

Nutzung des Homing von humanen, aus der Mundhöhle stammenden Neural Crest-derived Stem Cells (hoNCSC-Homing) für therapeutische Verfahren in der regenerativen Implantologie - eine kritische Analyse

AUTOREN

Prof. Dr. T. Fritsch, Salzburger NAM Forschungsinstitut, Österreich, DGParo Klinisches Kompetenzzentrum Bayerisch Gmain, Deutschland, Prof. (StGMU) Dr. M. A. Vukovic, DGParo Klinisches Kompetenzzentrum Hasslinghausen, Deutschland, Univ.-Prof. Dr. Dr. Wolf-D. Grimm, NAM Forschungsinstitut Salzburg, DGParo Klinisches Kompetenzzentrum Hasslinghausen, Deutschland, DGParo Klinisches Kompetenzzentrum Bayerisch Gmain, Deutschland

ABSTRACT

Residente Stammzellpools in vielen Geweben/Organen sind nicht nur für den Erhalt des Gewebes während des physiologischen Gewebeerhalts, sondern auch für den Prozess der Knochenheilung nach regenerativen Eingriffen. In jüngster Zeit wurden Fortschritte bei der Mobilisierung von Stammzellen und der gezielten Zuführung von patienteneigenen Stammzellen an Sites erzielt, die für die Behandlung eines breiten Spektrums von Erkrankungen in der regenerativen Zahnheilkunde von Interesse sind.

Eine wachsende Zahl von Arbeiten bestätigt, dass Stammzellen aus dem Gaumen mobilisiert und in bestimmte Mundhöhlen-Region transplantiert werden können. Darüber hinaus hat die Transplantation von zellfreundlichen Biomaterialien, die oral-verträgliche Biomoleküle enthalten, zur Regeneration von verlorenem/beschädigtem Alveolar-Gewebe geführt, ohne dass ex vivo manipulierte Zellträgermaterialien eingebracht werden müssen. In jüngster Zeit hat das Homing von Stamm-Zellen zu bemerkenswerten biologischen Entdeckungen im Labor und zu großen Heilungserfolgen in präklinischen Szenarien geführt. Hier wird anhand der Ergebnisse einer initialen klinisch- und histologisch kontrollierten Studie die biologische Evidenz überprüft, die der ex vivo Neural-crest-derived Stamm-Zellmobilisierung (hoNCSCs) und dem Homing zugrunde liegt, mit dem Ziel, endogene regenerativ-reparative Stammzellen für therapeutische Anwendungen in der dentalen regenerativen Implantologie zu nutzen. In Anbetracht der vielversprechenden Möglichkeiten, aber auch der Hindernisse dieses Ansatzes, diskutieren wir die Ergebnisse, wie aus der Mundhöhle stammende

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

Neuralleisten-Stammzellen des *in vivo*-Milieus modifiziert werden können, um den nativen Regenerationsprozess zu fördern und das zukünftige Tissue-Engineering-Design zu nutzen.

Einleitung

Die stammzellbasierte Therapie ist einer der am besten dokumentierten Ansätze in der regenerativen Medizin, einschließlich der regenerativen Parodontologie und Implantologie (Grimm et al. 2014), und verspricht Heilung für eine Vielzahl von Krankheiten und Störungen. Die *ex-vivo*-Expansion von Stammzellen und ihre *in-vivo*-Transplantation sind jedoch durch die begrenzte Verfügbarkeit von Stammzellquellen, die überhöhten Kosten für die Vermarktung und die zu erwartenden Schwierigkeiten bei der klinischen Umsetzung und behördlichen Zulassung eingeschränkt. Eine Alternative zu *ex vivo* übertragenen Stammzellen sind Zellpopulationen, die bereits im Körper des Patienten vorhanden sind, einschließlich Stamm-/Progenitorzellen, die aktiv an den Implantations-Sites inseriert werden können. Diese Technik, die als endogenes Stammzell-*Homing* bekannt ist, hat das Potenzial, neue therapeutische Optionen für die *in-situ*-Geweberegeneration zu entwickeln. Solche Optionen wären weniger kostspielig und komplex als Ansätze, die eine umfangreiche *ex-vivo*-Zellmanipulation erfordern und bei denen künstliche Trägermaterialien (*Scaffolds*) für den Zelltransport verwendet werden. Geweberegenerationsmethoden, die sich auf die Ansiedlung endogener Stamm-/Progenitorzellen, lokale Gewebereaktionen und funktionelle Stimulation stützen, bieten somit neue Einblicke in das *in-vivo*-Gewebe-*Engineering* und sind vielversprechend für die Zukunft der translationalen Medizin.

Das *Homing* von Zellen wird als ein Prozess der Insertion hämatopoetischer Stammzellen aus Blutgefäßen durch Transendothelisierung und anschließende Migration betrachtet. Hier definieren wir *Zellhoming* im weitesten Sinne als aktive Rekrutierung endogener Zellen, einschließlich Stamm-/Progenitorzellen, in ein anatomisches Kompartiment und berichten über unsere kürzlich veröffentlichten Ergebnisse aus der Studie "*Effect of Human Neural Crest-Derived Stem Cell Homing (hNCSCs homing) on the Mineralization of Newly Formed Alveolar Bone using an Allogene Bone Substitute*" (Grimm et al. 2019). Das *Homing* von Stamm-Zellen bietet einige Vorteile gegenüber der Stamm-Zelltransplantation für die vertikale Knochenaugmentation in Kombination mit der Sofortimplantation von Implantaten:

- Das induzierte *Homing* von humanen, aus der Mundhöhle stammenden Neuralleisten-Stammzellen (hoNCSCs) aus dem Gaumen der Patienten überwindet einige der wichtigsten wissenschaftlichen, technischen, kommerziellen und regulatorischen Probleme, die mit der Stammzelltransplantation verbunden sind, wie z. B. potenzielle Kontamination, überhöhte Kosten, Immunabstoßung, Übertragung von Krankheitserregern und mangelnde Ausbildung der derzeitigen Kliniker im Umgang mit Zellen.
- Schwierigkeiten zur Erreichung von behördlicher Genehmigung für innovative Zellprodukte,
- Einfache klinische Verabreichung von steril-verpackten und gelagerten molekularen Unterstützungsprodukten,
- Maximierung der körpereigenen Regenerationsfähigkeit.

Zweck dieser Veröffentlichung ist die Auswertung der Ergebnisse unserer kürzlich veröffentlichten initialen klinisch- und histopathologisch kontrollierten Studie zum Potenzial vom adultem Palatinum als neuartiger Stammzellquelle von hoNCSCs in Kombination mit der Transplantation

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

von Spongiosa-Knochenblöcken (Osteograft®, Bingen, Deutschland) zur einzeitigen Knochenaugmentation und Sofortimplantation. Ziel dieser Patientenbeobachtungsstudie war es, den Effekt eines *Stammzell-Homing* (hoNCSCs) auf die neu gebildete Knochenmineralisierung unter Verwendung von stammzellgestütztem humanem allogenen Knochen als Trägermaterial bei der vertikalen Augmentation mit Sofortimplantation, histologisch zu evaluieren (Grimm et al. 2019).

Obwohl wir uns hier auf die Beschreibung von Fortschritten auf dem Gebiet des *Homing* residenter regenerativ-reparativer Zellen für therapeutische Anwendungen in der regenerativen Implantologie konzentrieren, sollten das Konzept und die Designüberlegungen, die hier diskutiert werden, allgemein auf viele, wenn nicht alle regenerativen Paradigmen der Medizin anwendbar sein.

Mobilisierung und Homing von aus der Mundhöhle stammenden Neuralleisten-Stammzellen (hoNCSCs)

In der Zellwissenschaft und -biologie beschreibt der Begriff "*Homing*" die Fähigkeit von Stammzellen, ihre ursprüngliche "Nische", hier die Insertion des dentalen Implantates, zu finden und dorthin zurückzukehren. Dieser Begriff wird seit Kurzem verwendet, um die Fähigkeit einer Stamm-Zelle zu betonen, auf extrazelluläre Signale (z. B. Migrationsstimuli und Differenzierungshinweise) zu reagieren, um zielgerichtetes *Trafficking* und Migration zu ermöglichen (Yin et al. 2017), siehe Abb. 1.

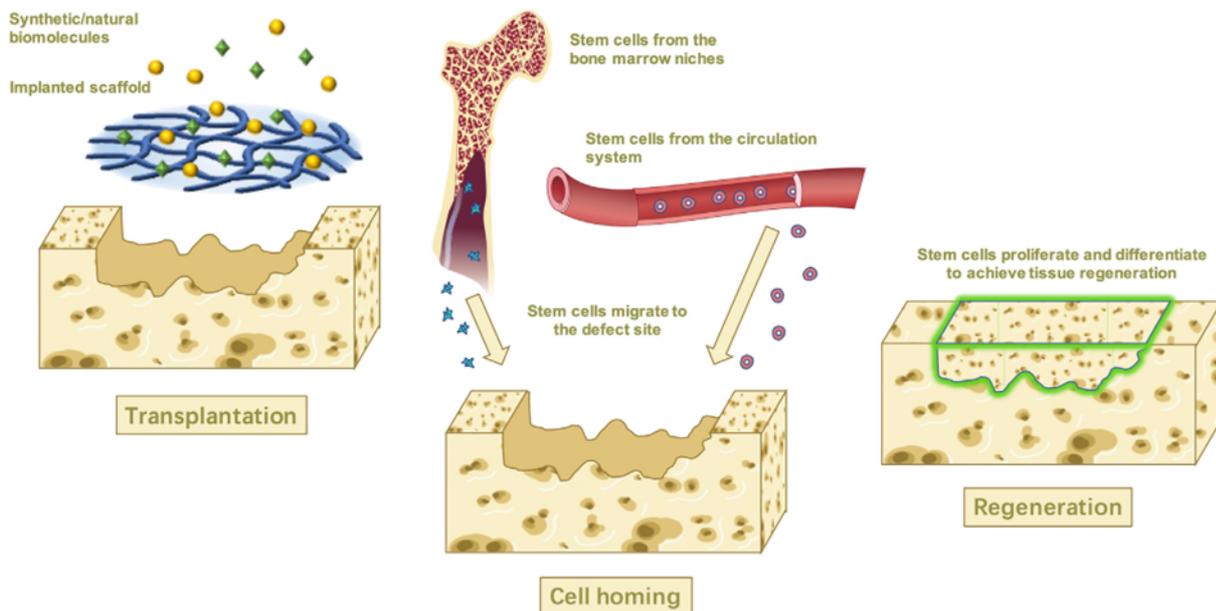


Abb. 1: Beim *in-situ-Tissue-Engineering* werden biologische Moleküle und Gerüste verwendet, um die Stammzellen aus den Nischen zu rekrutieren, ihre Proliferation und Differenzierung zu fördern und schließlich die Geweberegeneration zu erreichen (Meng et al. 2022).

oNCSCs, die oft als vierte Keimschicht bezeichnet werden, umfassen eine migrierende Stamm- und Vorläuferzellpopulation und sind ein Synonym für die Evolution und Entwicklung

von Wirbeltieren (Le Douarin und Dupin, 2018). Diese Stamm-Zellen folgen definierten *Pathways*, um an verschiedene *Sites* des Kopfskelettes zu wandern, wo sie eine Vielzahl von Zelltypen und Geweben bilden (Achilleos und Trainor, 2014). Die Zellen der Neuralleiste, die das Kopfskelett der Wirbeltiere bilden, wandern und interagieren mit den umgebenden Geweben, um den Schädel zu formen. Die Neuralleiste wurde erstmals von dem Schweizer Anatomen und Kardiologen Wilhelm His als "Zwischenstrang" beschrieben. Er beschrieb die Neuralleiste als eine vorübergehende embryonale Struktur, die während der Embryonalentwicklung der Vögel zwischen dem Neuralrohr und der Epidermis entsteht. Nach der Neurulation wandern embryonale Neuralleistenzellen (NCCs) aus ihrer Nische heraus und bringen neben mesenchymalen Zellen (Schädelknochen, Knorpel- und Fettzellen) auch ektodermale Zelltypen hervor (z. B. Schwann'sche Zellen, periphere Neuronen, Melanozyten und Keratinozyten). Aufgrund dieses intrinsischen Potenzials, Zellen aus zwei Keimschichten (Ektoderm und Mesoderm) hervorzubringen, besitzen NCCs ein außerordentlich hohes Entwicklungspotenzial, das nur von totipotenten Zellen der Zygote und pluripotenten embryonalen Stammzellen übertroffen wird (Widera et al. 2009). Es gibt oNCSCs, die lebenslang in undifferenziertem Zustand in den Geweben erhalten bleiben (Abb. 2).

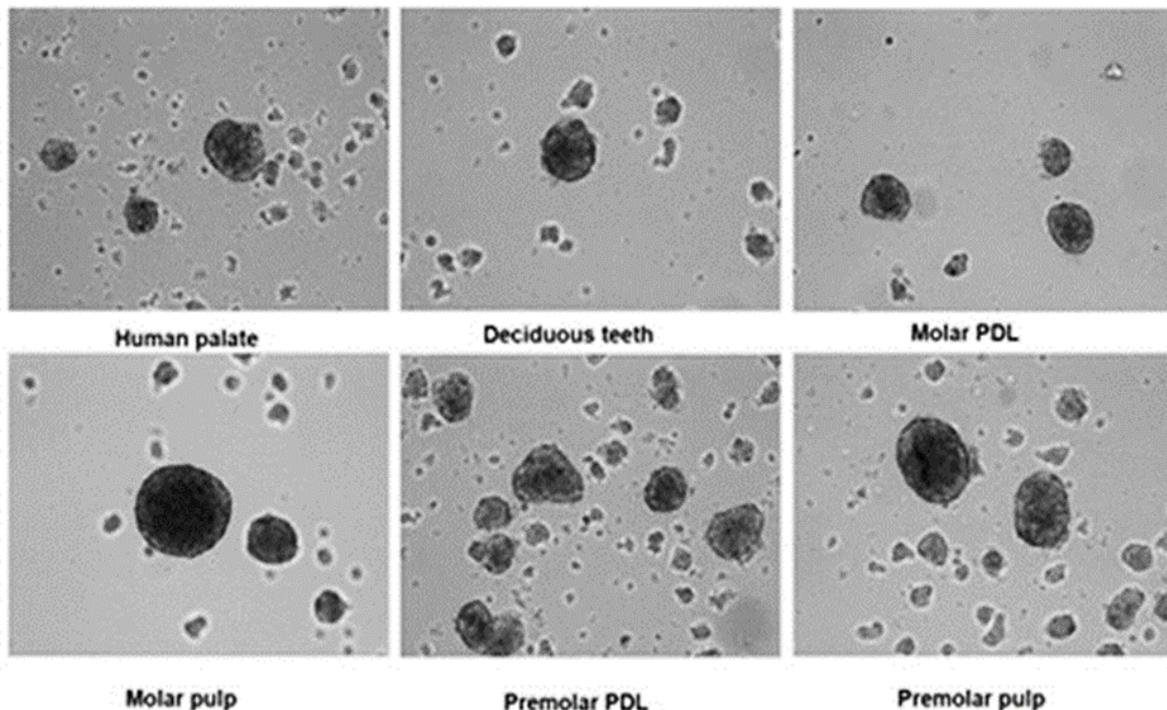


Abb. 2: oNCSCs aus der Neuralleiste können aus verschiedenen Geweben der Mundhöhle isoliert werden. Mikroskopische Aufnahmen zeigen, dass oNCSCs typische neurosphärenartige Strukturen bilden, wenn sie in einem chemisch definierten Kulturmedium kultiviert werden.

Daher schlagen wir den Begriff oral-derived Neural Crest-derived Stem Cells (oNCSCs) als neue Kategorie vor, die die meisten bisher beschriebenen adulten dentalen Stammzellen umfassen würde (siehe Übersicht, Grimm et al. 2011).

Ursprünglich ging man davon aus, dass die Mechanismen, die den regenerativen Fähigkeiten der aus der Mundhöhle stammenden Neuralleisten-Stammzellen zugrunde liegen, auf ihrer Fähigkeit beruhen, geschädigtes Gewebe zu erkennen und sich in spezifische Zelltypen zu differenzieren, die defekte Zellen ersetzen würden. Obwohl die Transplantation von Stammzellen zur Gewebereparatur weit verbreitet ist, gewinnt die therapeutische Modulation der Stammzellnische zur Erleichterung der Regeneration durch patienteneigene Zellen zunehmend an Aufmerksamkeit (Übersicht in Lane et al. 2014). Jüngste Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass nicht die Zellen selbst, sondern von oNCSCs produzierte Moleküle (Sekretom), insbesondere solche, die in extrazellulären Vesikeln (EVs) verpackt sind, für die Gewebereparatur verantwortlich sind (Haque et al. 2021). Kürzlich wurden die regenerativen Ergebnisse zellbasierter Therapien mit parakrinen Faktoren und extrazellulären Vesikeln [EVs] in Verbindung gebracht, die von den transplantierten Zellen selbst freigesetzt werden (Widera und Grimm, 2019).

Osteogene Eigenschaften von aus der Mundhöhle stammenden Neuralleisten-Stammzellen (oNCSCs)

Obwohl die Mechanismen, die solche endogenen Regenerationsprozesse steuern, weitgehend unbekannt sind, hat sich die Entwicklung zellfreier Strategien auf der Grundlage biomimetischer Methoden und der Zufuhr von Wachstumsfaktoren als praktikables Konzept für die endogene Regeneration etabliert (Zhao et al. 2015). Ein profundes Wissen über die biologischen Unterschiede und gemeinsamen Merkmale der oNCSC-Populationen ist für die Entwicklung und künftige Anwendung regenerativer Knochentherapien von entscheidender Bedeutung (Widera et al., 1997). Diese einzigartige Plastizität begünstigt die Verwendung dieser Stammzellen zum Wiederaufbau von verlorenem Knochengewebe (Abb. 3). Wir und andere Gruppen berichteten über eine ähnliche Expression von stammzellassoziierten Zelloberflächenantigenen in allen oNCSC-Populationen (Zeuner et al., 2017).

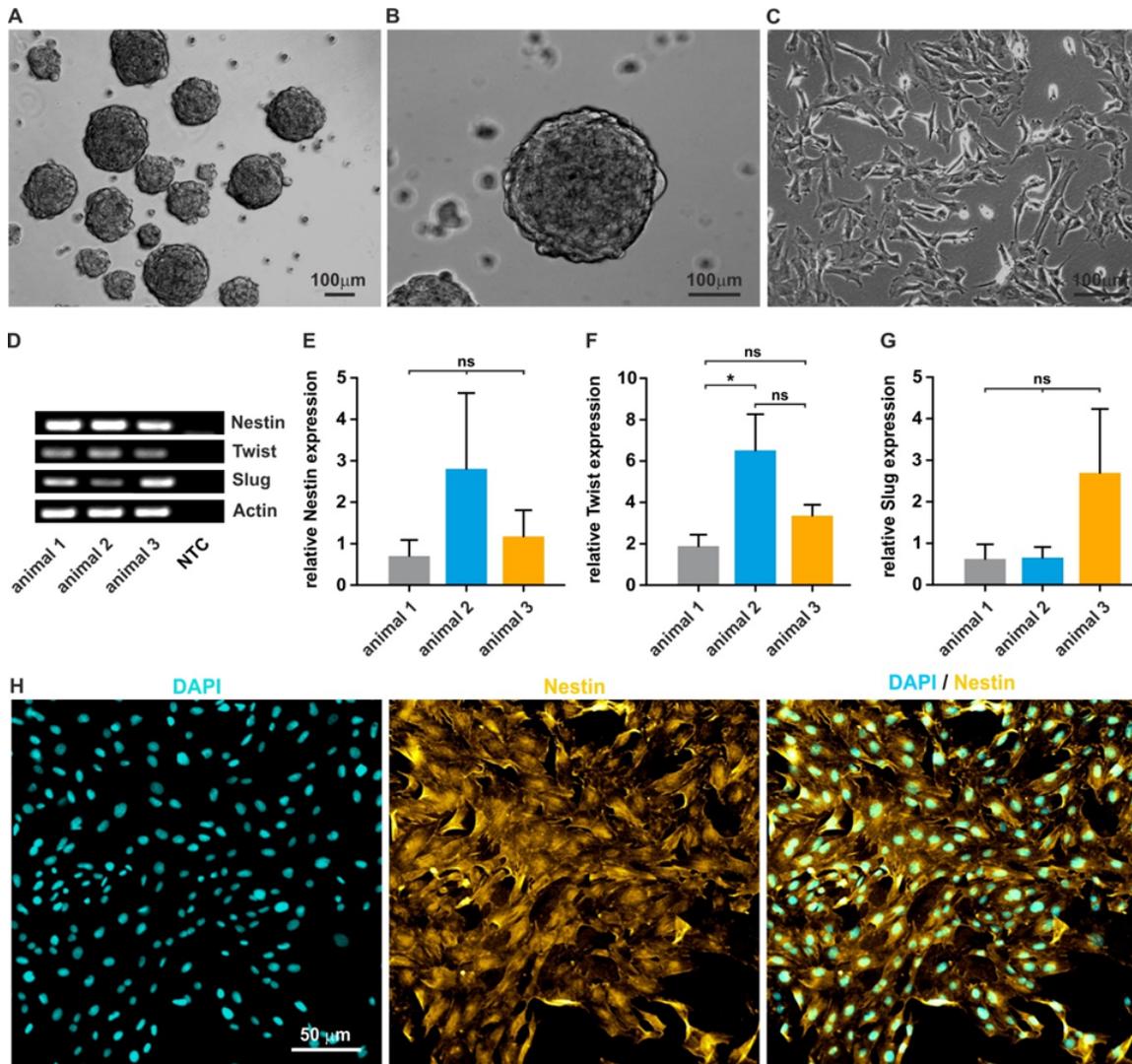


Abb. 3: Aus dem adulten Schafsgaumen isolierte oNCSCs zeigen *in vitro* Stammzeleigenschaften (A, B) Zellen aus dem subpalatalen Gewebe des Schafs bilden unter serumfreien Kulturbedingungen Neurosphären. (C) Dissoziierte oNCSCs können *in vitro* als adhärenente Kultur expandiert werden. (D) oNCSCs, die aus 3 verschiedenen Tieren isoliert wurden, exprimieren die Neuronenstamm-Marker Nestin, Twist und Slug, was durch PCR-Analyse nachgewiesen wurde. NTC: keine Template-Kontrolle. Actin: Housekeeping-Gen. (E) Die relative Expression der Marker Nestin, (F) Twist und (G) Slug war in den Zellisolationen der verschiedenen Tiere nicht signifikant unterschiedlich. (H) Die Immunzytochemie zeigte das Vorhandensein von Nestin (gelb) in allen Zellen einer repräsentativen Kultur. Die nukleäre Gegenfärbung wurde mit DAPI (cyan) durchgeführt.

In unseren Händen exprimieren oNCSCs höhere Konzentrationen von Cytokeratin 18 und 19 (CK-18 und CK-19). Darüber hinaus scheinen sie ein Odontoblasten-Differenzierungspotenzial zu besitzen, aber nicht in der Lage zu sein, funktionelle Neuronen oder Muskelzellen zu erzeugen. Außerdem zeigten oNCSCs eine schnellere Proliferationsrate und eine höhere Telomeraseaktivität. Wir konnten auch zeigen, dass oNCSCs eine höhere Menge an BMP-2 und BMP-6 mRNA exprimieren. Alle bisher beschriebenen oNCSCs haben die intrinsische Fähigkeit, osteogene Zelltypen hervorzubringen, was die Herkunft dieser Stamm-Zellen aus der

Neuralleiste weiter unterstreicht. Insbesondere eine Kombination aus Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-phosphat in einem FCS-haltigen Medium wurde häufig zur osteogenen Induktion verschiedener oNCSC-Populationen verwendet. Die osteogene Induktion in der Frühphase kann durch Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) oder durch RT-PCR oder qPCR-basierte Messung von Markergenen, z. B. Osteopontin, Osterix, Osteonectin, beurteilt werden.

Immunmodulatorische Eigenschaften von oNCSCs

Unsere Daten deuten auch darauf hin, dass oNCSCs aufgrund ihrer überlegenen immunmodulatorischen Eigenschaften, die durch verschiedene Zytokine, insbesondere durch Interferon- γ (IFN- γ), reguliert werden, ein guter Kandidat für allogene SC-basierte Therapien sein können. Diese Eigenschaften von oNCSCs können für defekte Heilungsprozesse von oralem Gewebe von Vorteil sein. Im Gegensatz dazu gibt es weniger Informationen über die Wirkung von Toll-like-Rezeptor-Liganden auf die immunmodulatorischen Eigenschaften dieser Zellen. Unsere Daten zeigen eine potenzielle Interaktion zwischen IFN- γ - und TLR2-Reaktionen in hoNCSCs, die an der Regulierung der Immunantwort bei Entzündungsprozessen und insbesondere nach der Sofort-Implantatinsertion beteiligt sein könnten. Da oNCSCs selbst in pro- und antiinflammatorische Phänotypen polarisiert werden können, ist es von großem Interesse, ob die pro- oder antiinflammatorisch polarisierten oNCSCs anti-inflammatorischen Zytokine sezernieren. Die Literaturdaten zeigen eine mögliche Interaktion zwischen IFN- γ und TLR2-Reaktionen in oNCSCs, die an der Regulierung der Immunantwort bei akuten Entzündungsprozessen beteiligt sein könnten. Über die immunregulatorischen Funktionen von oNCSCs wurde in der Literatur weiter berichtet (Király et al., 2009). Gleichzeitige PKC- und cAMP-Aktivierung induziert die Differenzierung menschlicher Zahnmarkstammzellen in funktionell aktive Neuronen. Wir vermuten daher, dass oNCSCs einen hoch immunprivilegierten Stammzellentyp darstellen könnten.

Präklinisches Großtiermodell zur initialen Untersuchung der Sicherheit und Wirksamkeit endogener NCSC-Transplantationen

Nach den überarbeiteten Leitlinien der International Society for Stem Cell Research (ISSCR) sollten Tiermodelle verwendet werden, da sie die menschliche Anatomie und Pathologie besser simulieren (2021). Der Verabreichungsweg, die optimalen Zellzahlen und die Dosis von Biologika können auf der Grundlage von Großtierstudien besser auf das menschliche System extrapoliert werden. In diesem Zusammenhang bieten Schafmodelle den Vorteil, dass sie ein ähnliches Körpergewicht wie der Mensch haben und eine deutlich längere Lebensspanne, die Langzeitstudien ermöglicht. In unseren kürzlich veröffentlichten Großtierstudien (Übersicht siehe Zeuner et al. 2017) konzentrierten wir uns auf die Zulassung des standardisierten Alveolarknochendefektmodells beim Schaf, das als „Iliac-Schaf-Modell“ weiterentwickelt wurde (Abb. 4).

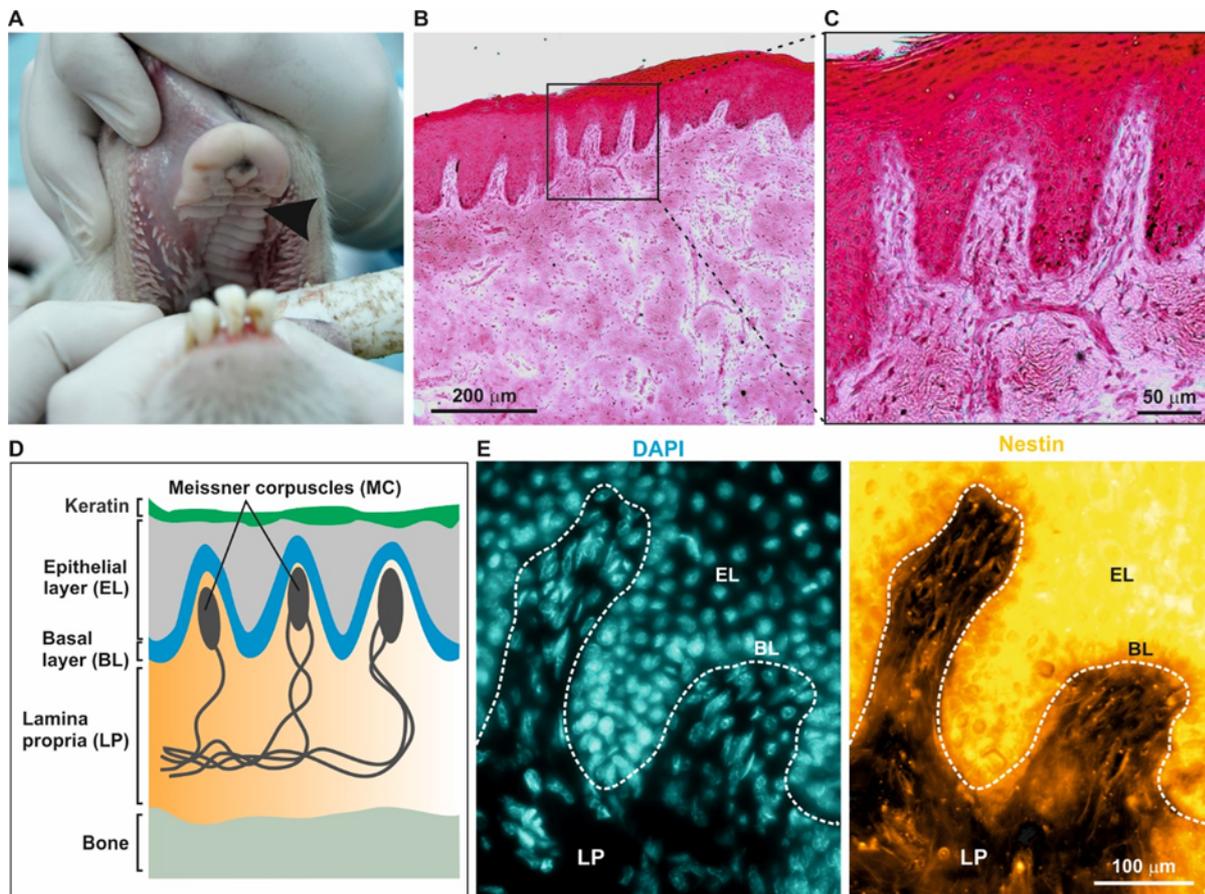


Abb. 4: Der adulte harte Gaumen von Schafen enthält Stammzellen aus der Neuralleiste (A) Der harte Gaumen von Schafen wurde entnommen und Sagittalschnitte wurden angefertigt. (B-D) Die typische Struktur mit der äußeren Keratinschicht, der Epithelschicht (EL), der Basalschicht (BL) sowie der Lamina propria (LP) einschließlich der innervierten Meissner-Körperchen (MC) wurde durch Hämatoxylin- und Eosin-Färbung sichtbar gemacht. (E) Die Immunzytochemie zeigt das Vorhandensein des neuralleistenspezifischen Intermediärfilaments Nestin (gelb) in der LP, insbesondere in den MC. Die nukleäre Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (cyan).

Diese Studien umfassten die Isolierung und Charakterisierung von oNCSC aus Schafsgaumengewebe und die Entwicklung adäquater Bewertungsmethoden für die klinische und histo-pathologische Effizienz zur Beurteilung des Alveolarknochen-Regenerationsprozesses unter Verwendung geeigneter Röntgen-, MicroCT- und nicht demineralisierter histologischer Methoden. Kurz gesagt, wurden primäre orale Neuralleisten-Stammzellen vom Schaf aus dem Gaumen gewonnen, um sie mit menschlichen oNCSC zu vergleichen. Alle diese oNCSC-Populationen können mittels magnetischer Zellseparation auf der Basis ihrer Expression des Zelloberflächenmarkers CD271 isoliert und angereichert werden (siehe folgendes Kapitel "CD 271-basierte magnetische Isolierung von tierischen und menschlichen Gaumen-Stammzellen"). Das osteogene Potenzial der aus Schafen stammenden NCSCs wurde in unseren Studien durch verschiedene histologische Messungen an nicht demineralisiertem und demineralisiertem Alveolarknochengewebe untersucht. Die verschiedenen histologischen Messungen an nicht demineralisiertem Knochengewebe, die in unseren Studien mit Schafen verwendet wurden, zeigten ein hohes Potenzial für die Bewertung der regenerativen Knochenprozesse, die durch die Verwendung von *Homing*-Prozessen stattfinden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnten wir zeigen, dass von Schafen stammende NCSCs als geeignete Zellquelle für das *Homing* und für die Bewertung der regenerativen Knochenprozesse dienen könnten, die in den von unserer

interdisziplinären und internationalen Forschungsgruppe entwickelten Schafmodellen stattfinden.

Stem Cell Sheets mit oNCSCs aus der Neuralleiste: eine neue zellbasierte Strategie für die Knochenreparatur und -regeneration

Die Grenzen herkömmlicher *Tissue-Engineering*-Methoden (Zellsuspensionen, Scaffolds und/oder Wachstumsfaktoren) schränken jedoch ihre Anwendung in der Knochenregeneration ein. Wir und andere Forschungsgruppen haben gezeigt, dass orale Stammzellen aus der Neuralleiste (oNCSCs), eine Klasse adulter Stammzellen, eine vielversprechende Quelle für die Knochenregeneration sind. Obwohl die Kombination von NCSCs mit Biomaterialgerüsten eine interessante klinische Strategie für das Knochengewebe-*Engineering* darstellt, könnte das Vorhandensein der Scaffolds eine unerwünschte Wirkung auf die Zell-Zell-Interaktionen haben. Darüber hinaus müssen die Stamm-Zellen vor der Anwendung von Gerüstmaterialien bei der Rekonstruktion von Knochengewebe mit proteolytischen Enzymen wie Trypsin oder Disase manipuliert werden, die Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) und Zelloberflächenproteine abbauen, was zu einer Schädigung der Stamm-Zellen und einem Verlust der Zellaktivität führen kann (Abb. 5).

Der Knochen hat eine intrinsische Fähigkeit zur Selbstregeneration. Wenn jedoch die Größe der Läsion oder der Grad der Degeneration zu schwerwiegend ist, um durch endogene Reparaturmechanismen regeneriert zu werden, bietet der Einsatz von Stammzellen eine vielversprechende Möglichkeit, das verlorene Gewebe zu ersetzen oder die Regenerationsfähigkeit des Knochengewebes zu steigern. Es ist wichtig, dass mehrere Arten von adulten Vorläufer- und Stammzellen beschrieben wurden, die in der Lage sind, Knochenzellen zu bilden. Dazu gehören Osteoblasten-Vorläuferzellen, mesenchymale Stromazellen (MSC) unterschiedlicher Herkunft und adulte Stammzellen aus der Neuralleiste (NCSC). Alle diese Zelltypen könnten daher potenziell zur Regeneration von Knochengewebe nach der Transplantation durch Differenzierung und funktionelle Integration eingesetzt werden (Zhao et al. 2015).

Daher ist die Entwicklung alternativer Strategien für die Knochenregeneration erforderlich, um diese Probleme zu lösen. In jüngster Zeit wurde eine neuartige *Tissue-Engineering*-Technologie mit der Bezeichnung "cell sheet" bei der Regeneration von Knochen-, Hornhaut-, Herz-, Luftröhren- und parodontalem ligamentähnlichem Gewebe wirksam eingesetzt. Das "cell sheet" ist eine Schicht von Stamm-Zellen, die intakte ECM und Zelloberflächenproteine wie Wachstumsfaktorrezeptoren, Ionenkanäle und Zell-Zell-Verbindungsproteine enthält. Die Differenzierung von Neuralleistenzellen in Richtung der osteogenen Linie wird zumindest teilweise durch die Topologie vermittelt. Zell-Material-Wechselwirkungen sind bei biomedizinischen Implantaten von besonderem Interesse, da der erste Kontakt zwischen den Zellen und dem Biomaterial über den Erfolg der Methode entscheiden kann. In der Tat wurde berichtet, dass eine geeignete nanoskalige Topologie die osteogene Differenzierung einer Vielzahl von Zelltypen, einschließlich osteogener Zelllinien, unreifer menschlicher Osteoblasten und mesenchymaler Stammzellen (MSCs), induzieren kann. Als Teil der Mikroumgebung des Gewebes, in der sich die Zellen befinden, sind die Oberflächenmorphologie und das gewählte Träger-Material ein wesentlicher Bestandteil dieser Interaktion und der zellulären Reaktion - Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung - und tragen letztlich zum Überleben der Zellen und zur Gewebebildung bei. Texturierte Oberflächenmerkmale sind von besonderem Interesse, da Zellen über mikro- (z. B. Organellen) und nanoskalige (z. B. Proteinkomplexe mit fokalen Adhäsionen) mit der extrazellulären Umgebung interagieren. Wenn eine Oberfläche eine charakteristische Dimension in der gleichen Größenordnung wie Proteinkomplexe bis hin zu Organellen aufweist, kann die Reaktion der Zelle durch eine Vielzahl von intrazellulären

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

Signalisierungs- und Mechanotransduktionsereignissen moduliert werden, was zu einer veränderten Gentranskription führt und möglicherweise die Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen reguliert, siehe Übersicht Sheard et al. (2019).

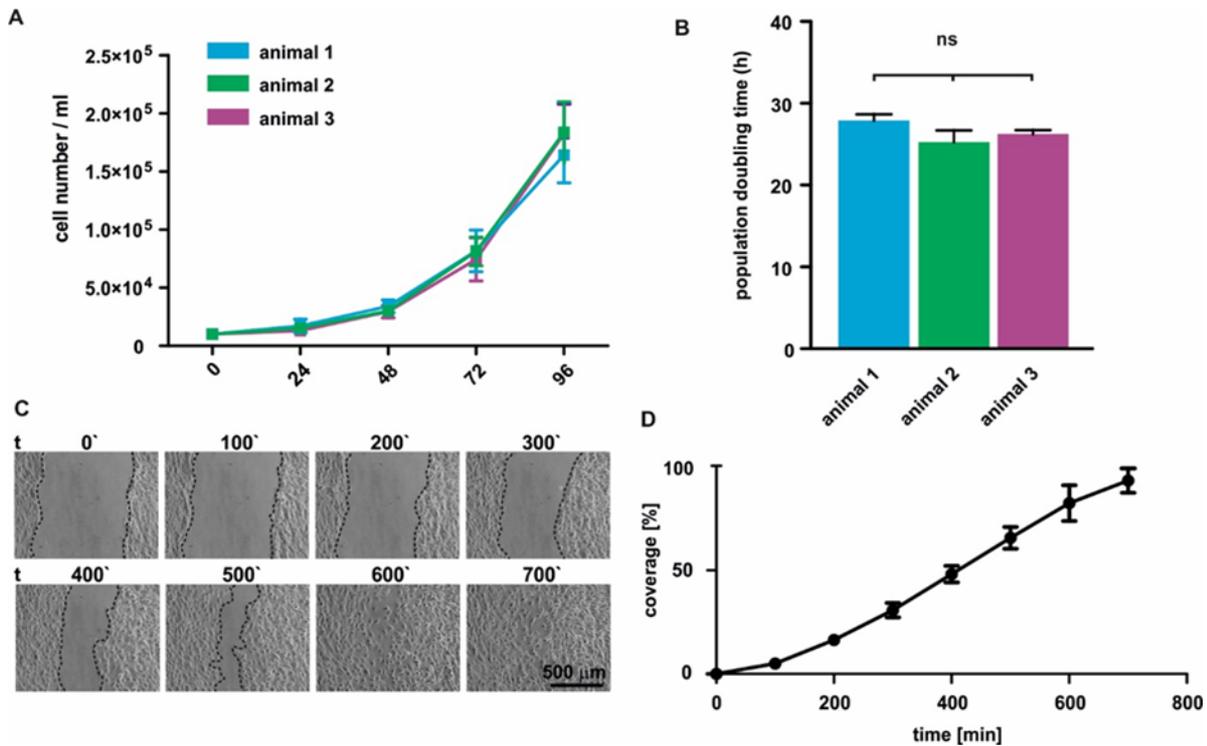


Abb. 5: oNCSCs sind proliferativ und zeigen Migration *in vitro* (A) Die Zellzahl wurde nach 24, 48, 72 und 96 Stunden in adhären Kulturen von oNCSCs bestimmt, die aus drei verschiedenen Tieren isoliert wurden. Es wurde eine normale Wachstumskurve beobachtet. (B) Die Bestimmung der Verdopplungszeit der Population zeigte keinen Unterschied zwischen den verschiedenen oNCSC-Isolationen. (C) Ein *in vitro*-Wundheilungstest wurde durchgeführt, indem die Migration der Zellen in einer konfluenten Kultur mit Hilfe der Zeitraffermikroskopie 12 Stunden lang beobachtet wurde. (D) Die Heilung des simulierten Defektes wurde im Laufe der Zeit bewertet. Die Wundheilung wurde zwischen 9 und 11 Stunden erreicht.

Die Verwendung von allogenen Knochentransplantaten mit einem stabilisierendem stammzellhaltigen subepithelialen Bindegewebestransplantat ist nicht auf reifen vollständig mineralisierten Knochen beschränkt. Wir haben uns für ein stammzellhaltiges subepitheliales Bindegewebestransplantat und allogenen menschlichen Knochen entschieden. Wir verwendeten ein steriles, hochsicheres (Spenderauswahl, Virustests, chemische Reinigung, Verarbeitung und Sterilisation) allogenes Knochenprodukt aus menschlichem Spenderknochen (OsteoGraft™-Block) als Träger für unser stammzellhaltiges Gaumenweichgewebe. Die hohe biologische Regenerationsfähigkeit dieses allogenen Knochenblocks führt zu einem vorhersagbaren klinischen und histopathologischen Ergebnis.

CD 271-basierte magnetische Isolierung von tierischen und menschlichen Gaumen-NSCs

Basierend auf der Migrationsfähigkeit von oNCSCs haben wir erfolgreich eine Trennungsstrategie entwickelt, um eine Population von aus der Mundhöhle stammenden Neuralleisten-Stammzellen

mit Neuralleisten-Stammzellmerkmalen in verschiedenen tierischen und menschlichen Geweben mit minimal-invasiven chirurgischen Verfahren zu isolieren und zu identifizieren (siehe Übersicht, Grimm et al. 2019). Wie wir gezeigt haben, verfügen diese Zellen über ein hohes Maß an Multipotenz und Selbsterneuerungsfähigkeiten, können unter feederfreien Adhäsionsbedingungen als Monolayer-Zellen kultiviert und erhalten werden und sind auch in der Lage, unter Suspensionsbedingungen in Form von Neurosphären zu wachsen. Zusammengefasst beschreiben unsere Ergebnisse eine leicht zugängliche Quelle multipotenter oNCSCs für die autologe Gewebezüchtung und zellbasierte therapeutische Forschung, die durch neueste Veröffentlichungen auf diesem Gebiet unterstützt wird (Weng et al. 2022). Kulturexpandierende neurale Stammzellen (NCSCs) werden derzeit in klinischen Studien verwendet, aber diese Eingriffe sind mit erheblichen Kosten und Bedenken über kulturbedingte Wirkungsverluste verbunden. Unsere Ergebnisse zeigen die Machbarkeit einer neuen klinischen Technologie zur Gewinnung von unkultivierten NCSC-Isolaten aus tierischen und menschlichen Gaumengewebequellen auf der Grundlage einer immunmagnetischen Selektion für CD271-positive Zellen. MACS MicroBeads® sind 50-nm-superparamagnetische Partikel, die mit hochspezifischen Antikörpern gegen das CD271 auf der NCSC-Oberfläche konjugiert sind. Aufgrund ihrer geringen Größe aktivieren sie keine Zellen und sättigen keine Zelloberflächenepitope. CD271, auch bekannt als LNGFR (*low-affinity nerve growth factor receptor*) oder p75NTR, gehört zur Superfamilie der *low-affinity neurotrophin receptor* und *tumor necrosis factor receptor*. CD271 ist ein bekannter Marker für Stammzellen, die von der Neuralleiste abstammen (Abb. 6).

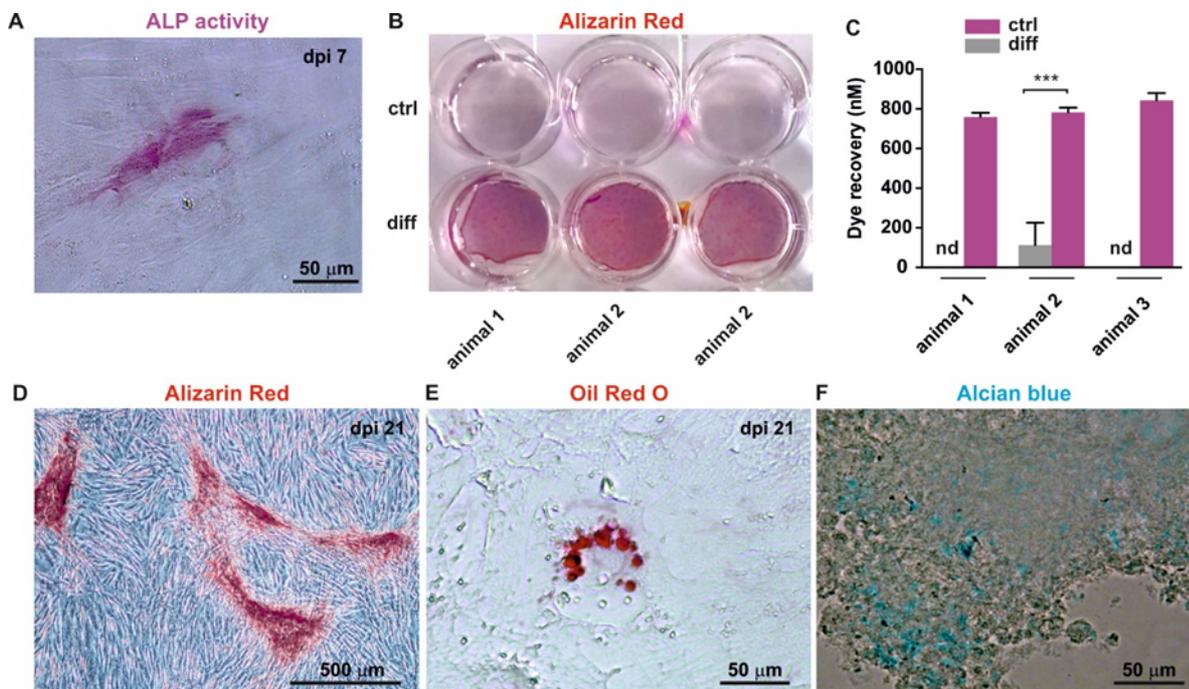


Abb. 6: oNCSCs sind in der Lage, verschiedene mesenchymale Zelltypen zu bilden (A) oNCSCs, die 7 Tage lang in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, zeigen alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität. (B-C) oNCSCs von drei verschiedenen Tieren, die 21 Tage lang in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden (B, untere Vertiefungen; C, magentafarbene Balken), enthalten deutlich mehr Kalziumablagerungen, wie die Alizarinrot-Färbung und die entsprechende Messung der Farbstoffausbeute zeigen, als Zellen in normalem Kulturmedium (B, obere Vertiefungen; C, graue Balken). (D) Vergrößertes Bild einer repräsentativen Kultur von oNCSCs - abgeleiteten Osteozyten (21 Tage) mit Alizarinrot-Färbung. (E) oNCSCs differenzieren sich in Adipozyten, wie die Ablagerung von Lipidtröpfchen mit Oil Red O nach 21 Tagen zeigt. (F) Nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung exprimieren die oNCSCs Glykoprotein, wie durch Alcianblau-Färbung gezeigt wird.

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

Das Gaumengewebe wurde isoliert und sofort unter sterilen Bedingungen mit dem mechanischen Rigenera®-Disaggregatorsystem aufbereitet. Zunächst wurden CD271+-Zellen indirekt mit CD271 (LNGFR)-PE-Antikörpern und anti-PE MicroBeads® magnetisch markiert. Dann wurde die Zellsuspension auf eine MACS®-Säule geladen, die sich im Magnetfeld des MACS-Separators® befand. Die magnetisch markierten CD271+-Zellen werden in der Säule zurückgehalten. Die unmarkierten Zellen passieren die Säule; diese Zellfraktion ist somit von CD271+ Zellen befreit. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, wurden die magnetisch zurückgehaltenen CD271+-Zellen als positiv selektierte Zellfraktion eluiert. Die erhaltene Suspension, die reich an oNCSCs ist, wurde mit Hilfe des allogenen Knochenträgers in die Implantationsstelle transplantiert.

Ausblick und entscheidende Hindernisse für den Fortschritt

Zu den aktuellen Forschungsthemen auf dem Gebiet der auf Stammzellen aus der oralen Neuralleiste basierenden Regeneration gehören unter anderem

- Entwicklung von Freisetzungstechnologien, die Signale zur Mobilisierung, Rekrutierung und Steuerung der Effektivität von endogenen oNCSCs liefern;
- Entwicklung therapeutischer und abbaubarer Biomaterialien, die mit dem Mund- (Gaumen-) Gewebe interagieren und die Heilung von Alveolarknochendefekten fördern;
- Gewährleistung einer nahtlosen Integration des Biomaterials in den Körper im Bereich des Implantats;
und
- die Erforschung von "Wächtern" zur Überwachung und Behandlung von Wundheilungsprozessen nach dem Einsetzen von Zahnimplantaten und nach regenerativen Prozessen des Zahnknochens.

Die Isolierung und verlängerte Expansion von oralen Stammzellen unter klinischen, GMP-konformen Bedingungen beeinflusst die Eigenschaften der "Stammzellen" auf unterschiedliche Weise

Die Weiterentwicklung sicherer und wirksamer Methoden, die die orale (Gaumen-) spezifische Ansiedlung gezielter oNCSC-Untergruppen ermöglichen, ist von entscheidender Bedeutung, um das *in situ Dental Tissue Engineering* und die Regeneration in ein klinisches Stadium zu bringen. Eine echte Voraussetzung für *in-situ*-Regenerationstechnologien und ihre biomedizinischen Anwendungen ist die Fähigkeit, lebende oNCSCs in einer operativ geschaffenen *Site* anzusiedeln, um so ein echtes "*Tissue Weaving*" zu realisieren. Um die therapeutischen Ergebnisse zu bestätigen, sollte ein besonderes Augenmerk auf die langfristige Bewertung der biologischen und mechanischen Eigenschaften dieser neu gebildeten Gewebe gelegt werden. Die fortgesetzte Zusammenarbeit zwischen Biologen, Chemikern, Ingenieuren und Klinikern auf diesem Gebiet wird eine neue Ära der klinischen regenerativen Zahnmedizin einleiten (Yu et al., 2022)

Wir müssen jedoch erkennen, dass das *Homing* von Stammzellen keine universelle regenerative Lösung darstellt, da die Rekrutierung körpereigener Zellen in einigen Fällen durch die geringe Regenerationsfähigkeit eines bestimmten Gewebes, durch das geringe Migrationspotenzial von

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

Wirtszellen im Körper und/oder durch eine altersbedingte geringe Anzahl regenerativ-reparativer Zellen, die mobilisiert werden können, eingeschränkt sein kann (Place et al. 2009).

Sekretome von aus der oralen Neuralleiste stammenden Stammzellen (unterstützte Transplantation (oNCSCsec), eine neue sekretombasierte Strategie für die Alveolarknochenregeneration

Derzeit gibt es keine Studien über die Anwendung des Sekretoms von Schaf-NCSCs in Tiermodellen zur Regeneration von Alveolarknochendefekten. Dennoch haben kürzlich veröffentlichte Berichte aus unserer Forschung robuste Auswirkungen auf zelluläre Prozesse gezeigt, die die Knochenregeneration fördern (Zeuner et al., 2017). In der Tat haben verschiedene Studien gezeigt, dass wichtige neurotrophe Faktoren wie der von Gliazellen abgeleitete neurotrophe Faktor (GDNF), der vom Gehirn abgeleitete neurotrophe Faktor (BDNF), der Stammzellfaktor (SCF) und der Insulinwachstumsfaktor (IGF) nach der Transplantation von NCSCs erhöht waren, was die von NCSCs vermittelten Regenerations-Effekte unterstützt (Haque et al. 2021). Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, die Auswirkungen des Sekretoms der Schaf-NCSCs auf die Heilung standardisierter Alveolarknochendefekte im Vergleich zu konventionellen Ansätzen wie der Transplantation von Schaf-NCSCs weiter zu untersuchen. In der Diskussion zu dieser Publikation werden wir kurz die Auswirkungen des Sekretoms von Schaf-NCSCs auf die Regeneration von Knochendefekten in unserem Schafmodell analysieren. Um die löslichen und EV-assoziierten Proteinkomponenten zu identifizieren, die potenziell zur Wirkung des Schaf-NCSC-Sekretoms beitragen, werden wir ein Schaf-NCSC-Profiling mit anschließender bioinformatischer Analyse durchführen, um die Proteine in der löslichen Fraktion im Schaf-NCSC-Sekretom gemäß Widera und Grimm (2019) zu analysieren und mögliche neue knochenregulatorische Moleküle aufzuzeigen, die diese Wirkungen vermitteln. Primärkulturen von ovinenNCSCs und Isolation des Sekretoms. Die Zellkultur von ovinenNCSCs wird wie von unserer internationalen Forschungsgruppe beschrieben und gemäß den Protokollen und strengen ethischen Richtlinien durchgeführt, die zuvor festgelegt und von den Ethikkommissionen für Gesundheitsforschung unserer Forschungspartner genehmigt wurden (Antrag IraSME).

Diskussion

Das *Homing* von Stammzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Gewebezüchtung. Es ist jedoch nur wenig über die Proliferation und Differenzierung von oNCSCs auf verschiedenen Trägermaterialien (Scaffolds) bekannt. Mehrere neuere Studien haben gezeigt, dass von der oralen Neuralleiste stammende Stammzellen aus kraniofazialen Geweben von Säugetieren wie dem parodontalen Ligament, der Zahnpulpa und dem Gaumen isoliert werden können. Diese Zellen haben gemeinsam, dass sie neurosphärenartige Cluster bilden und sich in serumfreier Kultur vermehren. Unter diesem Gesichtspunkt hat sich gezeigt, dass der menschliche Gaumen von entscheidender Bedeutung für den Regenerationsprozess ist. Obwohl klar ist, dass oNCSCs, die sich in den subepithelialen Weichteilen des Gaumens befinden, eine Knochenregeneration erreichen können, ist diese Population heterogen und es ist nicht bekannt, welche Subpopulationen eine Regeneration erreichen können. Im Jahr 2007 beschrieb unsere Forschungsgruppe erstmals die Charakterisierung und neuronale Differenzierungsfähigkeit von Stammzellen, die aus entzündetem Parodontalgewebe stammen (Widera et al.).

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

Diese so genannten *periodontal-derived neural crest-derived stem cells* (pdNCSCs) wurden durch minimal-invasive Parodontalchirurgie isoliert und als so genannte Dentasphären unter serumfreien Bedingungen kultiviert (Abb. 7).

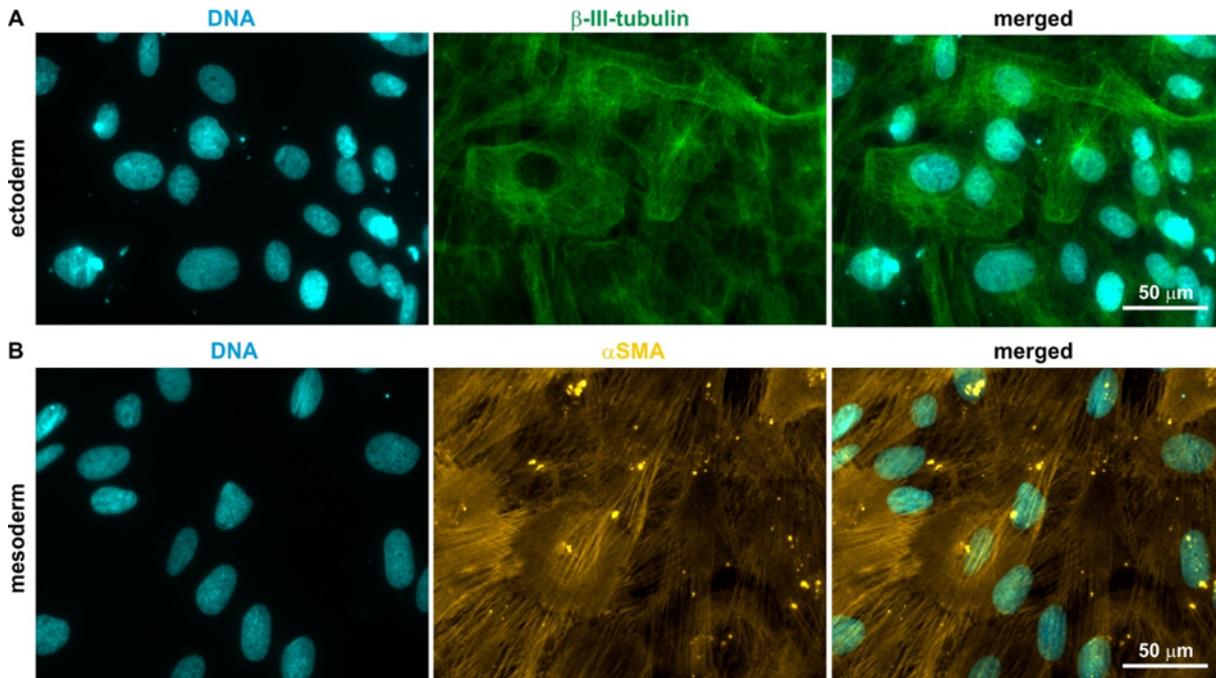


Abb. 7: oNCSCs differenzieren sich in Zellen der ektodermalen und mesodermalen Linie (A) Die ektodermale Differenzierung von oNCSCs führt zu β -III-tubulin-positiven Zellen (mittlere Tafel). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. (B) Glattmuskel-Aktin (α SMA) wurde in oNCSCs nach mesodermaler Differenzierung exprimiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Daher suchten wir nach einer neuartigen Quelle für Stammzellen aus der Mundhöhle, die sich hervorragend für regenerative Zwecke eignen. Im Jahr 2009 beschrieben Widera et al. erstmals das Vorhandensein von Nestin-positiven Stammzellen aus der Neuralleiste in Meissner-Körperchen und Merkelzell-Neuritenkomplexen im harten Gaumen von erwachsenen Wistar-Ratten. Die Charakterisierung der oNCSCs durch RT-PCR und Durchflusszytometrie ergab die Expression mehrerer Stammzellmarker wie Nestin und Sox2 sowie STRO-1 und CD146. Weitere Differenzierungsstudien bestätigten dieses Konzept und zeigten, dass oNCSCs auch eine osteogene Differenzierungsfähigkeit aufweisen. Die osteogene Differenzierungsfähigkeit von oNCSCs war deutlich ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass diese Zellen ein geeignetes zelluläres Werkzeug für *Homing* zum Zweck der alveolären Knochenregeneration sein könnten.

Tatsächlich wurde festgestellt, dass Zellen, die aus dem Gaumen stammen, spezifische Eigenschaften aufweisen, wie z. B. erhöhte Proliferationsraten, und einen regenerativen Phänotyp repräsentieren, wie von unserer Forschungsgruppe und Forschungsgruppen weltweit gezeigt wurde (siehe Übersicht von Moshy et al., 2020, Grimm et al. 2019).

Ausgehend von der Hypothese, dass die Anzahl der oNCSCs sekundär ist, wird das individuelle Potenzial der oNCSCs, hohen Stress zu überleben und chemotaktisch osteogene Vorläuferzellen anzuziehen, dominieren. Da das Augmentationsmaterial weit von der

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

lokalen Blutversorgung entfernt ist, kann davon ausgegangen werden, dass ein natürliches Selektionsverfahren auf die Zellen angewendet wird (*Stem Cell Homing*). Da sich die Blut- und Sauerstoffversorgung in kleinen standardisierten Alveolarknochendefekten von selbst wiederherstellt, könnten die oNCSCs dann ihr volles Potenzial entfalten. Daher wurde stammzellgestütztes humanes allogenes Knochenersatzmaterial als Stammzell-*Homing* analysiert. Es zeigte sich, dass die Neubildung von mineralisiertem Knochen überwiegend um und neben dem stammzellgetragenen allogenen Knochenersatzmaterial stattfand, was mit der derzeit verfügbaren Literatur übereinstimmt. Die histologischen Ergebnisse weisen eindeutig auf das zuvor beschriebene osteoinduktive Potenzial der verwendeten Stammzellen aus der Neuralleiste des menschlichen Gaumens hin. Eine verstärkte Bildung von nicht mineralisierter extrazellulärer Matrix und eine erhöhte Mineralanlagerungsrate in der Nähe der sich abbauenden allogenen Knochengestelle wurden von einer erhöhten osteoklastischen Knochenoberfläche begleitet, was zu einer höheren Knochenmasse und einer Tendenz zu einer reiferen trabekulären Knochenstruktur um die allogenen Knochengestelle herum führte (Yue et al., 2022, Grimm et al., 2015).

Diese Ergebnisse zeigen, dass stammzellunterstützte Allogen-Knochengestelle ein ausgedehntes periimplantäres Knochenremodeling bei guter Biokompatibilität induzieren. Von besonderem Interesse war der Einfluss der Einheilzeit auf die Neubildung von mineralisiertem Knochen. Eine detaillierte deskriptive Auswertung der histologischen Proben ergab das Vorhandensein von Osteoid- und "Knochenauskleidungszellen" als histologische Merkmale einer überwiegend direkten Ossifikation. Nach 3 Monaten und nach 4 Monaten bestand ein enger Kontakt zwischen dem neu gebildeten mineralisierten Knochen und dem stammzellgestützten allogenen Knochenersatzmaterial. Der periimplantäre Knochen schien weniger ausgereift zu sein. Nichtsdestotrotz können aus der Mundhöhle stammende Neuralleisten-Stammzellen des *in-vivo*-Milieus modifiziert werden, um den nativen Regenerationsprozess zu fördern und das zukünftige *Tissue-Engineering-Design* zu inspirieren.

Literatur-Zitate

Grimm, W.D., Dannan, A., Giesenhagen, B., Schau, I., Varga, G., Vukovic, M.A., Sirak, S.V. Translational research: Palatal-derived ecto-mesenchymal stem cells from human palate: A new hope for alveolar bone and cranio-facial bone reconstruction. *Inter J Stem Cells* 2014 7 (1), 23-29.

Grimm WD, N Didenko, T Fritsch, B Giesenhagen, MA Vukovic. Effect of Human Neural Crest-Related Stem Cell Homing (hNCSCs homing) on the Mineralization of Newly Formed Alveolar Bone using an Allogene Bone Substitute. *Biomed J Sci & Tech Res* 17(2)-2019.

Yin Y, X. Li, X.T. He, R.X. Wu, H.H. Sun, F.M. Chen. Leveraging Stem Cell Homing for Therapeutic Regeneration, *Journal of Dental Research* 2017, Vol. 96(6) 601–609

Meng L, Wei Y, Liang Y, Hu Q and Xie H (2022), Stem cell homing in periodontal tissue regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10:1017613.

Le Douarin NM, Dupin E. The "beginnings" of the neural crest. *Dev Biol.* 2018 Dec 1;444 Suppl 1: 3-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.07.019. Epub 2018 Jul 23

Achilleos, A and PA Trainor, Neural crest stem cells: discovery, properties, and potential for therapy 2014 *Cell Research* (2012) 22:288-304

Widera D, Zander C, Heidbreder M, et al. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells* 2009; 27:1899-1910

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com

- Grimm WD, A Dannan, S Becher, G Gassmann, WH Arnold, G Varga, Th Dittmar. The Ability of Human Periodontium-derived Stem Cells to Regenerate Periodontal Tissues-A Preliminary in vivo Investigation. *Int. J Periodont. Rest. Dentistry* 30: 2011, Vol. 31, Nr. 6, e94-e101
- Lane SW, Williams DA, Watt FM. 2014. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol.* 32(8):795–803.
- Haque NH, D Widera, V Govindasamyd, P Soesilawatie, NHA Kasime. Extracellular Vesicles from Stem and Progenitor Cells for Cell-Free Regenerative Therapy. *Current Molecular Medicine* 2021, 21, 1-12
- Grimm, W.-D. and D. Widera, "Secretome of stem cells as an alternative to stem cell transplantation, *Genes and Cells*, vol. 14, p. 12, 2019
- Zhao D, Lei L, Wang S, Nie H. 2015. Understanding cell homing-based tissue regeneration from the perspective of materials. *J Mater Chem B.* 3(37):7319–7333
- Widera D, Grimm W-D, Moebius J, Piechaczek C, Gaßmann G, Wolff N, Thévenod F, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. Highly Efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated via minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev* 2007; 16 (3):447-60
- Zeuner M.-Th., L. Turner, D. Humphries, S. Stergiadis, T. Morash, K. Patel, W.-D. Grimm, D. Widera. Isolation and Characterisation of Adult Ovine Neural Crest-Derived Stem Cells from Palatal Tissue. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018, 6:39, 1-10,
- Király M, B Porcsalmy, A Pataki, K Kádár, M Jelitai, B Molnár, P Hermann, I Gera, Wolf-D Grimm, B Ganss, A Zsembergy, G Varga. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem Int.* 2009;55(5): 323-32
- International Society for Stem Cell Res (ISSCR). Version 1.0, May 2021 <www.isscr.org>
- Sheard JJ, Bicer M, Meng Y, Frigo A, Aguilar RM, Vallance TM, Iandolo D, Widera D. Optically Transparent Anionic Nanofibrillar Cellulose Is Cytocompatible with Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Allows Simple Imaging in 3D. *Stem Cells Int.* 2019 Oct 7;2019:3106929.
- Yu, M., Luo, D., Qiao, J., Guo, J., He, D., Jin, S., et al. (2022). A hierarchical bilayer architecture for complex tissue regeneration. *Bioact. Mat.* 10, 93–106. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.08.024
- Sara El Moshy,1,2 Israa Ahmed Radwan ,1,2 Dina Rady,1,2 Marwa M. S. Abbass, AA El-Rashidy, KM. Sadek, ChrE. Dörfer, KM Fawzy El-Sayed. Dental Stem Cell-Derived Secretome/Conditioned Medium: The Future for Regenerative Therapeutic Applications. *Stem Cells International* 2020, 1-29
- Place ES, Evans ND, Stevens MM. 2009. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater.* 8(6):457–470.
- Yue C, J Cao, A Wong, JH Kim, S Alam, G Luong, S Talegaonkar, Z Schwartz, BD Boyan, WV Giannobile, SE Sahingur, Z. Lin. Human Bone Marrow Stromal Cell Exosomes Ameliorate Periodontitis. *J Dent Res* 2022, Vol. 101(9) 1110–1118
- Grimm WD, B. Giesenhagen, S. Hakki, I. Schau, S. Sirak, A. Sletov, G. Varga, M. A. Vukovic, D. Widera. Translational Research and Therapeutic Applications of Neural Crest-Derived Stem Cells in Regenerative Periodontology. *Curr Oral Health Rep* 2015 DOI 10.1007/s40496-015-0067-6

Herausgeber:

NAM Research Institute
Rochusgasse 13
A-5020 Salzburg

Tel: +43(0)662-822788
Mobil: +43(0)664 1250 239
salzburg@nam-institut.com