

Ein neuer Weg der regenerativen ...

PN Fortsetzung von Seite 1

Das Ziel der gesteuerten parodontalen Regeneration ist also, den Alveolarknochen, das Wurzelzement und einen funktionell ausgerichteten parodontalen Faserapparat so umfassend wie möglich wieder aufzubauen. Das gegenwärtig erreichbare und histologisch nachweisbare Behandlungsergebnis entspricht klinisch und röntgenologisch einem Attachmentgewinn und soll den langfristigen Zahnerhalt sichern. Es zeigt sich aber auch, dass eine vollständige Regeneration *ante integrum* nicht erreichbar ist. Obwohl viele Untersuchungen unternommen wurden, um die Faktoren und Zellen, die in die Regeneration des Parodontiums involviert sind, zu verstehen, konnten die vollständigen Funktionen und Aufgaben der Zellen des parodontalen Faserapparates (PDL), der Osteoblasten und der Zementoblasten für die parodontale Regeneration bisher nicht eindeutig verstanden werden. Eine Vielzahl von Studien geht davon aus, dass Zellen des parodontalen Faserapparates (PDL) unter regenerativen Bedingungen die Funktion von Osteoblasten und Zementoblasten übernehmen können (Gould et al., 1977; Lin et al., 1994; Mariotti et al., 1990; Melcher et al., 1970; Nojima et al., 1990; Piche et al., 1998). Andere Studien zeigen, dass PDL-Zellen als Regulatoren beziehungsweise Inhibitoren der Mineralbildung fungieren und somit eine Ankylose vermeiden (Lang et al., 1995; McCulloch et al., 1987; McNeil et al., 1998; Melcher et al., 1970; Melcher et al., 1987; Ogiso et al., 1991). Dabei geht man davon aus, dass der parodontale Faserapparat verschiedene Subpopulationen von Zellen enthält, die entweder die Bildung mineralisierter Strukturen fördern oder unterbinden können. Für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien kommen folgende Erklärungen in Betracht:

- die Heterogenität der Zellen des parodontalen Faserapparates,
- die Variation im Aufbau der *In-vitro*-Studien,
- der Verlust spezifischer Zellcharakteristika des parodontalen Faserapparates *in vitro*.

Das gegenwärtige Verständnis dieser regenerativen Vorgänge im Parodont scheint darauf hinzudeuten, dass der Ursprung der regenerativen Zellen sowohl vom Knochen, vom parodontalen Faserapparat (PDL) als auch vom Wurzelzement ausgehen kann (Wang et al., 1998), mit einer besonderen Konzentration auf paravaskulär lokalisierte parodontale Zellen. Diese Schwierigkeiten, die mit dem Erzielen einer vorher-sagbaren parodontalen Regeneration verbunden sind, machen die Entwicklung neuer regenerativer Techniken, wie das „*Tissue Engineering*“ notwendig, um die endzünftig bedingte Destruktion des parodontalen Hart- und Weichgewebes zu beseitigen. Eine der Hauptfordernisse für die parodontale Gewebsregeneration mittels

„*Tissue Engineering*“ ist die Verfügbarkeit von *ex vivo* expandierten Stammzellpopulationen oder die Mobilisierung autologer und gewebespezifischer Vorläuferzellen, die in der Lage sind, zu proliferieren und sich in das ortsständige parodontale Gewebe zu differenzieren. Adulte Stammzellen erfüllen diese Erfordernisse, wobei die kürzliche

davon aus, dass jedes ortsständige Gewebe eine kleine Fraktion von Stammzellen mit einzigartigen Fähigkeiten beinhaltet, die sich in ihren biologischen Eigenschaften von den ausgereiften Zellen unterscheiden. Diese Theorie wurde durch die Isolation aus dem Knochenmark stammender hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) untermauert.

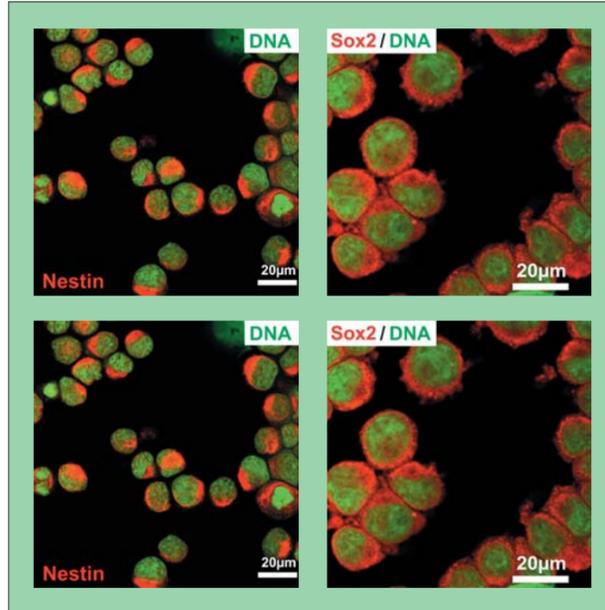


Abb. 2: Immunhistochemisches Profil der kultivierten Parodontosphären (Widera et al., 2007).

Marker	Expression	Nachweismethode
Nestin	+	ICC, RT-PCR
Sox2	+	ICC, RT-PCR
GFAP	-	ICC, RT-PCR
b-III-tubulin	-	ICC
CD117	(+)	RT-PCR
CNPase	+	RT-PCR
Emx2	+	RT-PCR
Oct2	(+)	RT-PCR
CD34	-	RT-PCR
CD45	-	RT-PCR
NeuroD1	-	RT-PCR
CD90	-	RT-PCR
GMNN	-	RT-PCR
MBP	-	RT-PCR
CD133	-	RT-PCR

Abb. 3: Vergleichende Charakteristik der parodontalen Stammzellen mittels RT-PCR (Widera et al., 2007).

Identifikation von Stammzellen im parodontalen Gewebe einen sehr wichtigen Schritt in Richtung einer vorhersagbaren parodontalen Regeneration darstellt (Ivanovski et al., 2006).

Gegenwärtiger Stand der Stammzellforschung

2006 veröffentlichte das National Institut of Health (NIH) der USA einen ersten Ergebnisbericht zum Stand der therapeutisch genutzten Stammzellforschung (NIH 2006) auf dem Gebiet der Regenerationsmedizin.

Aus dem Bericht wird deutlich, dass ein noch langer Weg vor der wissenschaftlich-medizinischen Forschung bis zur therapeutischen Umsetzung der vorliegenden Forschungsergebnisse liegt. Besonders geprägt ist der Bericht von der differenzierenden Darstellung der klinischen Potenziale der embryonalen Stammzelle in der Abgrenzung zur adulten Stammzelle. Eine adulte Stammzelle ist *per definitionem* eine Zelle, die multipotent, klonogen, hochproliferativ und fähig zur Gewebsregeneration ist. Man geht heute

Diese sind multipotent und führen zur Entwicklung von entsprechenden Vorläuferzellen, die sich daraufhin nur noch in eine spezifische Linie des hämatopoetischen Systems (myeloide, erythrozytische, megakaryozytische oder lymphozytische Zelllinien) entwickeln können. Die von den Vorläuferzellen abstammenden, nun weiter ausdifferenzierten Zellen verlieren graduell mit der Alterung und den differenzierteren Funktionen ihr Proliferationspotenzial (Weissmann, 2000).

Eine embryonale Stammzelle ist hingegen eine, meist aus der inneren Zellmasse der Blastozyste stammende, pluripotente Zelle, die in der Lage ist, in jeden Zelltyp zu differenzieren und in einem undifferenzierten Stadium verbleiben kann (Evans und Kaufmann, 1981; Keller, 1995). Lediglich die Zygote ist omnipotent und kann pluripotente Stammzellen generieren, die in der Lage sind, neben somatischen Zellen auch den Trophoblasten auszubilden. In der späteren Entwicklung produzieren diese gewebespezifischen Stammzellen, die zunächst multipotent und später im Rahmen der weite-

ren Differenzierung nur noch unipotent sein werden. Aus zellbiologischer Sicht besitzt jede Stammzelle die Fähigkeit zur Proliferation, zur Migration und zur Differenzierung, die aber hierarchisch im Hinblick auf die zu bildenden Zielzellen ausgeprägt ist. Zipori (2005) geht in seinen Untersuchungen jedoch davon aus, dass die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Hierarchie lediglich optional sind und dass ausschließlich die Fähigkeit zur Plastizität essenziell für Stammzellen ist. Weiterhin gilt als erwiesen, dass pluripotente Zellen nicht nur in dem Blastula-Stadium beim Embryo vorkommen, sondern dass auch im adulten Organismus adulte, somatische Stammzellen vorhanden sind. Damit wird eine aus der bisherigen Stammzell-Theorie abgeleitete Annahme überwunden, die von einer Gewebespezifität adulter Stammzellen mit einem beschränkten Spektrum an Differenzierungs-Optionen ausgegangen ist. Eine adulte Stammzelle ist also *per definitionem* eine Zelle, die fähig zur Gewebsregeneration ist. Postnatale adulte Stammzellen wurden bisher erfolgreich aus verschiedenen Geweben isoliert, unter anderem aus dem Knochenmark, aus dem Blut, aus neuronalem Gewebe, aus Skelettmuskeln, aus verschiedenen Epithelien, aus der Zahnpulpa, aus dem Parodont und aus dem Zahnfollikel (Gronthos, 2000; Evers et al., 2003; Korbiling und Estrov, 2003; Seo et al., 2004, Sonoyama et al. 2006).

Konzept für eine regenerative Parodontaltherapie

Vor Kurzem ist es gelungen, parodontale Stammzellen im Parodont von extrahierten menschlichen Weisheitszähnen zu identifizieren (Seo et al., 2004). Das Parodont stellt ein Zellerneuerungssystem in dauerndem „*steady state*“ dar. Typischerweise generieren Stammzellen intermediäre Zelltypen (Ivanovski et al., 2006), bevor sie ihren voll ausdifferenzierten Zustand erreichen. Diese intermediären Zellen werden als Vorläufer- oder Progenitorzelle (z.B. Prä-Fibroblasten, Prä-Osteoblasten etc.) bezeichnet. In einer perivaskulären Lokalisation konnten parodontale Vorläufer-Zellen, die Eigenschaften somatischer Stammzellen zeigten, identifiziert werden (Bartold et al., 2006; Ivanovski et al., 2006; Miura et al., 2003; Nagatomo et al., 2006; Seo et al., 2004; Shi et al., 2001; Shi et al., 2005). Diese Stammzellen sind in zweidimensionalen Zellkulturen auf Plastikoberflächen adhären Zellen, die in der Lage sind, Kolonien zu bilden und den aus dem Knochenmark gewonnenen humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) ähnlich sind (Friedenstein, 1980; Gronthos et al., 1994; Morsczech et al., 2005; Owen und Friedenstein, 1988; Pit-

tenger et al., 1999). Weiterhin gelang es, parodontale Stammzellen als eine Population multipotenter Stammzellen zu charakterisieren, die die Fähigkeit besitzen, sowohl alveolären Knochen, Wurzelzement als auch parodontalen Faserapparat nach *In-vivo*-Transplantation im Tierversuch zu bilden (Seo et al., 2004).

Diese parodontalen Stammzellen sind als STRO-1/CD146-positive Vorläuferzellen charakterisiert, die offen-



Abb. 4: Minimalinvasiver parodontal-chirurgischer Eingriff mit gewebespezifischem Zugang zum subepithelialen Bindegewebe, parodontalem Faserapparat, Wurzelzement und alveolären Knochen.

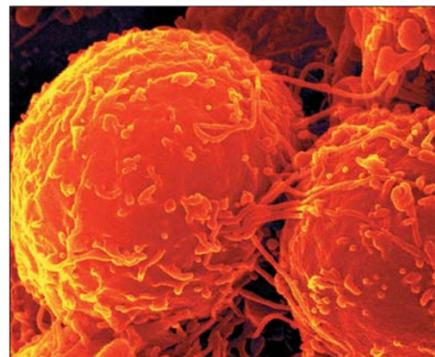


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung parodontaler Stammzellen.

sichtlich aus perivaskulären Nischen des Parodonts stammen (Seo et al., 2004). Inzwischen konnte an diesen parodontalen Stammzellen eine Reihe wichtiger Stammzell-Marker nachgewiesen werden. Dazu gehören Sox2 und Nestin als Marker (Sonoyama et al., 2006) für undifferenzierte Zellen. Nestin, eines der Intermediärfilamente, die das Zytoskelett aufbauen, ist ein Marker für neurale Stamm- und Vorläuferzellen. Seine Expression ist ebenso mit der Zahnentwicklung und der Tertiärdentinbildung verbunden (Fujita et al., 2006). Dies deutet auf eine Verbindung zwischen der Fähigkeit dentaler Gewebe zur Regeneration und der Hochregulation des Nestins unter pathologischen

notyp zu differenzieren. Notch-1 wurde in diesem Zusammenhang als Marker für neuronale Stammzellen und für dentale Stammzellen beschrieben (Harada et al., 1999; Johannson et al., 1999). Weiterhin exprimieren parodontale Stammzellen den Marker Scleraxis (Shi et al., 2005). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass vor allem Nestin und Sox2 Marker für Vorläuferzellen des Parodonts sind.

Der gleichzeitige Nachweis von für mesenchymale und für neurale Stammzellen spezifischen Markern an parodontalen Stammzellen unterstützt die schon lange von oralen Anatomen (Sperber, 1992) vertretene These zur prinzipiell ektodermalen Herkunft parodontaler Stammzellen. Damit wird aber ebenfalls die offensichtlich bestehende Heterogenität der parodontalen Stammzellen unterstrichen, wie das von Sakaguchi et al. (2004) angenommen wird.

Ausgehend von diesen zellbiologischen Grundlagenforschungsergebnissen werden gegenwärtig in der parodontologischen Grundlagenforschung zwei weiterführende parodontal-regenerative Therapieansätze untersucht (Nakahara, 2006):

- *ex vivo*: Dabei wird das parodontale Gewebe als Zellkultur auf der Grundlage eines bioabbaubaren Zell-trägermaterials unter Verwendung von spezifischen Zellmedien im Labor expandiert.
 - *in vivo*: Dabei werden entweder gewebespezifische Wachstumsfaktoren oder gentechnisch veränderte Proteine in den parodontalen Defekt (überwiegend auf der Basis von „*delivery systems*“) eingebracht, um damit die natürliche parodontale Regeneration zu verbessern.
- Zur Entwicklung von *ex vivo* expandierten parodontalen Stammzellkulturen (PStZ) für eine klinische Therapie sind folgende Schritte notwendig (Abb. 1):
- Optimierung der *Ex-vivo*-Gewinnung der parodontalen Stammzellen aus den Patienten.

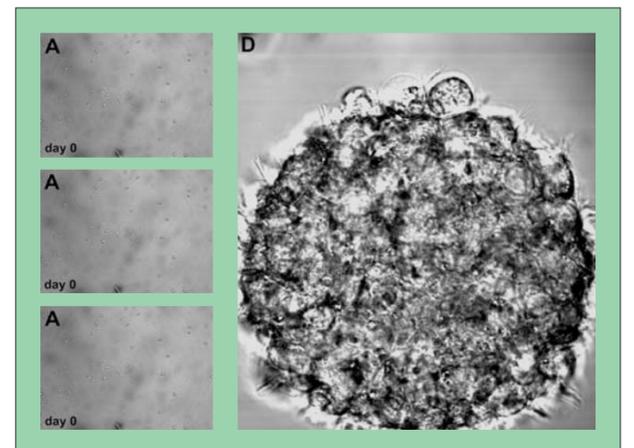


Abb. 6: Bildung von Zell-Sphären aus im Rahmen unserer Pilotstudie isolierten parodontalen Stammzellen.

Bedingungen hin (About et al., 2000). Miura und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass Stammzellen der Zahnpulpa menschlicher extrahierter Milchzähne in der Lage sind, sich in Zellen mit neuronalem und glialem Phä-

- Optimierung der Vermehrung der Zellen *ex vivo* unter Laborbedingungen
- Nachweis der Langzeitaufbewahrung unter optimalen Lagerungsbedingungen

Fortsetzung auf Seite 8 PN