

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
Direktor Prof. Dr. Dr. M. Heiland

## **Evaluation der primären Implantatstabilität nach experimenteller Sinusbodenelevation mit autologen mesenchymalen Stammzellen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Dr. med. Björn Riecke  
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2011

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.08.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Amling**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Max Heiland**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Priv. Doz. Dr. Dr. Andreas Kolk**

**Primary implant stability after maxillary sinus augmentation  
with autogenous mesenchymal stem cells:  
a biomechanical evaluation in rabbits**

Björn Riecke, Max Heiland, Arne Hothan, Michael Morlock,  
Michael Amling, Felix A. S. Blake

Department of Oral and Maxillofacial Surgery (B.R., F.A.S.B.)

University Medical Center Hamburg Eppendorf, Germany;

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, General Hospital Bremerhaven, Germany (M.H.);

Institute of Biomechanics, Technical University Hamburg-Harburg (A.H., M.M.) and the

Center of Biomechanics and Experimental Traumatology (M.A.), University Medical Center Hamburg  
Eppendorf, Germany;

**Corresponding author:** Björn Riecke., Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University  
Medical Center Hamburg Eppendorf, Martinistr. 51, 20246 Hamburg, Germany, Telephone: +49-40-  
7410-53259, Telefax: +49-40-7410-40008, briecke@uke.uni-hamburg.de.

**Running title:** primary implant stability after sinus floor augmentation

**Key words:** primary implant stability, maxillary sinus floor augmentation, adult mesenchymal stem  
cells, osteoblast precursor cells, stem cell transplantation

**Word count (body):** 2.765      **Word count (abstract):** 220

## **ABSTRACT**

---

### **OBJECTIVES**

To mechanically evaluate the effect of transplantation of precultured preosteoblasts derived from autogenic adult stem cells (aMSC) for experimental sinus floor augmentation on primary dental implant stability in comparison to conventional augmentation procedures in rabbits.

### **MATERIAL AND METHODS**

After experimental sinus floor augmentation with a synthetic bone substitute, autogenous bone transplantation or osteoblast precursor cells the primary stability of implants inserted in the edentulous part of the upper jaw of New Zealand White Rabbits was examined. Mechanical evaluation was performed by determination of insertion torque values (Osseocare™), percussion testing (Periotest™), resonance frequency analysis (Osstell™ and scanning laser Doppler vibrometer) and measurement of extraction forces.

### **RESULTS**

Evaluation of mechanical properties with percussion testing and resonance frequency analysis with Osstell™ revealed slightly higher primary stability of the stem cell group whereas the scanning laser Doppler vibrometer and measurement of pull-out forces showed no significant difference to the bone substitute group. Transplantation of autogenous bone graft resulted in highest primary implant stability.

### **CONCLUSIONS**

The three examination modalities proved suitable for the determination of primary implant stability. The experimental maxillary sinus floor augmentation with precultured osteoblast precursor cells from autogenic stems cells clearly enhanced primary stability of implants compared to the unaugmented sinus and lead to comparable primary mechanical properties to bone substitutes in rabbits. In comparison to the autogenous bone graft stability enhancement by stem cell transplantation declined.

## INTRODUCTION

Osseous reconstruction for stability enhancement of dental implantation continues to be a challenge in oral and maxillofacial surgery. The gold standard is still the transplantation of autogenous bone from another part of the body. The bone is primarily vital and without immunological host-graft interferences.

A great variability exists in the form and composition of the transplant. Cancellous, cortical or a mixture of both can be harvested, adapted to the desired qualities needed at the site of reconstruction. Contrary, the implementation of an autogenic bone transplant demands the harvesting of a restricted amount of bone from a healthy donor site, inflicting a second injury to the patient, increasing the overall morbidity. To circumvent these problems, numerous alternatives have been encouraged and established (Govindaraj et al. 1999). The origin and composition of bone substitutes are very variable. Homologous, heterologous and xenogenous substitutes in different forms are currently available (Eppley et al. 2005, Stevenson S. 1999).

Due to the fact that substitute products of human or bovine origin encompass a minute infectious risk, other alternatives should be considered. Although all these products differ in their composition they all have one thing in common. They are all non-vital and incapable of autonomous bone formation. In this regard they are passive and dependent on the surrounding tissue for the healing process by creeping substitution (Garg et al. 1997). This is of special concern in patients with decreased healing ability for example after chemotherapy or radiation or in situations of compromised immune competence or reduced healing capacity like in long term diabetes. Furthermore implantation of non-vital, allogenic, xenogenic or artificial material carries the risk of prolonged or incomplete remodeling, extensive surrounding resorption or disintegration (Haas et al. 2002, Hallman et al 2001, Nishibori et al. 1994).

The development of a vital bone substitute with a high osteogenic potential remains a clear aim of up-to-date research. In this regard the transplantation of adult mesenchymal stem cells (aMSC) seems to be a promising approach in order to ameliorate local bone properties (Smiler et al. 2007, McAllister et al. 2009). aMSC are pluripotent cells that arise from the mesenchyme during development. They reside in the bone marrow and in conjunction with hematopoietic stem cell they regulate the maturation of both hematopoietic and non-hematopoietic cells. aMSC possess an extensive potential to proliferate and differentiate e.g. into osteoblasts, osteocytes, adipocytes and chondrocytes (Heino and Hentunen 2008). The isolation, extracorporal cultivation and differentiation of aMSC into osteoblast precursor cells capable of bone formation as well as their in vitro amplification and the ability of transplantation into the maxillary sinus have been demonstrated (Sauerbier et al 2009, Fuerst et al 2004). Furthermore it has been verified that these osteoblast precursor cells deposit a bone matrix (Jaiswal et al. 1997). Nevertheless the utilization of aMSC's for bone reconstruction in the clinical day to day routine is still at the very beginning (Schimming R. & Schmelzeisen R. 2004). In addition the benefit of such a procedure regarding stability enhancement of dental implants remains unclear.

To address this question experimental sinus floor augmentation in New Zealand White Rabbits has been performed. Aim was to evaluate the primary stability of dental implants inserted in upper jaws following sinus floor augmentation using different materials. Primary stability was considered crucial

for the success of dental implants (Meredith N. 1998; Lioubavina-Hack et al. 2006). Additionally various methods for primary stability assessment were compared.

## MATERIAL AND METHODS

---

The animal experiments were approved by the local animal experimentation committee and were performed in conjunction with the veterinarian department of University Medical Center Hamburg-Eppendorf. The animal experiments were performed using New Zealand White Rabbits, adult exbreeders weighing 3-4 kg.

Four groups of eight rabbits each were formed for three different augmentation methods and a control collective. Augmentation was performed by insertion of biphasic calcium phosphate (60% hydroxyapatite, 40% beta-tricalciumphosphate), transplantation of autogenous iliac crest bone or transplantation of extracorporal differentiated and cultivated osteoblast precursor cells derived from autogenic peripheral aMSC.

For all operative procedures the animals were anaesthetised using 35 mg / kg body weight ketaminhydrochloride and 5 mg/kg body weight xylazinhydrochloride 2% administered intravenously through the dorsal ear vein and 10 mg / kg body weight enrofloxacin was given subcutaneously.

For the harvest of bone marrow aspirate 0.5 ml of a local anaestheticum (lidocaine 1%) was injected in the region of the iliac crest. 3 ml of bone marrow was aspirated with a Gallini™ biopsy needle (15 G, 43 mm) and immediately mixed with 2 ml 100 I.E. heparin solution (Canusal™). For the harvest of an autogenous bone, the iliac crest served as donor site harvested using a Luhr forceps resulting in a mixture of cortical and cancellous bone material. The harvesting site was closed using staples (AutoSuture™ Skin Stapler). During the postoperative phase the animals were fed *ad libitum*.

Isolation of aMSC out of bone marrow aspirate involved a density gradient (FICOLL) via centrifugation (GS-6, Beckmann, Munich, Germany). This was followed by further isolation via plastic adherence (cell culture flasks Falcon™ 25 cm<sup>2</sup>), incubated with fetal calf serum (FCS) and expanded million-times within 3 weeks according to Haynesworth et al, 1992. With this method a million-time expansion was possible achieving a yield in our experiment between 1.5-3.5 x 10<sup>6</sup> cells. After 14 days the cells were exposed to a differentiation medium (ascorbic acid, glycerol phosphate and dexamethasone) to facilitate differentiation into osteoblast precursor cells, capable of bone formation. The successful osteogenic differentiation was verified by biochemical analyses and quantification of mineralization (Hahn et al.,1991). This included the measurement of alkaline phosphatase and the synthesis of osteocalcin. At this point, the cells were introduced to a bovine collagen matrix (Lyostypt™) and further incubated for 3 days. Randomly chosen samples were frozen and cryosections were cut. To visualise the cells within the collagen matrix cell nuclei were stained by DAPI and the cytoskeleton by FITC-labelled phalloidin. Using fluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy information about distribution of the seeded cells within the collagen matrix was provided. Osteogenic differentiation of seeded cells was monitored by immunofluorescence staining of markers for osteoblasts (alkaline phosphatase, bone sialoprotein and osteopontin).

Operative sinus floor elevation was performed on both sides as described by Choi et al. 2006 and Scharf et al., 1995. This involved a median nasal incision, downwards mobilisation of the soft tissue until the osseous border of the maxillary sinus became visible and osteotomy of a 1 cm x 1 cm lateral window using a drill. After that the sinus membrane was prepared without laceration and exactly 1 g of the carrier with stem cells alone or autogenous bone or biphasic calcium phosphate (60% hydroxyapatite, 40% beta-tricalciumphosphate) was introduced into the maxillary sinus.

For intraindividual comparison, in each rabbit both sides were operated and two different augmentation methods were performed (e.g. left sinus stem cells, right sinus autogenous bone). In the control group 1 g of the carrier (bovine collagen) without stems cells was introduced. Subsequently the lateral window was replaced, covered with a biodegradable collagen membrane (Biogide™, Geistlich, Switzerland) and the wound was sutured using a resorbable suture (Vicryl™ 5/0, Ethicon, Germany). Postoperative antibiotics were administered using 25 mg enrofloxacin (Baytril™, Bayer HealthCare, Germany), postoperative analgesia with Carprofen (Rimadyl™, Pfizer Pharma GmbH, Germany) 5 mg/kg body weight s.c. once a day for 3 days.

Six weeks later the animals were euthanized using T61 (Hoechst GmbH, Munich, Germany) and biomechanical testing was performed. A 12 mm long and 2 mm wide immediate implant (TempImplant, TiAl6Nb7, Straumann AG, Basel, Switzerland) was chosen. The 6 mm extrasosseous part harbours a neck suitable as a lug for pull out force application. For implant insertion and measurement of insertion torque values the Osseocare™ device (Nobel Biocare AB, Sweden) was used which was conducted to the implant via the factory assembled insertion adapter. Non-contact resonance frequency analysis was performed with the Osstell™ mentor device (Osstell AB, Sweden) and simultaneously with a scanning laser Doppler vibrometer for reference reasons. With this device the total oscillation spectrum could be recorded and absolute resonance frequencies could be identified.

For transmission of the frequency modulated electromagnetic excitation by the Osstell™ mentor device upon the implant and to avoid any unessential mass input solely the neodymium magnet of the SmartPeg™ was laser welded onto the temporary implant before insertion. Laser spot welding was chosen in order to assure a steep coupling of magnet and implant and to guarantee persistence of magnetic properties. Before laser spot welding the spheric anchor at the extrasosseous end of the implant was reduced to its equator in order to create a socket platform and to adjust diameters of implant and magnet (both 2 mm). Laser spot welding was performed with the desktop Compact™ laser (Dentaurum, Germany), see figure 1.



Fig. 1. Neodymium magnet laser spot welded onto the temporary implant, over all length 20.8 mm. Arrow indicates welding suture.

Contact-dependent electromechanic stability assessment was accomplished with the Periotest™ device (Medizintechnik Gulden e.K., Germany). Axial extraction forces have been measured with the zwicki™ hydraulic testing machine (Zwick GmbH & Co. KG, Germany). Hence, an individual coupling element engaging at the neck of the implant and a special clamping socket for the isolated maxillae was manufactured. The diagrams of the axial extraction forces have been recorded by a 200 Newton load cell.

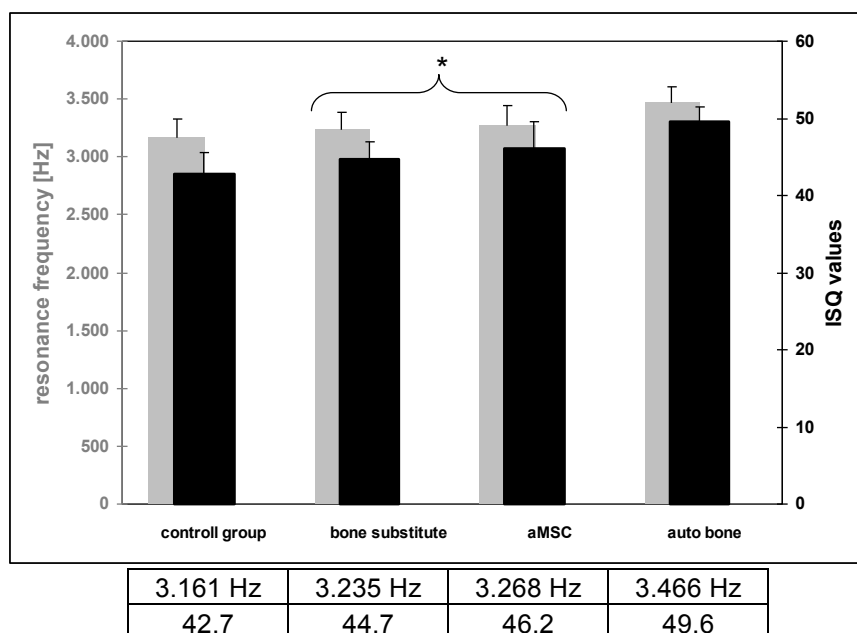
Group related statistical analysis was performed by ANOVA analysis (SPSS 17.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Differences between groups were considered to be statistically significant with a p-value < 0.05.

## RESULTS

All animals survived surgery with no premature mortalities, no signs of infection or other impairment. Evaluation of insertion torques revealed no statistically significant differences between the bone substitute group (15.7 Ncm ± 0.49), the aMSC group (15.9 Ncm ± 0.69, p=0.0741) and the control group (15.5 Ncm ± 0.53, p=0.0713). Implants inserted into maxillae augmented with autogenous bone showed significant higher insertion torque values (18.2 Ncm ± 0.67) compared to all other groups, p<0.01.

Non-contact resonance frequency evaluation with the Osstell™ device demonstrated significant differences between all augmented groups and the non operated control collective (p<0.01). Augmentation with artificial bone substitute showed an ISQ value of 44.7 ± 2.2 and the aMSC group revealed 46.2 ± 3.4 in comparison to 42.7 ± 2.9 (p=0.0094 and p=0.0042 respectively) of the control animals. The difference between the bone substitute group and the aMSC group at a p-value of 0.0692 was considered to be not statistically significant. Implants inserted into sinuses augmented with autogenous bone transplant demonstrated highest ISQ values at 49.6 ± 1.8 (p<0.01 to all other groups). All ISQ values are displayed black in figure 2.

Figure 2. ISQ values of implants measured with the Osstell™ device (black) and resonance frequencies [Hz] determined with scanning laser Doppler vibrometer (grey) indicated in means and SD. Asterisk indicates no statistical significance between bone substitute and aMSC group (p>0.05).





Simultaneous non-contact determination of resonance frequency with scanning laser Doppler vibrometer confirmed the Osstell™ results. All augmented groups demonstrated significant differences to non operated control animals ( $3.161 \text{ Hz} \pm 169 \text{ Hz}$ ) at a p value  $<0.01$ . The difference between the bone substitute group and the aMSC group was considered to be not statistically significant ( $3.235 \text{ Hz} \pm 148 \text{ Hz}$  vs.  $3.268 \text{ Hz} \pm 180 \text{ Hz}$ ;  $p=0.0735$ ). The autogenous bone transplant group showed highest resonance frequency at  $3.466 \text{ Hz} \pm 137 \text{ Hz}$ . All resonance frequencies are displayed grey in figure 2.

Contact dependend electromechanical stability assessment with the Periotest™ device revealed similar results. All augmented groups demonstrated significant differences to non operated control animals ( $p<0.01$ ). Augmentation with artificial bone substitute revealed a Periotest™ value of  $10.3 \pm 1.5$  and the aMSC group showed  $9.4 \pm 1.5$  in comparison to  $12.5 \pm 1.4$  of the control animals.

The difference between the bone substitute group and the aMSC group was considered to be not statistically significant ( $p=0.0695$ ). The autogenous bone transplant group showed lowest Periotest™ values at  $7.8 \pm 1.0$  indicating highest primary stability (at a p value of 0.0048 against the bone substitute group and 0.0074 against the aMSC group).

Determination of extraction forces demonstrated significant differences between all augmented groups and the control group ( $p<0.05$ ). The bone substitute group showed  $82.2 \text{ N} \pm 8.9 \text{ N}$  and the aMSC group  $79.7 \text{ N} \pm 8.0 \text{ N}$ , respectively ( $p=0.0051$  and  $p=0.0092$ ), whereas the control animals demonstrated  $71.2 \text{ N} \pm 6.2 \text{ N}$ . The difference between the bone substitute group and the aMSC group was considered to be not statistically significant ( $p=0.0784$ ). Implants inserted into sinuses augmented with an autogenous bone transplant demonstrated highest extraction forces  $99.7 \text{ N} \pm 15.4 \text{ N}$  ( $p<0.01$

to all other groups). All extraction force values are displayed in figure 3.

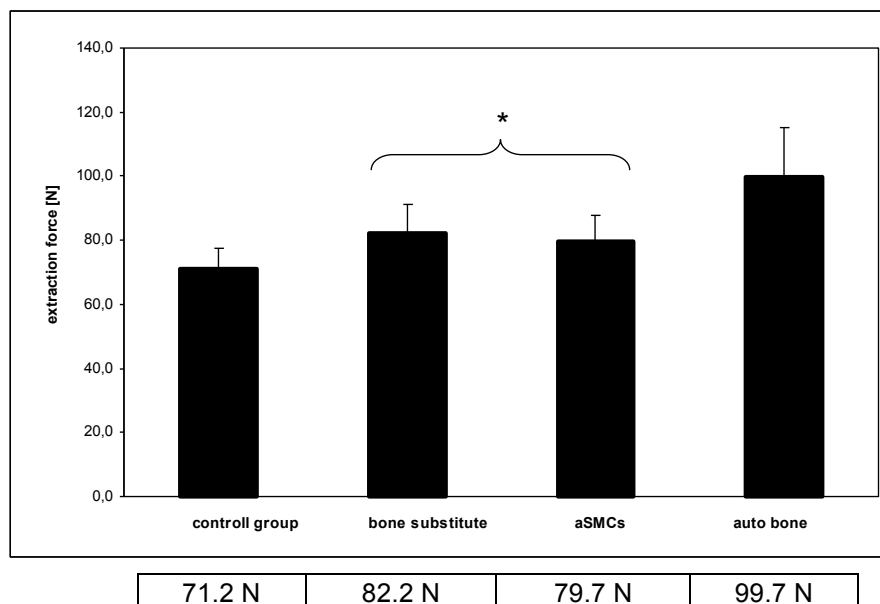


Figure 3. Extraction forces of implants inserted into upper jaws after sinus floor augmentation with different methods as indicated (means and SD). Asterisk indicates no statistical significance ( $p>0.05$ ).

## DISCUSSION

---

Bone regeneration by cell-based strategies depend upon an understanding of the biology and potential of adult stem cells as a method to regenerate bone. An autogenous aMSC transplant represents a biologic active osteoinductive augmentation method without the risk of rejection (Liu et al. 2006).

The presented animal model proved suitable for the extraction, isolation, expansion, differentiation and reimplantation of adult mesenchymal stem cells as well as the simulation of a sinus floor elevation and subsequent biomechanical testing of intraosseous jaw implants. Due to the bilateral symmetry of the rabbit maxillary sinuses (Lundgren et al. 1997) these areas may serve as reliable bilateral test-control models for evaluating the results of different treatment modalities with respect to bone healing.

Regarding the loco-biologic properties, the autogenous bone graft remains the golden standard for the reconstruction of osseous defects since it is a hybrid of a mineral scaffold containing living, osteogenic potent cells. None of the other treatment modalities can exhibit these characteristics. The synthetic bone substitute instead has no vital cell content providing only a osteoconductive mineralization matrix with the ability to withstand tissue collapse. On the other hand the stem cell transplant contains vital cells transforming to osteoblast precursors resembling an osteoinductive transplant capable of *in vivo* bone formation based on its own merit but has no mineral content (Soltan et al. 2006).

Referring to bone formation, the evaluation of mechanical properties in the bone substitute group must be cautiously interpreted since the biphasic calcium phosphate granules may impede the implant movement simply by encompassing the implant without remodelling into bone. Further elucidation regarding truly biologically originating stability or solely cushioning effect of non-integrated alloplastic material can only be further substantiated by histomorphometric analysis.

The combination of adult mesenchymal stem cells with a osteoconductive matrix has been manifold described (Tay et al. 1998, Arinze et al. 2005, Orie et al. 2005, Weinand et al. 2006). To what extent the vitalisation of a mineral scaffold using adult mesenchymal stem cells can reach the bone formation ability of autogenous bone needs to be further scrutinised.

In the present investigation five different measuring methods, Periotest™, Osstell™, scanning laser Doppler vibrometer in conjunction with previous insertion torque measurement and consecutive pull-out test were implemented to verify the degree of primary mechanical stability following the different augmentative measures.

Although the methods are based on different physical methods, interestingly a high degree of correlation was observed. These results per se highlight the methods reliability i.e. serve as a validation of each system, compared to the other two systems (see figure 2). The scanning laser Doppler vibrometer functions as a reference method allowing the assessment of a broad frequency spectrum, contrary to Osstell™ which is limited to a predefined frequency range, but is clearly limited to a laboratory setting. The Periotest™ apparatus on the other hand is contact dependent, measuring the contact time of the percussion rod with the object of interest. The highest standard deviation was observed with the Periotest™ method, proving least precise but must be accredited for not demanding additional tools, making the clinical use practical and simple in any clinical setting.

All three methods proved that the autogenous bone augmentation led to the highest degree of implant stability followed by the aMSC, synthetic bone substitutes and controls (see figure 2).

Furthermore, the question whether the primary stability correlates to necessary pull-out forces still needs to be answered. In the present study a contradiction to mechanical test was observed. Although the augmentation with aMSC led to slightly higher primary stability values than with synthetic bone substitute, in the pull-out investigation this could not be verified. The reason for this remains unclear and leaves room for speculations allowing the conclusion that a linear correlation between primary implant stability and axial pull-out forces may not exist in all cases, keeping in mind, that the results revealed no statistical significance at the 5% level (figure 2 and figure 3).

To summarise, experimental maxillary sinus floor augmentation with aMSC clearly enhanced primary stability of implants compared to unaugmented sinuses in rabbits.

This procedure lead to comparable primary mechanical properties as observed in the synthetic bone substitute, based on the evaluation of insertion torque measurement, implant stability quotient, resonance frequency analysis (scanning laser Doppler vibrometer), periotest™ values and extraction forces.

In comparison to sinus floor augmentation with autogenous bone graft, giving rise to the highest primary stability, aMSC did not achieve these values but it must be assumed that these are associated with a reduced harvesting morbidity, which, if transferred to the human situation, should promote patients acceptance of this surgical alternative.

## REFERENCES

---

- Arinze, T.L., Tran, T., Mcalary, J., Daculsi, G. (2005) A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* 26(17):3631-8.
- Choi, B.H., Kim, B.Y., Huh, J.Y., Lee, S.H., Zhu, S.J., Jung, J.H. & Li, J. (2006) Cyanoacrylate adhesive for closing sinus membrane perforations during sinus lifts. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 34: 505-509.
- Eppley, B.L., Pietrzak, W.S., Blanton, M.W. (2005) Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 16(6):981-9.
- Fuerst, G., Tangl, S., Gruber, R., Gahleitner, A., Sanroman, F., Watzek, G. (2004) Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: preliminary findings. *Clinical Oral Implants Research* 15(6):733-40.
- Garg, M., Dev, G., Misra, K., Tuli, S.M. (1997) Early biologic behavior of bone grafts. A fine needle aspiration cytology study. *Acta Cytologica* 41(3):765-70.
- Govindaraj, S., Costantino, P.D., Friedman, C.D. (1999) Current use of bone substitutes in maxillofacial surgery. *Facial Plastic Surgery* 15(1):73-81.
- Haas, R., Haidvogel, D., Donath, K., Watzek, G. (2002) Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep. Part I: histological findings. *Clinical Oral Implants Research* 13 (4): 396-404.
- Hahn, M., Vogel M., Delling, G. (1991) Undecalcified preparation of bone tissue: report of technical experience and development of new methods. *Virchows Archive. A Pathological Anatomy and Histopathology* 418(1):1-7.
- Hallman, M., Lundgren, S., Sennerby, L. (2001) Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 month and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clinical Implant Dentistry Related Research* 3(2):87-96.
- Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M. & Caplan, A.I. (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13: 81-88.
- Heino, T.J., Hentunen, T.A. (2008) Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy* 3(2):131-45. Review.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P.. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 64(2):295-312.
- Lioubavina-Hack, N., Lang, N.P. & Karring, T. (2006) Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 17(3): 244-250.
- Liu, H., Kemeny, D.M., Heng, B.C., Ouyang, H.W., Melendez, A.J., Cao, T.(2006) The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *Journal of Immunology* 1;176(5):2864-71.
- Lundgren, A.K., Sennerby, L., Lundgren, D. (1997) An experimental rabbit model for jaw-bone healing. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 26(6):461-4.

- McAllister, B.S., Haghghat, K., Gonshor, A. (2009) Histologic evaluation of a stem cell-based sinus-augmentation procedure. *Journal of Periodontology* 80(4):679-86
- Meredith, N. (1998) Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *International Journal of Prosthodontics* 11(5): 491-501.
- Nishibori, M., Betts, N.J., Salama, H., Listgarten, M.A. (1994) Short term healing of autogenous and allogeneic bone grafts after sinus augmentation: a report of 2 cases. *Journal of Periodontology* 65(10): 958-66.
- Orii, H., Sotome, S., Chen, J., Wang, J., Shinomiya, K. (2005) Beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion. *Journal of Medical and Dental Sciences* 52(1):51-7.
- Sauerbier, S., Stricker, A., Kuschnierz, J., Buehler, F., Oshima, T., Xavier, S.P., Schmelzeisen, R. and Gutwald, R. (2009) In vivo Comparison of Hard Tissue Regeneration with Human Mesenchymal Stem Cells processed with either the FICOLL- or the BMAC-Method. *Tissue Engineering. Part C, Methods*. 15: ahead of print
- Scharf, K.E., Lawson, W., Shapiro, J.M. & Gannon, P.J. (1995) Pressure measurements in the normal and occluded rabbit maxillary sinus. *Laryngoscope* 105: 570-574.
- Schimming, R. & Schmelzeisen, R. (2004) Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 62(6): 724-729.
- Smiler, D., Soltan, M., Lee, J.W. (2007). A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dentistry* 16(1):42-53.
- Soltan, M., Smiler, D.G., Gailani, F. (2005) A new "platinum" standard for bone grafting: autogenous stem cells. *Implant Dentistry* 14(4):322-5.
- Stevenson, S. (1999) Biology of bone grafts. *The Orthopedic Clinics of North America* 30(4):543-52.
- Tay, B.K., Le, A.X., Heilman, M., Lotz, J., Bradford, D.S. (1998) Use of a collagen-hydroxyapatite matrix in spinal fusion. A rabbit model. *Spine* 23(21):2276-81.
- Weinand, C., Pomerantseva, I., Neville, C.M., Gupta, R., Weinberg, E., Madisch, I., Shapiro, F., Abukawa, H., Troulis, M.J., Vacanti, J.P. (2006) Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone* 38(4):555-63.

# Evaluation der primären Implantatstabilität nach experimenteller Sinusbodenelevation mit autologen mesenchymalen Stammzellen

Die vorliegende Studie wurde durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg gefördert.

Dieser Dissertation liegt die Publikation Riecke, B., Heiland, M., Hothan, A., Morlock, M., Amling, M., Blake, F. (2011). Primary Implant stability after maxillary sinus augmentation with autogenous mesenchymal stem cells – biomechanical evaluation in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **22**:1242-6 zugrunde.

## 1. Einleitung

Die Rekonstruktion knöcherner Defekte stellt eine bestehende Herausforderung in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, besonders im Fall fortgeschrittener Kieferatrophie nach Zahnverlust dar. Diese führt speziell im distalen Oberkiefer aufgrund der zusätzlichen anatomischen Begrenzung der Kieferhöhle zu einer die dentale Rehabilitation erschwerenden Situation. Zur Verbesserung des Knochenangebotes beispielsweise vor dentaler Implantation wurden diverse Methoden zur Kieferhöhlenaugmentation entwickelt. Der "Goldstandard" ist bis heute die Implementierung eines autologen Knochentransplantats von andernorts. Um die damit assoziierte Entnahmemorbidität (Jäger et al. 2005) zu umgehen, wurden Knochenersatzmaterialien unterschiedlicher Herkunft – xenogen, allogen oder alloplastisch – entwickelt. Allen Knochenersatzmaterialien allerdings ist eigen, dass sie zellfreie, damit avitale, primär lediglich osteokonduktive und zur Knochenneubildung unfähige Gerüste darstellen, die aufgrund der Zellinvasionsabhängigkeit verlängerte Einheilungszeit zeigen (Garg et al. 1997). Die Entwicklung eines vitalen Knochenersatzes mit hoher osteogener Potenz bleibt Zielsetzung derzeitiger Forschung. Die Verwendung von Wachstumsfaktoren und knochenmorphogenetischer Proteine oder die Implementierung adulter mesenchymaler Stammzellen (MSC) eröffnete neue Wege bei der Verbesserung der Knochenneubildung und des Knochen-Implantat-Kontaktes (Gutwald et al. 2010, Sauerbier et al. 2010). MSCs können unter Beibehaltung ihrer Multipotenz aus Knochenmarkaspiraten isoliert, in vitro amplifiziert, in Präosteoblasten differenziert und unter Verwendung eines geeigneten Trägers in die Kieferhöhle transplantiert werden (Jaiswal et al. 1997, Fuerst et al. 2004). Darüber hinaus wurde bereits belegt, dass diese Präosteoblasten eine Knochenmatrix bilden (Jaiswal et al. 1997).

Da die Implantation avitaler, allo- oder xenogener, artifizierlicher Materialien das Risiko verlängerter oder unvollständiger Remodellierung, ausgedehnter Umgebungsresorption oder Desintegration birgt (Haas et al. 2002, Hallman et al 2001, Nishibori et al. 1994), wurde in dieser Studie der stabilitätssteigernde Effekt durch Transplantation von ausschließlich MSCs auf adäquater Trägersubstanz zur Vermeidung der Implementierung extrinsischen Materials untersucht.

Die Primärstabilität eines dentalen Implantates ist für dessen Prognose ein entscheidender Parameter. Sie wird in Zusammenhang mit Knochenangebot sowie Knochenqualität respektive Knochendichte gesetzt und daher häufig für die Evaluation von Dentalimplantaten herangezogen (Meredith, N., 1998). Aufgrund wachsenden gesellschaftlichen Fokuses auf mögliche fremdmaterialbedingte Infektionen könnte die Akzeptanz von Knochenersatzmaterialien sinken. Die Motivation der vorliegenden Studie war folglich, die stabilitätssteigernde Wirkung des neugebildeten Knochens nach Transplantation ausschließlich autologer MSCs zur Vermeidung der Verwendung extrinsischen Materials und zur Minimierung der Entnahmemorbidität im Falle autologen Knochens zu evaluieren.

## **2. Zielsetzung und Fragestellung der Studie**

Der Effekt einer experimentellen Sinusaugmentation mit aus MSCs differenzierten Präosteoblasten auf die Primärstabilität distomaxillär inserierter Implantate sollte biomechanisch evaluiert und in Zusammenhang mit konventionellen Augmentationsmethoden gesetzt werden. Der Vergleich sollte zu einer nicht-augmentierten, scheinoperierten Kontrollgruppe sowie zur Augmentation mittels autologer Knochentransplantation oder Knochenersatzmaterial gezogen werden. Die zugrundeliegende klinische Fragestellung war, ob durch die MSC-Transplantation vergleichbare Stabilitätssteigerung unter Verringerung der Entnahmemorbidität beziehungsweise Vermeidung von Fremdmaterial erzielt werden kann.

## **3. Material und Methoden**

Die Tiere wurden in vier verschiedenen Gruppen eingeteilt: Sinusaugmentation mit Knochenersatzmaterial, mit MCSs und mit autologem Knochen sowie scheinoperierte Kontrollen. In jeder Gruppe wurden acht Sinus beobachtet.

### **3.1. Stammzellgewinnung, Kultivierung und Transplantation; Gewinnung autologen Knochens**

Die Tierexperimente wurden durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg mit dem Datum des 2. Juni 2006, Nr. 49/06 genehmigt. Alle Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinärmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durchgeführt. Sämtliche Tierversuche wurden an adulten Weißen Neuseelandhasen (NZWR) durchgeführt. Die Tiere wiesen ein Gewicht von 3-4 kg auf.

Die Anästhesie der Tiere erfolgte durch intravenöse Applikation von 35 mg/kg KG Ketanest® (Ketaminhydrochlorid 50 mg/ml) und Rompun® 5 mg/kg KG (Xylazinhydrochlorid 2%) über die dorsale Ohrvene. Nach Erreichen einer ausreichend tiefen Anästhesie wurden unter Lokalanästhesie über eine 15 Gauge Gallini® Biopsienadel aus dem dorsalen Beckenkamm 2 ml Knochenmarkaspirat in 100 I.E. Heparinlösung gewonnen. Die Isolation der Knochenmarkzellen aus dem Aspirat erfolgte umgehend unter Laborbedingungen durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll, GS-6, Zentrifuge Beckmann GH 3-8 Rotor). Nach der Methode von Haynesworth wurden die so gewonnenen MSCs millionenfach amplifiziert (Haynesworth et al. 1992). Nach zwei Wochen wurden die Zellen zur Differenzierung in osteogene Präosteoblasten einem Differenzierungsmedium (Ascorbinsäure, Glycerolphosphat und Dexamethason) ausgesetzt. Die erfolgreiche Differenzierung wurde durch biochemische Analyse und Quantifizierung der Mineralisation verifiziert. Die biochemische Analyse umfasste Bestimmung der alkalischen Phosphatase (AP) und der Synthese von Osteocalcin. Zur Quantifizierung der Hydroxylapatit-Bildung durch differenzierende Präosteoblasten wurde im vorliegenden Modell die modifizierte Alizarinrot-S-Färbemethode verwendet.

Zur Vorbereitung auf die Implantation wurden die Zellen für drei Tage auf einer Kollagenmatrix (Lyostypt®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) inkubiert.

Zur Gewinnung autologen Knochens wurde nach beschriebener Generalanästhesie und Lokalanästhesie aus dem dorsalen Beckenkamm kortikospongioser Knochen osteotomiert.

### 3.2. Kieferhöhlenaugmentation beim Weißen Neuseeland Hasen

Die den Gruppen zugeordneten Hasen (autogene Stammzelltransplantation, autologe Beckenkammtransplantation, Knochenersatzmaterial) wurden erneut wie beschrieben anästhesiert und beidseitig sinusbodenaugmentiert. Dies erfolgte über einen medianen Zugang über dem Nasenrücken, beidseitige Freilegung und Fensterung der lateralen Kieferhöhlenwände auf etwa 1x1 cm. Anschließend wurde die Kieferhöhlenmembran ohne Beschädigung präpariert und exakt 1 Gramm des Kollagenträgers mit Stammzellen in jeweils eine Seite sowie 1 Gramm autologen Knochens oder Bone-Ceramic® (Straumann AG, Basel, Schweiz) in die kontralaterale Kieferhöhle eingebracht. BoneCeramic® ist ein vollsynthetisches, osteokonduktives Knochenersatzmaterial, das aus einem biphasischen Calciumphosphat (BCP), einer Kombination aus 60 Gewichtsprozent Hydroxylapatit (HA) und 40 Gewichtsprozent Beta-Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) besteht. Die laterale Kieferhöhlenwand wurde reponiert und mit einer biodegradierbaren Kollagenmembran (Bio-Gide®, Firma Geistlich Biomaterials Vertriebsgesellschaft mbH, Baden-Baden, Deutschland) überdeckt. Abschließend erfolgte der dichte Wundverschluss mit Klammernähten (Appose®, Single Use Skin Stapler, Covidien, Dublin, Irland).

Zwischen dem Zeitpunkt der Sinusaugmentation und der Implantation der Temporärimplantate zur mechanischen Testung der Primärstabilität lag ein Intervall von sechs Wochen.

### 3.3. Implantation

Nach Präparation der Maxilla wurde mit einer mobilen Mikromotor-Einheit (Micro-Dispenser Type 8000, Oraltronic Dental Implant Technology GmbH, Bremen) nach senkrechter Vorbohrung in Richtung Kieferhöhle mit einem 1,5 mm  $\varnothing$  Bohrer 5 mm anterior der Molaren jeweils ein Temporärimplantat (Straumann GmbH, Freiburg, Abbildung 1) pro Kieferseite gesetzt. Die Temporärimplantate wurden derart inseriert, dass das Implantatgewinde vollständig in Knochen eingebracht wurde, die Implantatschulter allerdings nicht auf der Knochenoberfläche zu liegen kam. Anschließend wurden die Implantate hinsichtlich ihrer Primärstabilität mittels fünf verschiedener Methoden mechanisch ausgewertet.

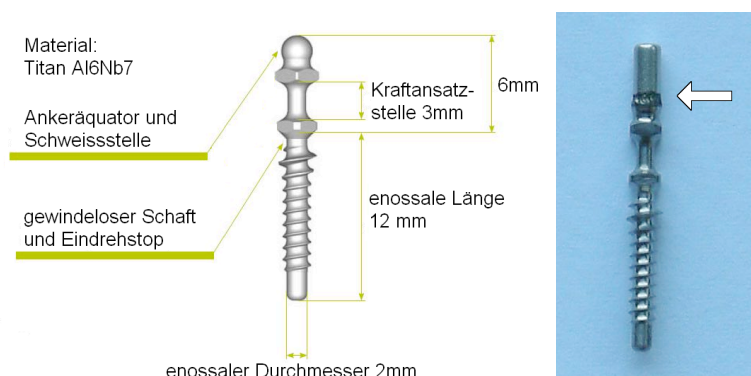


Abbildung 1:

a) Temporärimplantat im Schema

b) nach Laserschweißen des Neodymmagneten



### 3.4. biomechanische Evaluation

Bei der mechanischen Evaluation der Primärstabilität von enossalen Implantaten sollen Rückschlüsse auf das Knochenangebot sowie die Knochenqualität / -dichte gezogen werden. Die biomechanischen Eigenschaften der inserierten Implantate wurden in vier Qualitäten evaluiert:

1. Das Eindrehmoment der Temporärimplantate wurde maschinell mittels des Osseocare™-Gerätes (Nobel Biocare AB, Göteborg, Schweden, Abbildung 3) bei Implantatinsertion bestimmt.
2. Nach Implantation wurde mittels der am Zahnarztstuhl durchführbaren Osstell Mentor®-Methode die Resonanzfrequenz des Implantats analysiert. Um eine starre Ankopplung des zur Schwingungsübertragung notwendigen Neodymmagneten am Temporärimplantat zu gewährleisten, wurden diese nach Beschleifen der Ankerkugel des Implantates bis zum Äquator (Abbildung 1b) mittels eines Punktlaserschweißgerätes (Desktop Compact, Firma Dentaureum, Ispringen, Deutschland, www.dentaureum.com) an die Implantate geschweißt. So blieben die Magneteigenschaften erhalten und ein störender zusätzlicher Materialeintrag wurde eliminiert.
3. Zeitgleich zur Osstell®-Evaluation erfolgte die optische Resonanzfrequenzbestimmung mittels eines Einpunkt-Laservibrometers als Referenzmethode zur Ermittlung der absoluten Resonanzfrequenz des Temporärimplantats.
4. Mit der Periotest®-Methode als eine weitere am Zahnarztstuhl durchführbare Maßnahme wurde die kontaktabhängige Perkussionstestung durchgeführt.  
Die Messungen unter 2. und 3. erfolgte pro Temporärimplantat insgesamt dreimal. Anschließend wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.
5. Auszugstestung: im Anschluss wurde die axiale Auszugskraft der Temporärimplantate mittels eines Materialprüfgerätes aus der Reihe zwicki® der Firma Zwick (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm) über eine 200-Newton-Kraftmessdose bestimmt. Hierzu wurde eine Haltevorrichtung der Hasenoberkiefer sowie ein Ankopplungselement des Temporärimplantates an die Kraftmessdose des Messgerätes individuell angefertigt.

### 3. 5 Validierung der Meßmethoden in Sawbone

Zur Validierung der eingesetzten Messmethoden erfolgten Vorversuche entsprechend des oben beschriebenen Protokolls in standardisierten Spezialschäumen als Simulatoren für den nachfolgenden Tierversuch. Hierzu wurden Kunststoffquader der Dichte 15, 30, 40 pcf (pounds per cubic foot) des Präparates Sawbone® (Pacific research Laboratories Inc., Vashon, Washington, USA) verwendet. Zur vollständig rigiden Einbettung des Temporärimplantates wurde Technovit 4004® (Methacrylat der Firma Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) verwendet.

Tabelle 1: Synopse der Merkmale der Implantatstabilität in verschiedenen Materialien.

$M_E$  = Eindrehmoment,  $f_R$  = Resonanzfrequenz, EM = errechnetes Elastizitätsmodul,  $F \uparrow$  = Auszugskraft

Sawbone	15pcf	30pcf	40cf	Technovit
$M_E$ [Ncm]	<3	17,4 ± 0,8	31,2 ± 3,5	-
ISQ	42,7 ± 0,9	49,7 ± 1,3	52,1 ± 0,7	-
$f_R$ [kHz]	2.949	3.502	3.584	1.233.400
EM [MPa]	123	445	759	2.000
Periotest	14,4 ± 0,7	8,2 ± 0,7	6,1 ± 0,7	-6 ± 0,8
$F \uparrow$ [N]	113,6 ± 7,2	490 ± 12,7	660 ± 8,4	-

Bei Technovit konnte kein ISQ-Wert sowie keine Auszugskraft ermittelt werden, da diese außerhalb des Messbereiches der für die entsprechenden Messungen verwendeten Geräte lagen.

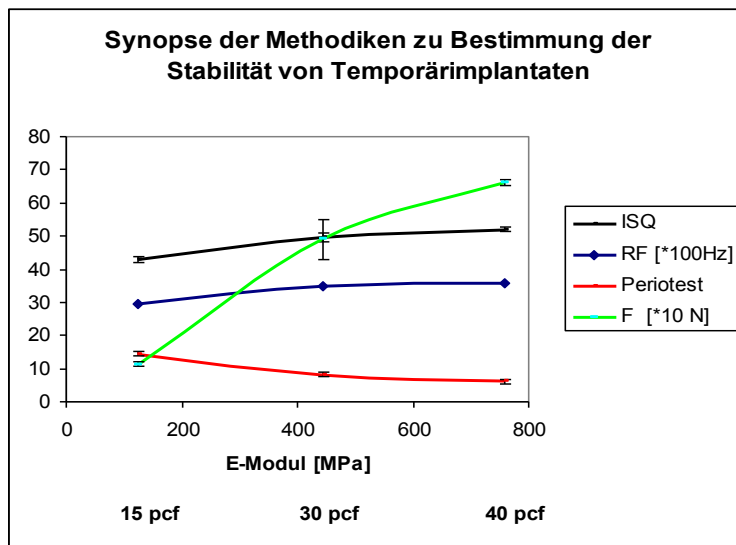


Abbildung 2. Grafische Darstellung der Implantatstabilitätswerte in Abhängigkeit der Dichte des Spezialschaums. Zur Vereinfachung der graphischen Darstellung wurden die Einheiten für die Resonanzfrequenz und der Auszugskraft verändert.

Beim Vergleich von Osstell® Mentor und dem Laservibrometer zeigte die lineare Regression einen signifikanten Zusammenhang zwischen ISQ-Wert und der mit dem Laservibrometer gemessenen Eigenfrequenz mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,895$ ,  $p < 0,001$ .

### 3.6 bildgebene Verfahren

Als bildgebende Verfahren wurden Kontaktradiografien des augmentierten bzw. implantierten Kiefersegments sowie exemplarisch Mikro-Computertomografien durchgeführt.

## 4.0. Ergebnisse

### 4.1. Eindrehmoment

Die Drehmomentmessungen bei Insertion der Temporärimplantate ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der Augmentation mit Knochenersatzmaterial ( $15,7 \text{ Ncm} \pm 0,49$ ) oder der mit autologen Stammzellen ( $15,9 \text{ cm} \pm 0,69$ ;  $p=0,0741$ ) und dem Kontrollkollektiv ( $15,5 \text{ Ncm} \pm 0,53$ ;  $p=0,0713$ ). Die Gruppe der autolog knochenaugmentierten Tiere zeigte allerdings einen signifikanten Unterschied im Eindrehmoment ( $18,2 \text{ Ncm} \pm 0,67$ ) zu allen anderen Gruppen,  $p < 0,01$ .

### 4.2. Resonanzfrequenzanalyse mit Osstell® Mentor

Die kontaktlose Primärstabilitätsuntersuchung mit dem Osstell-Gerät zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen von Knochenersatzmaterial ( $44,7 \pm 2,2$ ;  $p=0,0094$ ) oder Stammzellen ( $46,2 \pm 3,4$ ;  $p=0,0042$ ) und der Kontrollgruppe ( $42,7 \pm 2,9$ ) auf. Die Augmentation mit Knochenersatzmaterial und Stammzellen unterschieden sich untereinander nicht signifikant bei einem p-Wert von 0,0692. Die Transplantation autologen Knochens ergab den höchsten mit Osstell gemessenen Primärstabilitätswuchs ( $49,6 \pm 1,8$ ) und unterschied sich signifikant von allen anderen Gruppen ( $p < 0,01$ ), s. Abbildung 2.

### 4.3. optische Resonanzfrequenzbestimmung mit dem Laservibrometer

Die Resonanzfrequenzbestimmung mittels Laservibrometrie bestätigte die Osstell-Ergebnisse. Alle augmentierten Gruppen unterschieden sich signifikant von der scheinoperierten Kontrollgruppe (3.161 Hz  $\pm$  169 Hz) bei p-Werten  $<0.01$ . Die Differenz zwischen der Knochenersatzmaterial- (3.235 Hz  $\pm$  148 Hz) und Stammzellgruppe (3.268 Hz  $\pm$  180 Hz) war nicht signifikant bei  $p=0.0735$ . Das autologe Knochentransplantat zeigte mit 3.466 Hz  $\pm$  137 Hz den Höchstwert und unterschied sich signifikant von allen anderen Gruppen ( $p<0.01$ ), s. Abbildung 2.

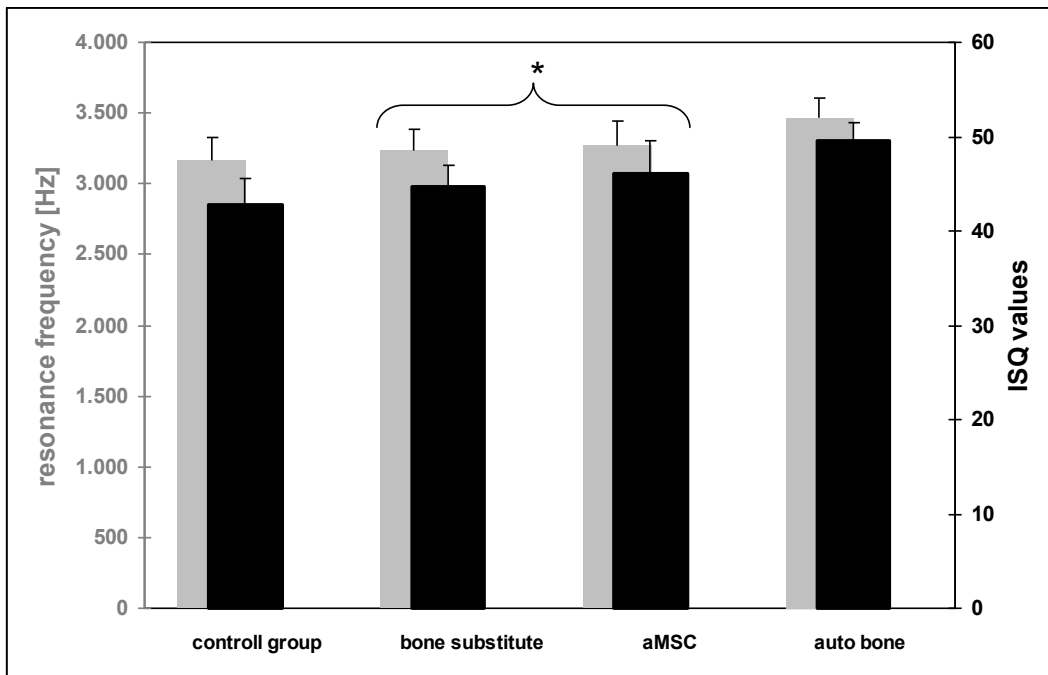


Abbildung 2

Ergebnisse der Resonanzfrequenzanalyse nach Gruppen: mittels Laservibrometer bestimmte Resonanzfrequenzen [Hz] in grau und mittels Osstell<sup>®</sup> ermittelte Implantat-Stabilitäts-Quotienten (ISQ) in schwarz. \* indiziert keine signifikante Differenz

### 4.4. Perkussionstestung mit Periotest<sup>®</sup>

Auch bei der Primärstabilitätsuntersuchung mit dem Periotest<sup>®</sup>-Gerät zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,083$ ) zwischen den Gruppen von Knochenersatzmaterial (10,3  $\pm$  1,5) und Stammzellen (9,4  $\pm$  1,5), die sich allerdings signifikant von der Kontrollgruppe (12,5  $\pm$  1,3) unterschieden ( $p<0.01$ ). Die Transplantation autologen Knochens resultierte in dem höchsten mit dem Periotest<sup>®</sup>-Gerät gemessenen Primärstabilitätszuwachs (7,8  $\pm$  1,0) und unterschied sich signifikant von allen anderen Gruppen ( $p<0,001$ ).

### 4.5. Auszugstestung

Die Messung der Auszugskräfte mit dem zwicki<sup>®</sup>-Gerät demonstrierte einen statistisch nicht signifikanten Unterschied (0,0784) zwischen den Gruppen von Knochenersatzmaterial (82,2 N  $\pm$  8,9 N) oder Stammzellen (79,7 N  $\pm$  8,0 N), wenngleich sie sich zu der Kontrollgruppe (71,2 N  $\pm$  6,2 N) signifikant unterschieden ( $p=0.0051$  bzw.  $p=0,0092$ ). Die Transplantation autologen Knochens führte

zu den höchsten Auszugskräften ( $99,7 \pm 15,4$ ) und unterschied sich signifikant von den anderen beiden Augmentationsgruppen sowie von der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ), s. Abbildung 3.

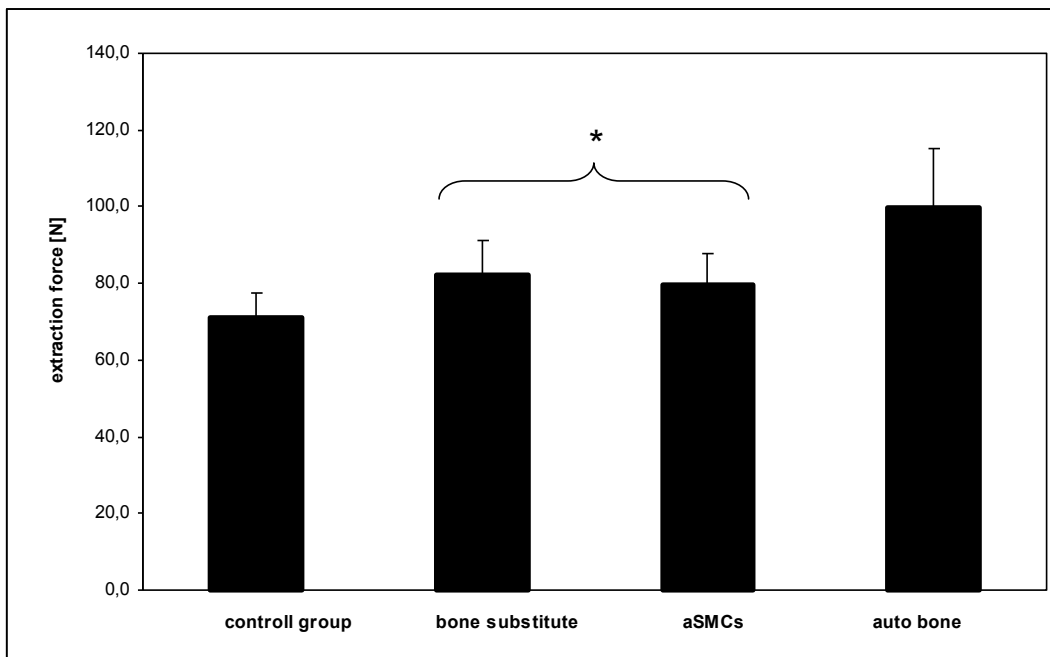


Abbildung 3.

Grafische Darstellung der Analyse der Implantatauszugskräfte nach Gruppen.

\* indiziert keine signifikante Differenz.

#### 4.6 Bildgebende Verfahren

Die Kontaktradiografien stellten sich als geeignete Methode dar, den nach Sinusaugmentation neugebildeten Knochen makroskopisch zu begutachten. Abbildung 3a zeigt einen repräsentativen Schnitt durch die augmentierte Kieferregion sechs Wochen nach dem Eingriff. Der rechte Sinus wurde mit MSC, der linke mit autologem Knochen augmentiert. Abbildung 3b zeigt eine repräsentative Schnittebene einer Mikrocomputertomografie. Hier wurde der linke Sinus mit MSC-Transplantat augmentiert, der rechte wurde als Kontrollsinus scheinoperiert.



Abbildung 3a (links). Beispielhafte Kontaktradiografie eines Oberkiefersegments.

Abbildung 3b (rechts). Repräsentative Schnittebene einer Mikrocomputertomografie.

## 5. Diskussion

Die Bedeutung von Osteoinduktion gewann kürzlich durch neue Einblicke in die Biologie der Knochenneubildung zunehmende Bedeutung, da zellbasierte Strategien die einzigartige Rolle der MSCs innerhalb dieses Prozesses belegten. Die Fähigkeit der MSCs, sich in Präosteoblasten zu differenzieren und dadurch direkt die Osteogenese zu unterhalten war vorbekannt (Jaiswal et al. 1997). Mit der Identifikation von MSCs als perivaskuläre Zellen bekamen die Details der Knochenneubildung eine neuartige Bedeutung (Crisan et al., 2008), da MSC zusammen mit Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle hierin zu spielen scheinen. MSCs sezernieren eine Vielzahl bioaktiver Faktoren mit trophischer Aktivität und können hierüber die Mitose gewebstintrinsischer, autochthoner Vorläuferzellen stimulieren sowie hypoxiebedingte Apoptose hemmen (Caplan A. I. (2006). Darüber hinaus scheint ihnen eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung zuzukommen. Angiogenese ist von zentraler Bedeutung für Knochenneubildung, da sie bei Regeneration und Reparatur sowohl Triebkraft- als auch Leitfunktion übernimmt (Caplan, Correa, 2011). In Kultur interagieren MSCs funktionell mit neu gebildeten Gefäßstrukturen indem sie die Entwicklung und Stabilisierung röhrenartiger Strukturen unterstützen und ihre Anzahl sowie Komplexität erhöhen (Sorelli et al. 2009). Dies steigert die Bedeutung stammzellbasierter Therapien als Methoden gezielter Applikation eines komplexen Konvoluts multipler bioaktiver Faktoren. Die lokalbiologisch hochaktiven MSCs sind darüber hinaus in der Lage, sich selbst in spezifische Zellen des ortständigen Stützgewebes zu differenzieren und die lokalen Bedingungen zu verbessern. Kombiniert mit bovinem Knochenersatzmaterial sind MSCs nach Sinusaugmentation in der Lage, die Neubildung zur Implantation suffizienten Knochens innerhalb eines zum autologen Knochen-Transplantat vergleichbaren Zeitraumes zu induzieren (Rickert et al., 2011).

Mit der Durchführung der autologen Transplantation in vitro amplifizierter, in Präosteoblasten differenzierter und nachgewiesenermaßen osteogener adulter mesenchymaler Stammzellen (MSCs) zur chirurgischen Sinusaugmentation wurde ein Weg zur effektiven Verbesserung der biomechanischen Primäreigenschaften distomaxillär inserierter Temporärimplantate aufgezeigt.

Bezüglich der lokalbiologischen Eigenschaften bleibt das autologe Knochen-Transplantat der "Goldstandard" zur Rekonstruktion knöcherner Defekte. Es ist ein Hybrid aus mineralisiertem Gerüst und darin beinhalteter vitaler osteogener Zellen. Keine andere Therapiemodalität kann diese Eigenschaften aufweisen.

Das Knochenersatzmaterial besitzt keine vitalen Zellen und stellt somit lediglich eine osteokonduktive Matrix zur Verhinderung des Gewebekollapses dar. Die nicht signifikant höheren Auszugskräfte dieser Gruppe im Vergleich zur MSC-Gruppe können durch die bekanntermaßen nicht zu Resorption oder Umbauprozessen führenden Eigenschaften des Anteils an Hydroxylapatit erklärt werden. Diese harte Matrix wird nicht remodelliert sondern lediglich von neu gebildetem Knochen eingemauert.

Im Gegensatz hierzu ist das MSC-Transplantat zur autogenen Knochenneubildung fähig. Der vermeintliche Nachteil des initial niedrigen Mineralisierungsgrades konnte noch innerhalb des Beobachtungszeitraumes vollständig ausgeglichen werden, wie nachfolgende histomorphometrische Untersuchungen belegten (Riecke et al. zur Publikation eingereicht).

Das isolierte MSC-Transplantat führt zu dem Knochenersatzmaterial vergleichbarem stabilitätssteigernden Effekt, vermeidet allerdings das Einbringen körperfremden Materials. Im

Vergleich zum autologen Knochentransplantat bleibt der Stabilitätszugewinn zurück, verringert jedoch die Entnahmemorbidity.

## 6. Literaturverzeichnis

Caplan, A. I. Dennis, J. E. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* **98**(5):1076-84.

Caplan, A. I., Correa, D. (2011) PDGF in bone formation and regeneration: New insights into a novel mechanism involving MSCs. *Journal of Orthopaedic Research* **29**(12):1795-803.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norette C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhning, H. J., Giacobino, J. P., Lazzari, L., Huard, J., Péault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**(3):301-13.

Garg, M., Dev, G., Misra, K., Tuli, S.M. (1997) Early biologic behavior of bone grafts. A fine needle aspiration cytology study. *Acta Cytologica* **41**(3):765-70.

Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M. & Caplan, A.I. (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**: 81-88.

Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P.. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* **64**(2):295-312.

Jäger, M., Westhoff, B., Wild, A., Krauspe, R. (2005) Knochenspanentnahme am Becken. *Orthopäde* **34**(10):976-82, 984, 986-90, 992-4.

Meredith, N., Alleyne, D., Cawley, P. (1996) Quantitative determination of the stability of the implant-tissue interface using resonance frequency analysis. *Clin Oral Implants Research* **7**(3):261-7.

Meredith, N. (1998) Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *International Journal of Prosthodontics* **11**(5):491-501.

Rickert, D., Sauerbier, S., Nagursky, H., Menne, D., Vissink, A., Raghoobar, G. M. (2011) Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **22**(3):251-8.

Riecke, B., Blake, F. A. S., Assaf, A., Marshall, R. P., Amling, M., Heiland, M. Histomorphometric analysis of bone after experimental sinus floor augmentation with autogenous mesenchymal stem cells in rabbits (zur Publikation bei *Clinical Oral Implants Research* eingereicht).

Sauerbier, S., Stubbe, K., Maglione, M., Haberstroh, J., Kuschnierz, J., Oshima, T., Xavier, S.P., Brunberg, L., Schmelzeisen, R., Gutwald, R. (2010) Mesenchymal stem cells and bovine bone mineral in sinus lift procedures – an experimental study in sheep. *Tissue Engineering Part C, Methods*. **16**(5):1033-9.

Sorelli, J. M., Baber, M. A., Caplan A. I. (2009) Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Engineering Part A* **15**(7):1751-61.

## **7. Danksagung**

In erster Linie gilt mein Dank meinem Chef Professor Dr. Dr. Max Heiland, Professor Dr. Michael Amling und Privatdozent Dr. Dr. Felix Blake für die konzeptionelle Idee des Projektes und die Hilfe bei der Akquisition der Mittel.

Nicht minder gilt mein Dank Herrn Privatdozent Dr. Dr. Marco Bleßmann für die exzellente Betreuung während des Projekts.

Der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, die mit der Finanzierung des Projekts, sowie Herrn Professor Dr. Michael Morlock als Leiter des Arbeitsbereichs Biomechanik der Technischen Universität Hamburg-Harburg, der mit der Organisation und der freundlichen Bereitstellung seiner Ressourcen die vorliegende Studie ermöglichten, möchte ich in meinem Dank nicht nachstehen.

Bei Diplomingenieur Kay Sellenschloh bedanke ich mich außerordentlich für die Hilfe bei der Planung des Versuchsaufbaus sowie bei Diplomingenieur Arne Hothan für die Hilfe bei der Durchführung der Laservibrometermessungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Anne Uhlenbrock und Dr. Nick Bishop für die nimmermüde Diskussionsbereitschaft und die Inspiration bei der Überwindung der Hürden zur praktischen Umsetzung des Projektes.

## **8. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Dr. med. Björn Riecke