

Verbesserte parodontale Regeneration mit einer Stammzellen enthaltenden Allotransplantatmatrix: Fallberichte



Bradley S. McAllister, DDS, PhD*

Parodontaldefekte mit approximalem horizontalem Knochenabbau oder einer Furkationsbeteiligung sind immer noch eine Herausforderung für die Regeneration im Mund. Die erfolgreiche Behandlung dieser Defekte mit einem neuen zellulären Allotransplantat, das native mesenchymale Stammzellen und Knochenvorläuferzellen enthält, wird in den folgenden Fallberichten gezeigt. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2011;31:149-155.)

Bei einem Kollaps des Parodontalgewebes um die natürlichen Zähne ist die regenerative Therapie recht schwierig. Um den natürlichen Zahnhalteapparat vollständig wiederherzustellen, müssen drei unterschiedliche Gewebetypen (Zement, parodontales Ligament und Knochen) regeneriert werden¹. Dies konnte sowohl mit der gesteuerten Geweberregeneration (GTR) als auch mit Knochenaugmentationen erreicht werden²⁻⁴. In ausgewählten Fällen haben sich diese Vorgehensweisen als erfolgreich erwiesen, z. B. bei zwei- oder dreiwandigen keilförmigen Defekten. Allerdings sind diese Optionen immer noch weniger gut prognostizierbar, wenn die Erkrankung um die natürlichen Zähne größere Schäden hinterlassen hat, wie z. B. Klasse-II- oder -III-Furkationen und einen signifikanten horizontalen Knochenverlust⁵. Solche Defekte sind schwer zu behandeln, denn der Zahn ist avaskulär, womit die vaskuläre Versorgung reduziert wird, und durch den größeren Abstand vom Knochenkamm ist die Zellrekrutierung eingeschränkt. Dies beeinträchtigt nachweislich die klinischen Ergebnisse⁶. Tatsächlich entscheiden sich die Behandler dann öfter dafür, die Zähne zu entfernen, die von einer schweren Parodontalerkrankung betroffen sind⁷.

* Privatpraxis, Tigard, Oregon; Assistenzprofessor, Department of Periodontology, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, USA.

Korrespondenz an: Dr. Bradley S. McAllister, 11525 SW Durham Rd, Suite D6, Tigard, OR, USA; Fax: +1 503-968-5419; E-Mail: mcallister@portlandimplantdentistry.com



Basierend auf den Erkenntnissen über die Stammzellentherapie kann mit der Verwendung von zellulären Allotransplantatmaterialien in schwer behandelbaren Parodontaldefekten vielleicht ein besser prognostizierbares Ergebnis erreicht werden⁸⁻¹¹. In neueren Tierstudien von Kawaguchi et al.¹² wurde gezeigt, dass aus Knochenmark gewonnene mesenchymale Stammzellen (MSC) die Regeneration von parodontalen Defekten bei Hunden verbessern kann. Eine Ankylose oder Wurzelresorption wurden nicht beobachtet, und sowohl Zement als auch parodontales Ligament und Knochen wurden regeneriert¹². Die Behandlung des parodontalen Defekts mit Stammzellen ist eine ideale Option, weil diese Zellen sich theoretisch in alle drei wesentlichen Gewebetypen differenzieren können, um das verloren gegangene Parodontium ohne Zellrekrutierung aus dem Nachbargewebe zu regenerieren. In einer Follow-up-Studie konnte dieselbe Forschungsgruppe dies nachweisen, indem sie die implantierten MSC mit grünem fluoreszierendem Protein markierte. Nach einmonatiger Heilung wurden die Hunde eingeschläfert. Die histologische Untersuchung zeigte das fluoreszierende Protein in allen Gewebetypen. Die implantierten MSC hatten sich offenbar in Zementblasten, Osteoblasten, Osteozyten und parodontale Fibroblasten differenziert¹. Der Autor hat einzelne komplexe Fälle von Parodontalerkrankungen mit einem zellulären Allotransplantat behandelt, das MSC und Knochenvorläuferzellen enthielt. Die Ergebnisse bisher sind vielversprechend, wie die klinischen und röntgenologischen Untersuchungen zeigten.

Gewinnung von Stammzellen enthaltenden Allotransplantaten

Die zelluläre Allotransplantat-Knochenmatrix wird kommerziell von Leichen entnommen, die von zugelassenen Gewebebanken (Osteocel, ACE Surgical Supply) stammen. Die Leichen werden in Flüssigeis gebettet und in die Einrichtung gebracht. Ihre Verwertung beginnt innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod der Spender. Parallel zur Entnahme werden rigorose Sicherheitstests durchgeführt, um eine Kontamination durch Bakterien, Pilze und Sporen auszuschließen. Neben der physischen Untersuchung erfolgt auch eine medizinische und soziale Anamnese, die ein Gespräch mit den nächsten Angehörigen einschließt. Auch umfangreiche serologische und mikrobielle Tests werden durchgeführt. Die Untersuchung der Spender wird mit der Prüfung aller medizinischen Befunde durch einen approbierten Arzt abgeschlossen.

Die Kortikalis wird von der zellulären Spongiosa separiert und zu demineralisierten Knochenpartikeln verarbeitet. Diese Knochenpartikel werden im Anschluss an die vollständige Bearbeitung wieder der zellulären Spongiosa-Transplantatkomponente beigemischt. Zur Bearbeitung der zellulären Komponente gehört auch eine selektive Immunodepletion, die mehrere Waschvorgänge umfasst. Dabei werden Zellen entfernt, die eine Immunreaktion auslösen können, wie z. B. rote Blutkörperchen und Lymphozyten. Damit bleibt nur die zellreiche Spongiosamatrix zurück, die native MSC und Knochenvorläuferzellen enthält. Sie wird mit einer antimikrobiellen Breitspektrumtherapie behandelt, um potenzielle Kontaminationen auszuschließen, wobei die Vitalität der Zellen erhalten bleibt. Die vitalen MSC und Knochenvorläuferzellen bleiben an

Abb. 1 Zelluläres Allotransplantat nach dem Auftauen und der Entfernung der Kryokonservierungslösung.



der Spongiosamatrix haften, wie mit der Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurde¹³. Nach dem Hinzugeben einer Kryokonservierungslösung wird das Produkt bei $-80\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ gelagert und ist fünf Jahre haltbar.

Es erfolgt eine fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, um zu bestätigen, dass fast alle übrigen Zellen positiv für Clusterdifferenzierung (CD)105 und CD166 und negativ für CD45 sind¹⁴. Dieses Markerprofil gilt für MSC und Knochenvorläuferzellen. Für jede Charge erfolgt eine Qualitätsprüfung, um einen Zellgehalt von mindestens 50000 Zellen/ml und eine Lebensfähigkeit von mindestens 70 % der Zellen zu validieren. Die Lebensfähigkeit der Zellen wird mit einer Trypanblau-Ausschluss-Färbung ermittelt. Die Zellaktivität wird mit einem In-vitro-Assay mit alkalischer Phosphatase¹³ validiert.

Das Knochentransplantat wird auf Trockeneis in die Praxis transportiert und nach Herstelleranweisung vorbereitet. Zunächst wird es im Wasserbad aufgetaut. Da es vitale Zellen enthält, darf die Höchsttemperatur während des Auftauens 37 °C nicht überschreiten. Nach dem Auftauen wird die Flüssigkeit abgossen und

das Transplantat kann innerhalb von vier Stunden in den Defekt eingebracht werden (Abb. 1). Für manche Defekte sind die Partikel (1 bis 3 mm) zu groß. Sie können dann mit einer Knochenzange vorsichtig zerkleinert werden.

Patientin 1

Eine 48-jährige Frau, Raucherin, stellte sich in der Praxis vor. Die Sondierungstiefe zwischen dem oberen linken zentralen und dem lateralen Schneidezahn, die beide mobil waren, betrug 9 mm (Abb. 2a). Im Röntgenbild zeigte sich ein signifikanter horizontaler Knochenverlust zwischen den Schneidezähnen (Abb. 2b). Außer Anweisungen zur Mundhygiene und einer Anpassung der Okklusion wurde zunächst keine Therapie durchgeführt, um die Rezession zu minimieren. Versuche, die Patientin zur Teilnahme an einem Raucherentwöhnungsprogramm zu bewegen, blieben erfolglos. Die Patientin erklärte sich mit einer chirurgischen Behandlung einverstanden. Ein Lappen voller Dicke wurde gebildet und das gesamte Granulations-

gewebe entfernt. Die Wurzeln wurden instrumentell geglättet (Abb. 2c). Die Knochenpartikel wurden mit Zangen zerkleinert, ehe sie in den approximalen Bereich eingebracht wurden (Abb. 2d). Der Lappen wurde mit Vicrylmaterial (ACE Surgical Supply) primär verschlossen. Die Heilung verlief komplikationslos, und in den ersten sechs Monaten kam die Patientin alle zwei Monate zum Follow-up-Termin. Nach sechs Monaten waren klinisch (Sondierungstiefe 4 mm) und röntgenologisch Verbesserungen (vertikale Knochenzunahme etwa 4 mm) zu beobachten (Abb. 2e und 2f).

Patientin 2

Eine 55-jährige Frau stellte sich mit einer Sondierungstiefe von 9 mm und einer lingualen Klasse-II-Furkationsbeteiligung am unteren rechten zweiten Molar vor (Abb. 3a). Die Patientin hatte eine chronische lokalisierte Parodontitis ohne sekundäre ätiologische Faktoren. Vor dem chirurgischen Eingriff erfolgte eine einleitende Therapie mit Zahnsteinentfernung und Wurzelglättung so-

Abb. 2 Patientin 1.



Abb. 2a und 2b (oben) Klinische und (rechts) röntgenologische Situation vor der chirurgischen Behandlung.

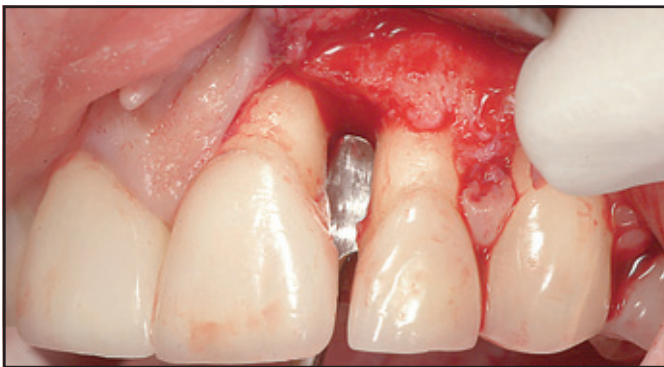


Abb. 2c (oben) Nach der Lappenbildung bestätigte sich der horizontale Knochenverlust zwischen den oberen linken Schneidezähnen.

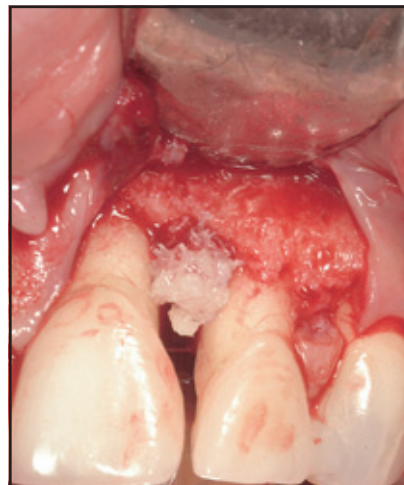


Abb. 2d (links) Insertion des zellulären Allotransplantats nach der Zerkleinerung der Partikel.



Abb. 2e (oben) Klinische Ansicht nach 6 Monaten: Eine signifikante Menge des interproximalen Weichgewebes konnte trotz des ursprünglichen Verlusts des tragenden Knochens erhalten werden.



Abb. 2f (links) Radiologische Darstellung nach 6 Monaten: Die vertikale Knochenzunahme zwischen den oberen linken Schneidezähnen beträgt etwa 4 mm.

Abb. 3 Patientin 2.

Abb. 3a (rechts) Ausgangssituation: Radiologische Darstellung des unteren rechten zweiten Molars.

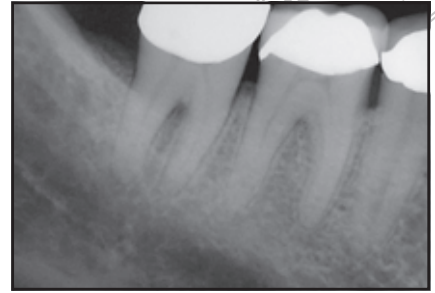


Abb. 3b (unten links) Klinische Ansicht nach Bildung eines Lappens voller Dicke und Kürettieren des Furkationsdefekts.

Abb. 3c (unten rechts) Insertion des zellulären Allotransplantats in die Furkation.

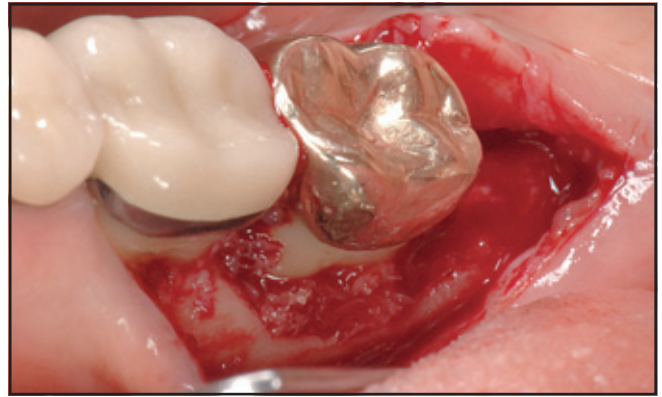
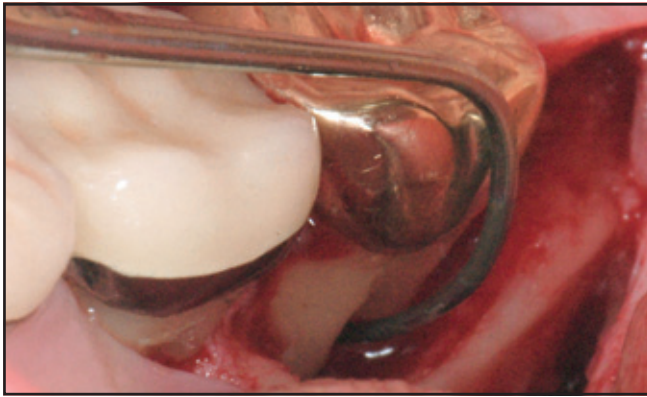
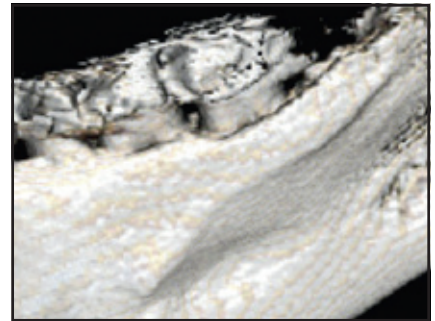


Abb. 3d (links) Radiologische Darstellung nach 6 Monaten Heilung.

Abb. 3e (rechts) Mit einem CT-Scan erstellte 3D-Rekonstruktion des Knochens und der Zähne, die die Regeneration der lingualen Furkationsbeteiligung nach 14 Monaten zeigt.



wie Anweisungen zur Mundhygiene. Die Patientin willigte in die chirurgische Behandlung ein. Nach der Bildung eines Lappens voller Dicke wurde das gesamte Granulationsgewebe aus dem Defekt entfernt. Die Wurzeln wurden instrumentell geglättet (Abb. 3b). Die Knochenpartikel wurden mit Zangen zerkleinert und in den Furkationsbereich eingebracht (Abb. 3c). Der Lappen wurde mit Vicrylmaterial primär verschlossen. Die

Heilung verlief komplikationslos und in den ersten sechs Monaten kam die Patientin alle zwei Monate zum Follow-up-Termin. Nach sechs Monaten ergab die klinische Untersuchung Sondierungstiefen von 3 mm. Die Röntgenanalyse zeigte eine Verbesserung der Situation im Furkationsbereich (Abb. 3d). Ein DVT-Scan (i-CAT, Imaging Sciences) zeigte nach 14 Monaten eine dreidimensionale knöcherne Auffüllung (Abb. 3e).

Diskussion

Dies ist der erste veröffentlichte Bericht über die Verwendung von allogenen MSC für die Behandlung von Parodontaldefekten. Es gibt bereits Berichte über die Behandlung von Parodontaldefekten mit autogenen zellulären Knochen-Transplantaten, die MSC enthielten¹⁵⁻¹⁸. Yamada et al.¹⁵ beschrieben eine Methode, um autogene MSC aus Beckenkamm-

mark-Aspiraten vor dem Einbringen in Parodontaldefekte zu reinigen und zu expandieren. Problematisch sind dabei die Veränderungen der MSC, die während der Kulturexpansion auftreten¹⁹. Schallhorn et al.¹⁶ und Dragoo und Irwin¹⁷ entnahmen mit der Bohrnadel nach Turkel autogenes Knochenmark aus dem Beckenkamm und transplantierten das gesamte Mark, das MSC und andere Zellen enthielt. Sie erreichten eine deutliche Korrektur der behandelten Parodontaldefekte¹⁶. Die Verwendung von komplettem Knochenmark kann jedoch eine Wurzelresorption induzieren, vor allem wenn wegen unzureichender Mundhygiene eine Entzündung entsteht^{20,21}.

Wird das hier beschriebene zelluläre Allotransplantat mit autogenen Knochenmark-Aspiraten aus der Hüfte verglichen, ergeben sich vier potenziell signifikante Nachteile²². Erstens bringt die Entnahme des Transplantats signifikante und logistische Probleme für den Patienten und das Risiko der Morbidität mit sich. Zweitens sind nach der Aspiratation nur rund 1000 MSC-Zellen/ml enthalten²³⁻²⁵. Drittens kann das unverarbeitete autogene Knochenmark Zellen hämatopoetischen Ursprungs enthalten, was eine Osteoklastenaktivität begünstigen kann^{23,24}. Viertens verbrauchen diese unerwünschten mehrheitlich vorliegenden Zellen in der Heilungsumgebung der chirurgischen Wunde anderweitig benötigte Nährstoffe. Bei der Behandlung von Parodontaldefekten mit autogenen Knochenmarktransplantaten aus der Hüfte gab es zwar positive Ergebnisse, aber die genannten Nachteile haben inzwischen dazu geführt, dass diese Methode kaum mehr Anwendung findet.

Das in diesem Bericht verwendete zelluläre Allotransplantat ist kommerziell erhältlich und dem Patienten

muss kein Transplantat entnommen werden. Nach einer selektiven Immunodepletion ist das Transplantat reich an MSC und Knochenvorläuferzellen ohne Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Die hier aufgeführten Fallberichte zeigen, dass positive Behandlungsergebnisse möglich sind. Aufgrund der Herkunft des Materials sind Wurzelresorptionen vermutlich nicht zu befürchten. Es sind allerdings weitere Untersuchungen und ein Langzeit-Follow-up erforderlich, um die bisherigen Probleme mit zellulären Parodontaltransplantaten gründlich zu untersuchen.

Ähnlich positive Anfangsergebnisse wurden bei der Verwendung von zellulären Allotransplantaten für die laterale Kammaugmentation und den Sinuslift im Rahmen einer Rehabilitation mit Dentalimplantaten^{13,14} sowie in der orthopädischen Anwendung²⁶ beobachtet. Die bisherigen Ergebnisse sind zwar vielversprechend, aber es sind noch weitere kontrollierte Studien notwendig, damit die Ergebnisse quantitativ mit anderen gut dokumentierten Methoden²⁷ verglichen werden können.

Danksagung

Die Produkte für dieses Projekt wurden von ACE Surgical zur Verfügung gestellt. Der Autor bedankt sich herzlich bei Dr. Tim Moseley, Senior Scientist, NuVasive, San Diego, Kalifornien, für seine Unterstützung bei der Schilderung zur Gewinnung des zellulären Allotransplantats und bei Frau Lynn Tucker von Orbit Imaging für die Formatierung der CT-Scan-Daten in der Anatomage-3D-Darstellung.

Literatur

1. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 2006; 77:1003-1007.
2. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982;9:290-296.
3. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: Bone replacement grafts. *Dent Clin North Am* 2010;54:55-71.
4. Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: Guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am* 2010;54:73-92.
5. Mellonig JT, Valderrama Mdel P, Cochran DL. Histological and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor combined with beta tricalcium phosphate for the treatment of human Class III furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009; 29:169-177.
6. Bowers GM, Schallhorn RG, McClain PK, Morrison GM, Morgan R, Reynolds MA. Factors influencing the outcome of regenerative therapy in mandibular Class II furcations: Part I. *J Periodontol* 2003; 74:1255-1268.
7. Avila G, Gailindo-Moreno P, Soehren S, Misch CE, Morelli T, Wang HL. A novel decision-making process for tooth retention or extraction. *J Periodontol* 2009;80: 476-491.
8. Intinini G. Future approaches in periodontal regeneration: Gene therapy, stem cells, and RNA interference. *Dent Clin North Am* 2010;54:141-155.
9. Tobita M, Mizuno H. Periodontal disease and periodontal tissue regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;55:168-174.
10. Caterson EJ, Nesti LJ, Albert T, Danielson K, Tuan R. Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. *MedGenMed* 2001: E1.11.



11. Malekzadeh R, Hollinger JO, Buck D, Adams DF, McAllister BS. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *J Periodontol* 1998;69:1256-1262.
12. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004;75:1281-1287.
13. McAllister BS, Haghghat K. Clinical applications of a stem cell based therapy for oral bone reconstruction. In: Li S, L'Heureux N, Elisseff J (eds). *Stem Cells and Tissue Engineering*. New Jersey: World Scientific, 2011 (in press).
14. McAllister BS, Haghghat K, Gonshor A. Histologic evaluation of a stem cell-based sinus-augmentation procedure. *J Periodontol* 2009;80:679-686.
15. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26:363-369.
16. Schallhorn RG, Hiatt WH, Boyce W. Iliac transplants in periodontal therapy. *J Periodontol* 1970;41:566-580.
17. Dragoo MR, Irwin RK. A method of procuring cancellous iliac bone utilizing a trephine needle. *J Periodontol* 1972;43:82-87.
18. Dragoo MR, Sullivan HC. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. I. Wound healing 2 to 8 months. *J Periodontol* 1973;44:599-613.
19. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000;28:707-715.
20. Dragoo MR, Sullivan HC. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. II. External root resorption. *J Periodontol* 1973;44:614-625.
21. Schallhorn RG. Postoperative problems associated with iliac transplants. *J Periodontol* 1972;43:3-9.
22. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 2001;19:117-125.
23. Smiler D, Soltan M, Albitar M. Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration. *Implant Dent* 2008;17:236-247.
24. Soltan M, Smiler D, Choi JH. Bone marrow: Orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration. *Implant Dent* 2009;18:132-141.
25. Cuomo AV, Virk M, Petrigliano F, Morgan EF, Lieberman JR. Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: Potential pitfalls from bench to bedside. *J Bone Joint Surg Am* 2009;91:1073-1083.
26. Rush SM, Hamilton GA, Ackerson LM. Mesenchymal stem cell allograft in revision foot and ankle surgery: A clinical and radiographic analysis. *J Foot Ankle Surg* 2009;48:163-169.
27. Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, et al. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: Results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol* 2005;76:2205-2215.