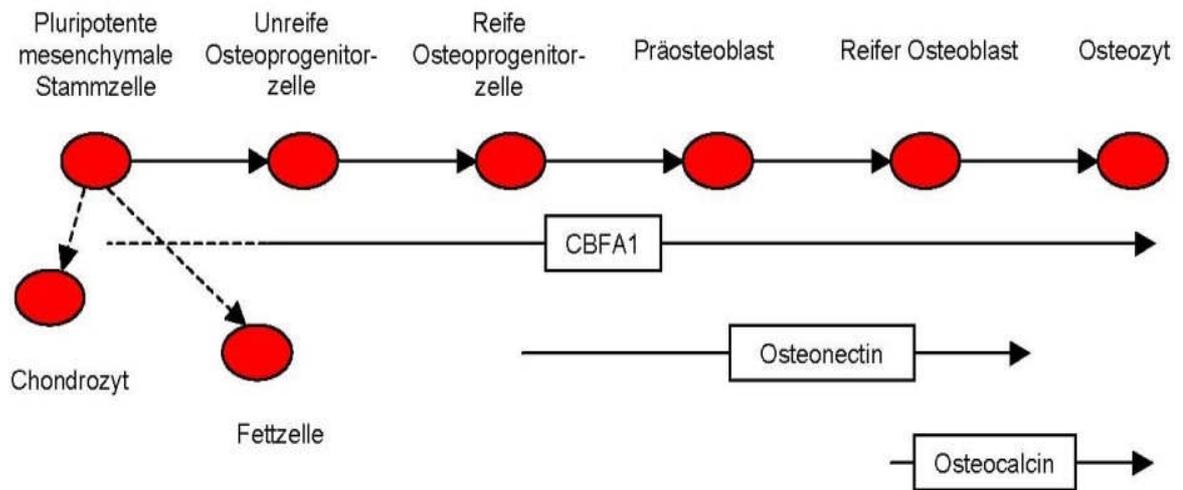


Abb. 5: Transkriptionsfaktoren und Knochenmarkergenen der Osteoblastenreifungslinie (aus NACK 2013)

Es existieren eine Reihe von Molekülen, einschließlich Hormonen, Vitaminen und lokalen Wachstumsfaktoren, die regulatorisch auf den Stoffwechsel der Osteoblasten einwirken. Diese Faktoren beeinflussen in vivo als auch in vitro die Synthese und Sekretion der Knochensubstanz (MAYAHARA et al. 1993, MITLAK et. al , 1996). Der molekulare Mechanismus verschiedener Faktoren ist nicht eindeutig geklärt, dennoch sollen im folgenden Abschnitt die verschiedenen Elemente näher beschrieben, welche stimulierend oder inhibierend auf die Differenzierung und Proliferation osteogener Zellen wirken.

4.6.1 L-Ascorbat

L-Ascorbat (Vitamin C) ist essentiell für die Kollagenproduktion und somit für die Stabilität der extrazellulären Matrix. Es dient als wichtiger Kofaktor bei der Hydroxylierung der Prolin- und Lysin-Reste während der Kollagensynthese. L-Ascorbat ist sowohl für die Expression von osteoblastären Markern als auch für die Mineralisierung der Osteoblasten notwendig (ARONOW et al. 1990).

4.6.2 Dexamethason

Dexamethason ist ein Glucocortikoid, das in seinem Wirkungsspektrum dem Cortisol sehr ähnelt. Es bindet an den cytoplasmatischen Glucocortikoidrezeptor und übernimmt eine bedeutende Rolle bei der osteogenen Differenzierung von Knochenvorläuferzellen. Eine Supplementierung von Dexamethason erhöht die Proliferation von Rattencalvarienzellen und die Bildung von „nodules“ (Knötchen) innerhalb der von Rattenknochenmarkzellen. Des Weiteren wird von Dexamethason auch die Differenzierung von Chondrozyten stimuliert und es erfolgt eine Beeinflussung der Alkalischen Phosphatase, welche zur Calciumablagerung während der Mineralisierung dient. Zudem hat Dexamethason auch die Fähigkeit in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren Knochenzellen zu regulieren (FARGALI 2006).

4.6.3 β -Glycerolphosphat

Bei der Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch Zellen, spielt β -Glycerolphosphat eine bedeutende Rolle. Mehrere Studien belegen, dass der Zusatz von β -Glycerolphosphat in vitro diesen Vorgang induziert. Untersuchungen von Bellows et al. 1992 zeigten über einen Zeitraum von 21 Tagen, dass sich sogenannte „nodules“ bildeten, wenn der Zusatz von β -Glycerolphosphat gegeben wurde. Die Gruppe beobachtete dies an der Kultivierung osteogener Rattencalvariazellen. Auch in vitro Studien an humanen Zellen des Knochenmarks zeigten diesen Effekt der osteoblastären Mineralisierung (COELHO und FERNANDES, 2000) und untermauerten die Beobachtung Bellows et al. 1992.

4.6.4 Cytokine

Es ist bekannt, dass bestimmte Cytokine an der Stimulation der Osteogenese beteiligt sind. Von zentraler Bedeutung ist dabei der direkte Effekt auf osteoblastäre Zellen. Zahlreiche in vitro Studien haben die Wirkung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF, FGF, PDGF-BB und EGF auf die Knochenzellentwicklung untersucht (FARGALI 2006).

4.6.4.1 Insulin-Like-Growth Factor (IGF) und Insulin

Zu der Gruppe der Insulin-like Growth Factors gehören IGF-I und IGF-II. Sie haben ein Molekulargewicht von ungefähr 7,5 kDa und werden von der Leber oder auch dem Knochengewebe produziert. IGF's und Insulin sind sich nicht nur ca. 70 % in ihrer Strukturhomologie (bezgl. ihrer Amniosauresequenz) ähnlich, sondern besitzen auch nahe zu identische „biologische Aktivitäten“. Betrachtet man sich die Zellen, Präosteoblast und Osteoblast, so findet man an diesen bestimmte Rezeptoren für IGF's und Insulin. Man differenziert zwei Rezeptortypen. Der IGFR Typ I besitzt eine starke Affinität zu IGF-I und ist somit größer als zu IGF-II und Insulin. Der IGFR Typ II, dient als „Andockstelle“ für IGF-II. Sowohl IGF-I als auch IGF-II erhöhen die DNA-Protein- und Kollagensynthese sowie die Alkalische Phosphatase-Aktivität. CENTRELLA et al. 1990 zeigte, dass IGF-I bei der Stimulation von Osteoblasten etwa drei- bis viermal wirksamer ist als IGF-II, so dass IGF-I die Bildung der Knochenmatrix effektiver reguliert.

4.6.4.2 Fibroblast Growth Factor (FGF)

Fibroblast Growth Factors sind Polypeptide die in Makrophagen, mesenchymalen Progenitorzellen, Chondrozyten und Osteoblasten synthetisiert werden. Man unterscheidet den sauren FGF-I vom basischen FGF-II, welche beide starken Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Zelltypen besitzen, insbesondere für osteogene Zellen. Beide Faktoren (FGF-I und FGF-II) binden an denselben Oberflächenrezeptoren. FGF's sind in der Knochenmatrix gespeichert und damit in der Lage die Knochenbildung in vivo zu stimulieren. Dem FGF-II wird im Vergleich zum FGF-I eine größere Wirkung zugesagt. Weiterhin zeigte sich, dass FGF-II einen mitogenen Effekt auf die Proliferation von Präosteoblasten und Osteoblasten hat und somit nachfolgend zu einem Anstieg der Knochenbildung führt. Es zeigten aber auch Studien, dass der Zusatz von IGF- II zur Kultivierung von osteogenen Zellen mit einer Reduzierung an Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der Kollagensynthese verbunden ist (FARGALI 2006).

4.6.4.3 Epidermal Growth Factor (EGF)

Über spezifische Rezeptoren hat der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) positive Auswirkungen auf die Replikation von Knochenvorläuferzellen und Osteoblasten. EGF hat mitogene Eigenschaften auf Osteoblasten und deren Vorläuferzellen und stimuliert deren Proliferation. Ihre Differenzierung wird inhibiert, wobei ähnlich wie bei den FGFs die Kollagensynthese und Alkalische-Phosphatase-Aktivität vermindert wird. Die Wirkung des EGF auf die Mineralisierung von Osteoblasten ist auch von der Wirkungszeit in der Kultur abhängig.

4.6.4.4 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Der PDGF wird in den Monocyten, Myoblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Osteoblasten und auch Tumorzelllinien (Osteosarkom-,Glioblastomzellen) gebildet. PDGF stimuliert ebenfalls Fibroblasten und beschleunigt auf diese Weise die

Wundheilung. Er kann allein sowie auch in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren, z.B. FGF die Knochenbildung in vivo regulieren. In vitro wird allerdings die Expression von Alkalischer Phosphatase in Osteoblasten sowie die Knochenmatrixbildung durch die Zugabe von PDGF zum Kulturmedium inhibiert. In der Gruppe der PDGF's kann man weiter differenzieren. Ohne weitere detaillierte Spezifika zu nennen, kann man PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB unterscheiden. PDGF-BB zeigt das höchste stimulatorische Potential und fördert damit die Kollagensynthese sowie die DNA-Replikation am effektivsten.

4.6.4.5 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Die BMPs gehören aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur der Transforming Growth Factor β (TGF β) Superfamilie (BERTRAM 2002). BMPs wurden in den 1960er Jahren von Marshall R. Urist entdeckt. Er injizierte entmineralisiertes Knochenpulver in Muskelgewebe von Kaninchen. Als Ergebnis erfuhr er eine ektopische Knochenneubildung (YETIMOGLU 2007). In den späten 70er Jahren beschrieb er dann die Existenz dieser Proteine. Seinen Ausführungen zufolge handelt es sich hierbei um schnell diffundierende Moleküle, die Membranen passieren und somit eine heterotopische Knochendifferenzierung bewirken können. In den späten 80er Jahren wurde mittels Isolierung und Sequenzierung von BMP-3 durch Luyten et al. 1989 und der Klonierung von humanen BMP-2 und BMP-4 durch Wozney et al. 1988 und Wozney 1992 die besondere Rolle der Proteine bei der Knochenentwicklung entdeckt (ADLER 2012). Bis heute sind ca. 20 Mitglieder der BMP-Familie identifiziert und charakterisiert worden, von denen sechs (BMP-2 bis BMP-7) osteoinduktives Potential aufweisen. Dabei wird BMP-2 und BMP-7 die stärkste knochenbildende Eigenschaft zugeschrieben. Ebenfalls sind BMPs neben den zuvor genannten Faktoren in der Lage mesenchymale Stammzellen und Vorläuferzellen des Knochenmarks positiv zu stimulieren. Einige BMPs haben synonyme Bezeichnungen. BMP-3 wird beispielsweise Osteogenin genannt, während BMP-7 und BMP-8 synonym für Osteogenetic Proteins (OP-1 und OP-2) verwendet wird. Neben diesen genannten Eigenschaften und trotz ihrer Namensgebung besitzen BMPs auch entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung anderer Gewebe, wie z.B. Niere, Auge und Myokard.

5 Diskussion

Reduzierte Knochenangebote können für die dentale Implantologie immer noch einen „limitierenden Faktor“ darstellen. Mittels GBR-Technik und Knochenersatzmaterialien können viele dieser Knochendefekte heute gut regeneriert werden, um anschließend Implantate primärstabil zu inserieren. Auch in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie werden häufig verschiedenste Knochendefekte, neben den häufig als Goldstandard bezeichneten autologen Knochentransplantaten, mit den oben genannten Möglichkeiten rekonstruiert. Nachteilig für den Patienten ist bei den autologen Knochentransplantaten immer die Entnahmemorbilität. Knochenersatzmaterialien dienen lediglich als Leitschiene, da sie nur osteokonduktiven Charakter zeigen und keine vitalen Zellen enthalten. Mit den Stammzellen zeigen sich neue und hoffnungsvolle Möglichkeiten neuen Knochen zu regenerieren. Dabei können humane embryonale Stammzellen als auch humane adulte Stammzellen als Zellmaterial genügen. Embryonale Stammzellen (ESC) können sich endlos teilen und sind fähig in alle Körperzellen zu differenzieren (Pluripotenz). Da eine kanzerogene Eigenschaft nicht auszuschließen ist, sind sie für die weitere Therapie nicht als sicher „geeignet“ einzustufen. Weiterhin bestehen die ethischen Bedenken, da für diese Stammzellen ungeborenes Leben getötet wird. Adulte (mesenchymale) Stammzellen (MSC) stellen hier eine passablere Alternative dar. Ethisch unbedenklich, keine immunologischen Reaktionen bei der Übertragung und die Differenzierung in Knochen-, Knorpel-, Muskulatur- und Fettgewebe sind nachgewiesen (FRIEDENSTEIN et al. 1976) worden. Im Zusammenhang mit dem Tissue Engineering ist es möglich, Gewebe zu reparieren oder gar zu ersetzen. Lange Zeit war die Reparatur solcher Gewebe nur unter Mithilfe künstlicher avitaler Zellen möglich. Inzwischen können durch lebende Zellen und Scaffolds deutlich verbesserte Ergebnisse aufgezeigt werden.

Gerade für den distalen Oberkieferbereich stellt sich die implantologische Versorgung häufig schwierig dar. Starke atrophische Prozesse lassen nur eine kleine Knochenbarriere bis zur Kieferhöhle erscheinen. Die Sinusbodenelevation kann als chirurgische Technik dem Knochendefizit (Auffüllen sowohl mit autologen als auch mit Knochenersatzmaterial) entgegenwirken. In einer tierexperimentellen Untersuchung von STUBBE et al. 2008 konnten die positive Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen bezogen auf den Sinuslift dargestellt werden. Bei Schafen wurden

Diskussion

beidseitig Sinusbodenelevationen durchgeführt. Dabei wurde auf der Kontrollseite das bovine Knochenersatzmaterial Bio-Oss® ohne Zusätze eingesetzt und auf der Testseite das Bio-Oss® mit autogenen mesenchymalen Stammzellen (MSC) kombiniert. Die MSCs wurden per Knochenmarksaspiration aus dem Beckenkamm gewonnen, im Labor aufbereitet und dem Augmentat mit beigemischt. 3 Schafe wurden einem 8-wöchigem und 3 weitere Schafe einem 16-wöchigem Überlebenszeitraum ausgesetzt. Nach Ablauf der Beobachtungszeiträume und Tötung der Tiere wurden die Kieferhöhlenaugmentate computertomographisch, histologisch und histomorphometrisch ausgewertet. Um das osteoinduktive Potential der Stammzellen einzuschätzen (in der Kombination mit dem Bio-Oss®) wurden die prozentualen Flächenanteile neu gebildeten Knochens auf beiden Seiten und in Gegenüberstellung der Überlebenszeiträume verglichen. Auf der Seite mit den augmentierten Stammzellen (MSC) konnte eine zu 49 % schnellere Knochenbildung gegenüber der Kontrollseite mit reinem Bio-Oss® gezeigt werden.

In einer Studie von Jafarian et. al. aus dem Jahr 2008 konnten ebenfalls die positiven Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf die Knochenbildung hervorgehoben werden. Er verglich an Unterkieferknochen von Hunden mit einer biphasischen Calciummatrix mit dem Knochenersatzmaterial Bio-Oss® allein sowie unter Einfluss bzw. Zusatz von mesenchymalen Stammzellen. Auch er konnte eine größere Knochenbildung in den Defekten mit Bio-Oss® und Stammzellen gegenüber den Knochendefekten die allein mit Bio-Oss® versorgt wurden aufzeigen. Ähnliche Ergebnisse der Knochenregeneration unter den Stammzellen konnte auch die Untersuchung in Ratten von Khojasteh et. al. 2008 zeigen. Hierzu wurden Knochendefekte einmal mit Bio-OSS® und mesenchymalen Stammzellen aufgefüllt und auf der anderen Seite mit der Auffüllung von Bio-Oss® und Platelet rich plasma (PRP) verglichen. Die Seite mit den mesenchymalen Stammzellen konnte eine deutlich größere Knochenbildung vorweisen als die Seite mit PRP. Sauerbier et al. 2011 konnte in seinen verschiedenen Arbeiten ebenfalls diese Tendenz der positiven Eigenschaften von MSC bezogen auf die Knochenregeneration feststellen. In einer randomisierten, kontrollierten Studie im „Cross-over-Design“ wurden bei zwölf Patienten Sinusbodenaugmentationen durchgeführt. Eine Seite wurde mit BMAC (Bone Marrow Aspirat Concentrat – konzentriertes Knochenmarkspirat) - BBM (Bovine

Diskussion

Bone Material: Bio-Oss®) und auf der anderen Seite AB (autologe Beckenspongiosa) – BBM verwendet. Nach 3,8 Monaten zeigte sich auf der BMAC-BBM Seite mit 17,7% signifikant mehr neuer Knochen als auf der AB-BBM Seite (12,2%).

In einer weiteren tierexperimentellen Studie wurde durch die Arbeitsgruppe um Raposo - Amaral et. al 2014 die Heilung von Kieferkammdefekten durch den „Goldstandard“ –autologes Knochentransplantat- im Vergleich zu den mit mesenchymalen Stammzellen versetzten BBM (Bovine Bone Material : BioOss Collagen®) und α -Tricalciumphosphat (Labiomat®, Brasilien) aufgefüllten Defekten verglichen. Man untersuchte 28 ausgewachsene männliche Ratten, denen ein Defekt (*critical size defect*) von 5mm Durchmesser in der Alveolarregion gesetzt wurde. Anschließend bildete man fünf verschiedene Gruppen. In die Gruppe 1 (n=7) fielen die Tiere, die diesen Defekt mit dem klassischen Knochenblocktransplantat versorgt bekamen. In die Gruppe 2 (n=5) erfolgte die Versorgung mittels reinen BBM ohne MSC. Die Gruppe 3 (n=5) bildeten die Tiere, die eine Defektauffüllung mit BBM und MSC erhielten. In der Gruppe 4 (n=5) wurde der *critical size defect* mit reinem α -Tricalciumphosphat ohne MSC versorgt, während in der Gruppe 5 (n=6) der Knochendefekt mit α -Tricalciumphosphat und MSC aufgefüllt wurde. Die Gruppen 2-5 wurden anschließend als Referenz mit Gruppe 1 verglichen. Es erfolgte eine histomorphometrische und computertomographische Auswertung (Abb. 5).

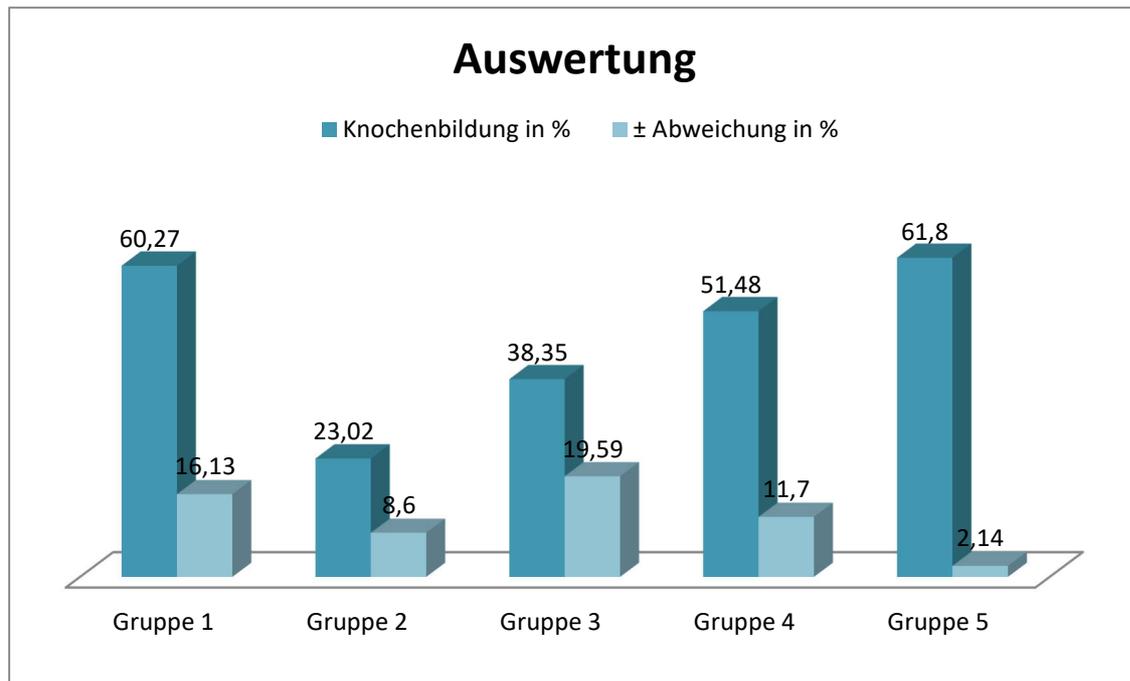


Abb. 5: Darstellung der neuen Knochenformation in Prozent

Die Ergebnisse zeigten in der Gruppe 1 60,27% ($\pm 16,13\%$) neue Knochenbildung im Defekt. In der Gruppe 2 ohne MSC erfolgte nur zu 23,02 % ($\pm 8,6\%$) neue Knochenbildung, während die Gruppe 3 mit MSC bei 38,35 % ($\pm 19,59\%$) lagen. Die beiden letzten Gruppen offenbarten mit dem α - Tricalciumphosphat im Vergleich zu den Vorgängern die stärkste neue Knochenformation. Gruppe 4 ohne MSC stellte 51,48 % ($\pm 11,7\%$) neuen Knochen dar, während die Gruppe 5 mit 61,8 % ($\pm 2,14$) die größte prozentuale volumenmäßige Knochenregeneration zeigte. Beide Gruppen zeigten jedoch keine statistische Signifikanz gegenüber der Referenzgruppe 1.

Handschel 2007 zeigte in seiner Arbeit die Eignung von ESC für das Tissue Engineering von Knochen. Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat sind ein geeigneter Zusatz um ESC osteogen differenzieren zu lassen. Weiterhin wurde untersucht auf welchen Biomaterialien ESC ihr Wachstumsverhalten am besten entwickeln. Dabei zeigte sich, dass die höchste Biokompatibilität ICBM (insoluble collagenous bone matrix) gefolgt von β -Tricalciumphosphat (Cerasorb® und Cerasorb M®), gemessen am Proliferationsverhalten und der rastermikroskopischen Morphologie aufwies. PLA/PGA (Copolymer auch Polylactat und Polyglykolsäure)

Diskussion

sowie anorganischer boviner Knochen Bio Oss® offenbarten die niedrigsten Werte und damit das geringste Wachstumsverhalten. Als Fazit dieser Studie lässt sie auch hier zusammenfassend eine gute oesteogene Differenzierung der ESC feststellen. Sie sind daher gut für das Tissue Engineering von Knochen geeignet.

Jaeckel et al. 2012 zeigte in seiner Arbeit den Einfluss von fettabgeleiteten Stammzellen auf die Knochenregeneration. Untersucht wurde ein *critical size defect* von 5mm Durchmesser an der Ratte. Für die Defektfüllung wurden einmal ADSC (adipose derived stem cells) in Kombination mit Fibrinkleber oder einem Trägermaterial aus Kollagen verwendet und mit einer Methode des protected bone healing (pbh), autologem Knochentransplantat sowie den Kontrollen ohne Therapie und Scaffold ohne Zellen verglichen. Dabei wurde in verschiedene Versuchsgruppen unterteilt (Tab. 3). Radiologische Untersuchungen zur Beurteilung des zeitlichen Ablaufs der Knochenneubildung erfolgten am Tag der Operation, sowie 1,2,4 und 8 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff. Die quantitative Auswertung wurde mit einem hochauflösenden flat-panel Volumen Computertomographen (fpvCT) durchgeführt und einer entsprechenden Software.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Mandibular- seite 1	Kontrollseite	pbh	Kontrollseite	scaffold	Pbh Fibrinkleber ADSC
Mandibular- seite 2	pbh	pbh Fibrinkleber ADSC	autologes Knochentrans- plantat	scaffold ADSC	pbh scaffold ADSC

Tab. 3: Darstellung der Versuchsgruppen – Gruppengröße n =10, split mouth Studie.

Therapieseiten critical size defect: Kontrollseite ohne Transplantat, pbh (protected bone healing) ohne Transplantat, pbh mit 500.000 ADSC (adiposed derived stem cells) eingebettet in Fibrinkleber, Transplantation eines Kollagenscaffold, Transplantation eines Kollagenscaffold nach 14 tägiger Kultivierung mit ADSC mit und ohne pbh. (aus JAECKEL et al. 2012)

Diskussion

Die Methode des pbh im Vergleich zu Kontrollseite ohne Therapie zeigte zum Ende der Studie nach 8 Wochen innerhalb der Versuchsgruppe 1 keine signifikante größere Knochenregeneration. In der Versuchsgruppe 2 offenbarte die Kombination von ADSC mit Fibrinkleber und pbh im Vergleich zur Kontrolle mit reinen pbh eine signifikant größere Knochenbildung. Das autologe Knochentransplantat in der Versuchsgruppe 3 zeigte ebenfalls eine größere Knochenregeneration im Vergleich zur Kontrolle ohne Therapie. Innerhalb der Versuchsgruppe 4 mit Kollagenscaffold und ADSC war keine signifikant größere Knochenvolumenzunahme, jedoch eine signifikant größere ossifizierte Defektfläche im Vergleich zur Therapieseite mit ausschließlich Kollagenscaffold erkennbar. Weiterhin keine Signifikanz der Knochenregeneration zeigte der Vergleich innerhalb der Versuchsgruppe 5 mit ADSC in Kombination mit Fibrinkleber und pbh mit ADSC in Kombination mit Kollagenscaffold und pbh. Nach 8 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und der Unterkieferknochen histologisch analysiert. In keinem histologischen Schnitt konnte eine komplette knöchernende Durchbauung nachgewiesen werden. Auf der Kontrollseite ist das umliegende Muskelgewebe in den Defekt vorgefallen, während auf der Therapieseite mit pbh diese vor dem umliegenden Gewebe geschützt wurden. ADSC in Kombination mit Fibrinkleber und pbh zeigte eine qualitativ gute Knochenregeneration im gesamten Defektbereich. Ebenfalls eine qualitativ gute Defektknochenregeneration ließ sich mit ADSC in Kombination mit Kollagenscaffold und pbh nachweisen. Die Studie zeigt, dass ADSC in Kombination mit Fibrinkleber und pbh für den Einsatz im „tissue engineering für Knochen“ geeignet ist. Zudem erweisen sich ADSC als mögliche Alternative zu ESC bzw. MSC.

Die Literaturrecherche sowie auch die verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten zeigen, dass sowohl embryonale, mesenchymale als auch fettabgeleitete Stammzellen positive Eigenschaften für die Knochenregeneration und Implantologie aufweisen. Vor allem die gute Datenlage für die mesenchymalen Stammzellen sind vielfältig und stärker an die Implantologie angelehnt (siehe Arbeiten von STUBBE et al. und SAUERBIER et. al). Sie offenbaren bereits eine „Klinik - / Praxisreife“ für eine bessere Knochenregeneration.

6 Literaturverzeichnis

ADLER T: Multiparametrische Bestimmung der Differenzierung humaner osteoblastärer Zellen in vitro. Med Diss Bonn 2012

AGHALOO TL, MOY PK : Which hard tissue augmentation techniques support are the most succesful in furnishing bony support for implant placement? Int J Oral Maxillofac Implants 22, Suppl: 49-70, 2007

ARONOW MA, GERTSENFELD LC, OWEN TA, TASSINARI MS, STEIN GS, LIAN JB: Factors that promote progessive development oft he osteoblast phenotype in cultured fetal rat calavaria cells. J.Cell.Physiol. 143, 213-221,1990

BELLOWS CG, HEERSCHJE JN, AUBIN JE: Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerolphosphat initiates mineralisation of osteoid nodules in vitro. Bone Miner 17, 15-29, 1992

BETZ H: Effekt von Trans-8-tert-butyl-GABA-Pentin-Lactam und Cis-8-tert-butyl-GABA-Pentin-Lactam auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von humanen mesenchymalen Stammzellen. Med Diss Freiburg, 2012

BERTRAM H: Untersuchungen zur Osteogenese von humanen mesenychmalen Stammzellen. Naturwissenschaftliche Dissertation, Braunschweig, 2002

BOSSHARDT DD,SCHENK RK: Biologische Grundlagen der Knochenregeneration.In Buser D (Hrsg.).Membrangeschützte Knochenregeneration in der Implantologie. Berlin,Quintessenz-Verlag,15-45, 2010

BRUDER SP, FOX BS : Tissue engineering of bone. Cell based strategies. Clin Orthop, 367 Suppl, 68-83, 1999

Literaturverzeichnis

BURT RK, VERDA L, KIM DA, OYAMA Y, LUO K, LINK C : Embryonic stem cells as an alternate marrow donor so without source: engraftment without graft-versus-host disease. J Exp Med 199(7), 895-904, 2004

CAPLAN AI : Mesenchymal stem cells. Journal of Orthopaedic Research 9, 641-650, 1991

CAMELO M, NEVINS ML, SCHENK RK, SIMION M, RASPERINI G, LYNCH SE, NEVINS M: Clinical, radiographic and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Giude. Int J Periodontics Restorative Dent 18(4), 321-331, 1998

CHAUDHRY GR, YAO D, SMITH A, HUSSAIN A : Osteogenic Cells Derived From Embryonic Stem Cells Produced Bone Nodules in Three-Dimensional Scaffolds. J Biomed Biotechnol 4, 203-210, 2004

CHENG SL, YANG JW, RIFAS L, ZHANG SF, AVIOLI LV: Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. Endocrinology 134 , 277-286, 1994

CENTRELLA M, MC CARTHY TL, CANALIS E: Receptors for insulin-like growthfactors-I and II in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. Endocrinology 126, 39-44, 1990

CHIAPASCO M, ZANIBONI M, BOISCO M : Augmentation procedures for the rehabilitation oft the deficient edentulous ridges with oral implants. Clin Oral Implants 17, Suppl 2 : 136-159, 2006

COHNHEIM J: Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologische Klinische Medizin 40 (1867). In: WOHLRAB F, HENNOCH U: The life and work of Carl Weigert (1845-1904) in Leipzig 1878-1885, Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie 134, 743-751, 1988

Literaturverzeichnis

COELHO MJ, FERNANDES MH: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerolphosphat and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21, 1095-1102, 2000

DRAB M, HALLER H, BYCHKOV R, ERDMANN B, LINDSCHAU C, HAASE H, MORANO I, LUFT FC, WOBUS AM : From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *Faseb J* 11(11), 905-15, 1997

FARGALI S: In vitro Etablierung eines Kanichenmodells zur Herstellung von hochvitalen Knochenimplantaten auf Basis osteogener Zellen und bioresorbierbarer Trägergerüste. Dissertation der Technischen Universität zu Braunschweig, 2006

FRIEDENSTEIN AJ, GORSKAJA U , KULAGINA NN :Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 4(5), 267-274, 1976

FRIEDENSTEIN AJ, CHAIL AKHYAN RK , GERASIMOV UV : Bone marrow osteogenetic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263-272, 1987

GLASS Y, EICKHOLZ P, NENTWIG GH, DANNEWITZ B: Glossar der Grundbegriffe für die Praxis – Knochenersatz-und –aufbaumaterialien. *Parodontologie* 19 (4), 465-474, 2008

GOLDBERG VM: Selection of bone grafts for revision total hip athroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 381, 68-76, 2000

GUTWALD R, HABERSTROH J, STRICKER A, RÜTHER E, OTTO F, XAVIER SP, OSHIMA T, MARUKAWA E, SETO I, ENOMOTO S, HOOGENDIJK CF, SCHMELZEISEN R, SAUERBIER S: Influence of rhBMP-2 on bone formation and osseointegration in different implant systems after sinus-floor elevation. An in vivo study on sheep. *J Craniomaxillofac Surg*, 38(8), 571-579

Literaturverzeichnis

HANDELSMANN M : Surgical guidelines for dental implant placement. Br Dent J,201, 139-152, 2006

HANDSCHEL J : Untersuchungen zur Eignung embryonaler Stammzellen für das Tissue Engineering von Knochen. Habil Schrift, Düsseldorf, 2007

HENG BC, CAO T, STANTON LW, ROBSON P, OLSEN B : Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. J Bone Miner Res 19(9), 1379-1394, 2004

HOEXTER DL: Bone regeneration graft materials. J Oral Implantol. 28(6), 290-294, 2002

HOFFMANN G : Folien (Membranen) in der zahnärztlichen Implantologie. Aktueller Überblick über die vorhandenen unterschiedlichen Materialien und deren Anwendung – eine Literaturübersicht- . Masterthese Krems-Österreich 2009

JAECKEL S : Rekonstruktion von kritischen Knochendefekten am Kiefer immundefizienter Ratten durch xenogene Transplantation humaner adulter fettabgeleiteter Stammzellen. Veterinär Diss Gießen, 2012

JAFARIAN M, ESLAMINEJAD MB, KHOJASTEH A, MASHHADI ABBAS F DEHGHAN MM, HASSANIZADEH R, HOUSHMAND B: Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod , 105(5), 14-24, 2008

JÄGER M, WILD A und KRAUSPE R: Pluripotente Mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (II): Biomaterialien und klinische Anwendung. [Pluripotent Mesenchymal Stem Cells and Osteogenesis (II): Biomaterials and clinical application] Osteologie 11(2),78-87, 2002

Literaturverzeichnis

JÄGER M, WILD A, KRAUSPE R: Pluripotente Mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (I): Grundlagen. [Pluripotent Mesenchymal Stem Cells and Osteogenesis (I): The Basics], Osteologie 11(2),55-66, 2002

JENSEN SS, BOSSHARDT DD, BUSER D: Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien. In Buser D (Hrsg.).Membrangeschützte Knochenregeneration in der Implantologie. Berlin,Quintessenz-Verlag,71-94, 2010

KLUG MG, SOONPAA MH, KOH GY, FIELD LJ : Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. J Clin Invest 98(1), 216-24, 1996

KOCHEL MB : Tissue engineering von Knochen – Entwicklung eines Zweikreis-Perfusionssystems für die Langzeitkultivierung von Knochenzellen in einer dreidimensionalen Matrix. Med Diss Würzburg, 2004

LUYTEN FP, CUNNINGHAM NS, MA S, MUTHUKUMARAN N, HAMMONDS RG, NEVINS WB, WOODS WI, REDDI AH: Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. J Biol Chem 264, 13377-13380, 1989

MANKANI MH, KUTNETSOV SA, FOWLER B : In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells : effect of carrier particle size and shape. Biotechnol Bioeng 72, 96-107, 2001

MAYAHARA H, ITO T, NAGAI H, MIYAJIMA H, TSUKUDA R, TAKETOMI S, MIZOGUCHI J, KATO K: In vivo stimulation of bone formation by basic fibroblast in rats. Growth factors 9, 73-80, 1993

MINZUNO H : Adipose-derived Stem Cells and for Tissue Repair and Regeneration – Ten Years of Research and Literature Review. Journal of Nippon Medical School, 76(2), 56-66, 2009

Literaturverzeichnis

MCDONALD JW, LIU XZ, QU Y, LIU S, MICKEY SK, TURETSKY D, GOTTLIEB DI, CHOI DW : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat Med 5(12), 1410-1412, 1999

MITLAK BH, FINKELMAN RD, HILL EL, LI J, MARTIN B, SMITH T, D'ANDREA M, ANTONIADES HN, LYNCH SE: The effects of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. J Bone Miner Res 11, 238-247, 1996

MORSCZECK C, GOSAU M : Stammzellen in der oralen Regeneration. Dtsch Zahnärztl Z 68, 348-352, 2013

NACK C : Immunhistochemische Analyse des osteogenen Potentials mesenchymaler Zellen von augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen nach 12 Wochen Einheilzeit. Med Diss Berlin, 2013

NAKAGAMI H, MORISHITA R, MAEDA K, KIKUCHI Y, OGIHARA T, KANEDA Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 13(2), 77-81, 2006

NYMAN S, LINDHE J, KARRING T, RYLANDER H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol 9, 257-265, 1982

OWEN M: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Bone and Mineral Research. William A. Peck, New York: Elsevier 1-25, 1985

OWEN M, FRIEDENSTEIN AJ: Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors, in: EVERED D, HARNETT S (Hrsg.). Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue. Chichester, 42-60, 1988

RAPOSO-AMARAI CE, BUENO DF, ALMEIDA AB, JORGETTI V, COSTA CC, GOUVEIA CH, VULCANO LC, FANGANIELLO RD, PASSOS-BUENO MR, ALONSO N: Is bone transplantation the gold standard for repair of alveolar bone defects?. J Tissue Eng. 5, 1-11, 2014

Literaturverzeichnis

SAUERBIER S: Optimale Knochenregeneration erreichen. ZWP Spezial 11, 4-7,2011

SAUERBIER S: Etablierung und Optimierung von Methoden zur Anwendung und Untersuchung von mesenchymalen Stammzellen. Med Diss Freiburg, 2008

SCHWARTZ Z, WEESNER T, VAN DIJK S, COCHRAN DL, MELLONIG JT, LOHMANN CH, CARNES DL, GOLDSTEIN M, DEAN DD, BOYAN BD: Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. J Periodontol 71(8), 1258-1269, 2000

SIMONOVSKA M: Eine histomorphometrische Metaanalyse über verschiedene Augmentationsmaterialien bei der Sinusbodenelevation. Med Diss, Düsseldorf, 2010

STEFFEN PC: Spontane Endotheliale Differenzierung von humanen fettabgeleiteten Stammzellen. Med Diss Gießen 2008

TERHEYDEN H, SADER R: Aktuelle Knochenaufbaumethoden. In Horch H-H (Hrsg.). Zahnärztliche Chirurgie. Praxis der Zahnheilkunde. Band 9. 4. Auflage München: Urban & Fischer, 345-383, 2002

TROUNSON A : Human embryonic stem cells : mother of all cell and tissue types. Reprod Biomed Online 4 Suppl 1, 58-63, 2002

TSUCHIDA H, HASHIMOTO J, CRWAFORD E : Engineered allogenic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defects in rats. J Orthop Res 21, 44-53, 2003

ULMER FL, WINKEL A, KOHORST P, STIESCH M : Stammzellen - Eine Perspektive der Zahnmedizin. Schweiz Monatsschr Zahnmed 120, 873-883, 2010

WARNKE PH, WILTFANG J, SPRINGER I, ACIL Y, BOLTE H, KOSMAHL M, RUSSO PA, SHERRY E, LÜTZEN U, WOLFART S, TERHEYDEN H : Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. Biomaterials 27, 3163-3167, 2006

WIESE KG: Mögliche Wege zum Bioengineering von Zahnkeimen. Implantologie Journal 17(5) ,12-16, 2013

WOLF F: Etablierung einer Methode zur Herstellung von adulten pluripotenten Stammzellen. Med Diss, Göttingen 2011

WOZNEY JM: The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. Mol Reprod Dev 32, 160-167, 1992

WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK LM, WHITTERS MJ, KRIZ RW, HEWICK RW, WANG EA: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 242, 1528-1534, 1988

YETIMOGLU C: Expression von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) während der Knochenentwicklung, der physiologischen Knochenheilung und der durch systemisch appliziertes Wachstumshormon (GH) stimulierten Knochenheilung. Med Diss Berlin,2007

ZHANG SC, WERNIG M, DUNCAN ID, THOMSON JA : In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 19(12), 1129-1133, 2001

ZUR NIEDEN NI, KEMPKA G, RANCOURT DE, AHR HJ : Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. BMC Dev Biol 5(1), 1, 2005

ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE D A, HUANG JI, MIZUNO H, ALFONSO ZC, FRASER JK, BENHAIM P, HEDRICK H: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 13(12), 4279–4295, 2002

Literaturverzeichnis

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng* 7(2), 211–228, 2001

7 Zusammenfassung

Nicht nur die Implantologie per se, sondern auch die verschiedenen Möglichkeiten der knöchernen Regeneration sowie deren unterschiedliche operative Verfahren zum Erhalt und Wiederaufbau der horizontalen und vertikalen Dimensionen haben entscheidenden Einfluss auf die Versorgung mit Implantaten genommen. Ästhetisch anspruchsvolle Regionen als auch „unterdimensionierte Knochenareale“ können heute oftmals zufriedenstellend und mit hoher Vorhersagbarkeit therapiert werden. An- und Auflagerungsplastiken, Distraktionsosteogenese, die verschiedenen Möglichkeiten der augmentativen Chirurgie mittels Eigenknochen sowie die Sinuslift-Operation haben uns in den letzten Jahren immer bessere Knochenareale regenerieren lassen, um eine ausreichende Ausgangssituation für Implantate zu schaffen. In jüngster Zeit erobert das wissenschaftliche Feld der „Stammzellen“ und damit einhergehend das *tissue engineering* in rasanter Weise die Medizin. Auch in der Zahnmedizin wurde viel Forschung auf diesem Gebiet betrieben und zeigt hoffungsvolle Ansätze für Regenerationen von Geweben in der Zukunft.

Ziel dieser Arbeit war es, die aktuelle Literatur zu Stammzellen mit Bezug zur knöchernen Regeneration und Implantologie zu recherchieren, ihre Eigenschaften aufzuarbeiten und in Anlehnung an wissenschaftliche Untersuchungen zu beschreiben. Dabei wurde eine Literaturrecherche in den Datenbanken „PubMed“ und „Google Scholar“ unter bestimmten Schlüsselwörtern durchgeführt. Die Ausschlusskriterien wurden einfach gehalten, ein Zeitfenster wurde nicht gesteckt und Querverweise der Literatur die zum Beispiel durch das Schnellballprinzip erfolgten, wurden ergänzend hinzugezogen. Insgesamt wurden aus den Datenbanken 76 Publikationen mit Bezug zur Implantologie ausgewertet und in der Arbeit berücksichtigt.

Stammzellen lassen sich nach ihrem Differenzierungsspektrum in totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente Zellen einteilen. Des Weiteren kann man ihrem Ursprung nach embryonale von adulten Stammzellen unterscheiden. In dieser Arbeit wurden für die knöchernende Regeneration innerhalb der Implantologie bzw. des Implantatlagers primär die embryonalen (ESC), mesenchymalen (MSC) sowie auch fettabgeleiteten Stammzellen (ADSC) berücksichtigt.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass sich sowohl die embryonalen Stammzellen (ESC) als auch die fettabgeleiteten Stammzellen für das *tissue engineering* von Knochen eignen. Die ADSC erweisen sich dabei als echte Alternative zu denen durch das Embryonenschutzgesetz schwierig zu gewinnenden ESC. Zudem sind ADSC sehr leicht, komplikationsarm und in höherer Zellzahl pro Gramm für die Züchtung zu gewinnen. Dieser Vorteil lässt sie ebenfalls sehr attraktiv als Alternative zu den MSC erscheinen, da diese in der Zellzahl pro Gramm deutlich geringer ausfallen. Den überwiegenden Teil an Publikationen zeigen die mesenchymalen Stammzellen (MSC) mit direktem Bezug zur Implantologie. Auch die Ergebnisstruktur ist hier sehr eindeutig. In mehreren Untersuchungen konnte durch die Zugabe von MSC gezeigt werden, dass eine schnellere Knochenregeneration erfolgte. Histologische, histomorphologische und computertomographische Auswertungen offenbarten gegenüber den Kontrollgruppen innerhalb bestimmter Zeiten oftmals eine stärkere Knochenzunahme bzw. Knochenbildung. Diese positive Eigenschaften der MSCs auf die Knochenregeneration wurde in sämtlichen Publikationen untermauert.

Hierdurch lässt sich abschließend festhalten, dass sowohl ESC, MSC und ADSC Verbesserungen für die knöchernde Regeneration und hiermit sekundär positive Eigenschaften für das zu implantierende Knochenlager zeigen. Des Weiteren stimmt die Literatur auf eine hoffnungsvolle Entwicklung, die möglicherweise weniger invasiv für den Patienten zu sein scheint.

8 Summary

Not only implantology, but also the different possibilities of regeneration of bones as well as their different operative procedures for the preservation and rehabilitation of the horizontal and vertical dimensions have had a decisive influence on the provision of implants. Nowadays, aesthetically challenging regions as well as “under-dimensional bone areas” can be treated in a satisfying way with a high predictability. Plastics for adsorption and support, distraction osteogenesis, the different possibilities of augmentative surgery with the help of autogenous bone as well as the sinus lift surgery have let us regenerate continuously improving bone areas in the last year in order to create a satisfying initial situation for implants. In recent times the scientific field of stem cells conquers the medical world and with it also tissue engineering. A lot of research, including in dentistry, has happened in this area and shows an optimistic approach for the regeneration of tissue in the future.

It was the objective of this work to research the topical literature about stem cells with regards to the bony regeneration and implantology, to process their characteristics and describe them in dependence on scientific examinations. Therefore, a research of literature was carried out in the databases “PubMed” and “Google Scholar” with certain keywords. The criteria for exclusion were kept easy, no time frame was set and further cross references of the literature which resulted from the snowball principle were additionally added. In total, 76 publications from the databases were evaluated in regards to implantology and were considered in this study.

Stem cells can be divided into totipotent, pluripotent, multipotent and unipotent cells regarding their differentiation spectrum. Furthermore, embryonic and adult stem cells can be distinguished by their origin. In this study, the embryonic (ESC), mesenchymal (MSC) as well as the stem cells derived from fat (ADSC) were primarily considered for the bony regeneration within implantology or storage of implants respectively.

Summary

The results show, that embryonic stem cells (ESC) as well as stem cells derived from fat are suitable for tissue engineering of bones. ADSC prove to be a real alternative to ESC which are difficult to obtain because of the law for the protection of embryos. Furthermore, ADSC are obtained for growing cultures in an easy way, with a low risk of complications and with an higher cell amount per gram. This advantage presents them as a very attractive alternative for MSC as well, because the later ones show a significant lower amount of cells per gram. The predominant part of literature refers to the mesenchymal stem cells (MSC) with a direct relation to implantology. The structure of results is very clear as well. In numerous examinations it could be shown by the addition of MSC that a faster regeneration of bones took place. Histological, histomorphological and computertomographic evaluations revealed a stronger gain of bones or building of bones in a certain amount of time in regards to the control groups. This positive feature of MSC on the regeneration of bones was strengthened in all publications.

Hereby it can be finally stated, that ESC, MSC as well as ADSC show improvements for the regeneration of bones and hereby also secondary positive features for the bones to be implanted. Furthermore, literature points to an optimistic development, which seems to be less invasive for the p

