

! Fallpresentation. Referentgranskad
– accepterad för publicering 31 juli 2018.

Autogena stamceller för benrekonstruktion av defekter i käkarna

Denna fallbeskrivning visar två patienter med större defekter i mandibeln vilka initialt fick ben transplanterade, men där transplantaten inte läkte in. Patienterna erbjöds att pröva en kombination av autogena stamceller och β -trikalciumfosfat. Efter cirka ett år fick patienterna titanimplantat i de rekonstruerade områdena, och resultatet var gott vid uppföljningen efter tre månader.



Författare

Lars Rasmusson (bild), professor.*

E-post: lars.rasmusson@gu.se

Göran Kjeller, docent.*

Ulf Nannmark, docent.*

Christian Schaefer, doktorand.*

Susanna Miettinen, docent, inst för biomedicinsk teknologi, Tammerfors universitet, Finland.

George K Sándor, professor, avd för oral och maxillofacial kirurgi, Uleåborgs universitet, Finland.

*Avd för oral och maxillofacial kirurgi, Inst för odontologi, Sahlgrenska akademien, Göteborgs universitet.

Stamceller från fettvävnad hos vuxna kan användas för att skapa nytt ben hos patienter med defekter i käkar och ansiktsskelett. I ett samarbetsprojekt mellan Sahlgrenska akademien vid Göteborgs universitet och universitetet i finska Tammerfors har vi framgångsrikt rekonstruerat större defekter i underkäken, vilka inte läkt med konventionell behandling, det vill säga autogena bentransplantat, med ben bildat från stamceller hämtade i respektive patients eget buk fett (ASC: adipose stem cells). Denna rapport beskriver de två första patienterna i Sverige vars käkben rekonstruerats med autogena stamceller från fettvävnad.

Olika strategier har prövats för att rekonstruera bendefekter efter omfattande ansiktstrauma eller resektionskirurgi. Fria autologa bentransplantat från tibia, crista iliaca eller calvarium är fortfarande vanligast men fungerar endast vid defekter på maximalt 4–6 cm [1, 2]. Större defekter kräver i allmänhet vasculariserade transplantat, till exempel från fibula [3, 4], vilket i sin tur kräver friska kärl på både tag- och mottagande plats. Därutöver får man acceptera en viss morbiditet vid tagstället [5].

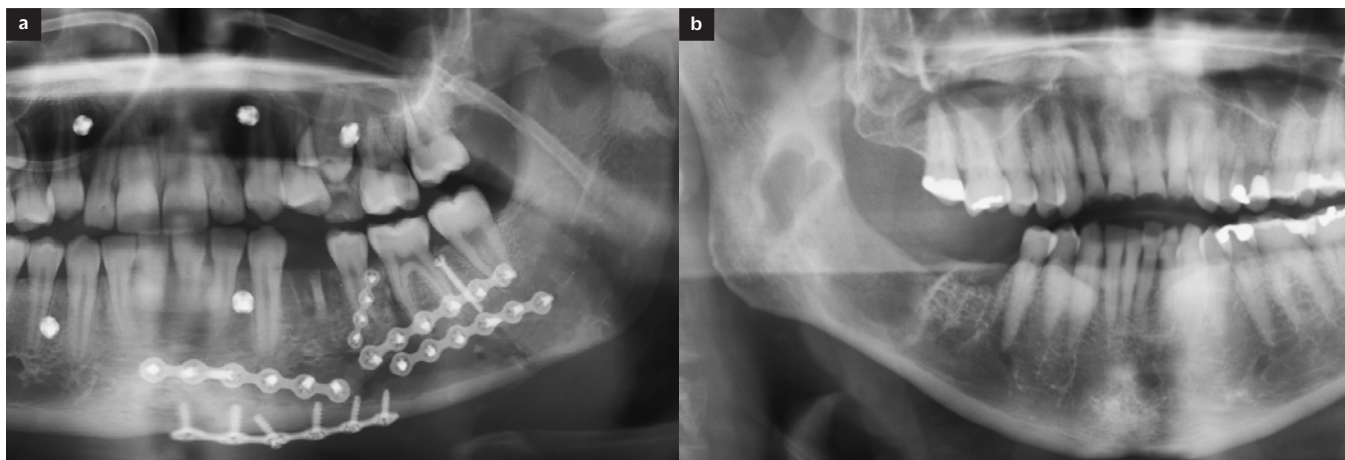
Multipotenta mesenkymala stamceller hos vuxna finns i ett flertal vävnader som benmärg och fettvävnad [6, 7], med högre förekomst i den senare.

In vitro kan dessa celler odlas och mångfaldigas till benbildande celler med bibehållna osteoinduktiva egenskaper (osteoinduktiv = direkt benproducerande egenskap). I kombination med olika typer av biomaterial kan de benproducerande cellerna implanteras i en bendefekt för att mogna och växa samman med vävnaden i och runt defekten. Ett flertal experimentella och kliniska studier visar på lovande resultat [8, 9]. Olika biomaterial har provats som förstärkning och ”byggställning” (osteokonduktiv egenskap) för nybildning av ben och det mest använda är sannolikt hydroxylapatit, men även beta-trikalciumfosfat (β -TCP) och calciumsulfat har utnyttjats [10].

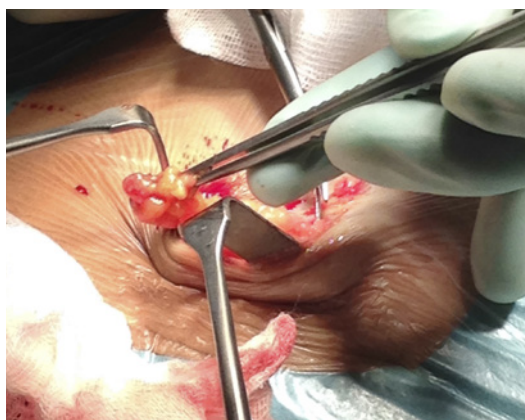
Tillväxtfaktorer tillsätts ofta och mest potent är gruppen bone morphogenetic proteins (BMPs) som kan bilda ben ektopiskt vid injektion i till exempel muskelvävnad [11].

Speciellt BMP-2, -4 och -7 har visat sig vara viktiga för benbildning då de stimulerar odifferentierade mesenkymala stamceller att övergå till osteoprogenitorceller [12]. En teknik där ASC, β -TCP och BMP-2 kombineras har utvecklats och genomgått omfattande *in vitro*- och *in vivo*-prövningar [12–14], med gott resultat avseende benbildning.

Den här fallbeskrivningen visar de två första patienterna i Sverige vilka fått större defekter i man-



Figur 1 a–b



Figur II



Figur III.

Figur 1 a–b. Kontinuitetsdefekter i mandibeln efter a) trauma och b) resektion av desmoplastiskt ameloblastom.

Figur II. Cirka 200 ml subkutan fettvävnad uthämtas ur buk fettet hos en av patienterna.

Figur III. β -TCP-granuler, differentierade stamceller och 12 mg rh-BMP-2 mixades direkt före implantation i den defekta mandibeln.

dibeln behandlade med autologa stamceller från fettvävnad i kombination med β -TCP och BMP-2.

PATIENTER OCH METOD

Två patienter med kontinuitetsdefekter i mandibeln (figur I) och som tidigare genomgått bentransplantation med otillfredsställande läkning genomgick implantation av ASC, rhBMP-2 och β -TCP. Alla ingrepp genomfördes vid käkkirurgiska kliniken, Universitetssjukhuset i Tammerfors, av kirurger från både Göteborg och Tammerfors.

Vid en inledande operation togs cirka 200 ml subkutan fettvävnad från buken via ett cirka 5 cm långt hudsnitt (figur II). Parallellt aspirerades 100 ml venblod ur vilket 60 ml serum erhöles efter centrifugering.

Cellodling

Uttagen fettvävnad finfördelades och fettcellerna isolerades. Cellerna expanderades *in vitro* i 21 dagar tillsammans med rekombinant kollagenas NB-6 (GMP grade, Invitrogen, Paisley, England). Som odlingsmedium användes DMEM F-12 (Gib-

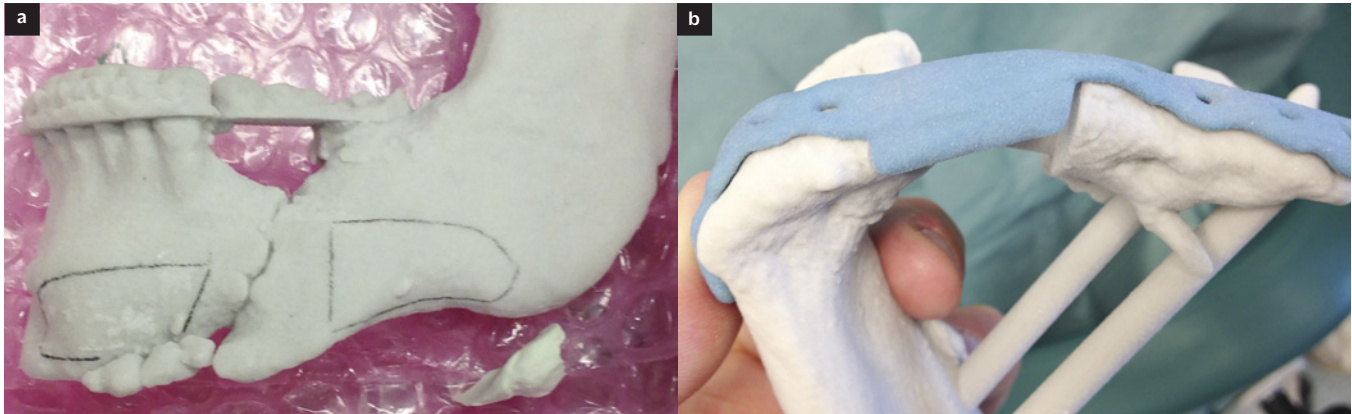
co Invitrogen, Paisley, England) med 15 procent autologt serum. Cirka 10 miljoner celler kan utvinnas ur 200 ml fett [13].

Två dygn före implantation blandades de expanderade cellerna med 40 ml β -TCP granulae (storlek 1,4–2,8 mm, porositet på 60 procent, (Chronos1 Synthes, Oberdorf, Schweiz)) och 12 mg rh-BMP-2 (InductOS, Eyth Europa, Berkshire, UK) (figur III). Sterilitet och förekomst av endotoxiner kontrollerades (Biovia Ltd, Åbo, Finland) enligt riktlinjer från European Pharmacopoeia (Council of Europa, Strasbourg, Frankrike). Fettcellerna testades för eventuell förekomst av mykoplasma (VenorGem; Minerva Biolabs, GmbH, Berlin, Tyskland), där samtliga tester var negativa för båda patienterna.

Cellöverlevnad och cellvitalitet kontrollerades inför implantation med vitalfärgning (figur IV) med Cell-Tracker green (5-chloromethylfluorecein diacetat, Molecular Probes Eugen, OR) och ethidium homodimer-1 (Molecular Probes). Differentiering mot osteogena celler kontrollerades med alkaliskt fosfat (ALP) (Sigma procedur 86–86R-1KT).

All cellodling och immuncytologi utfördes vid

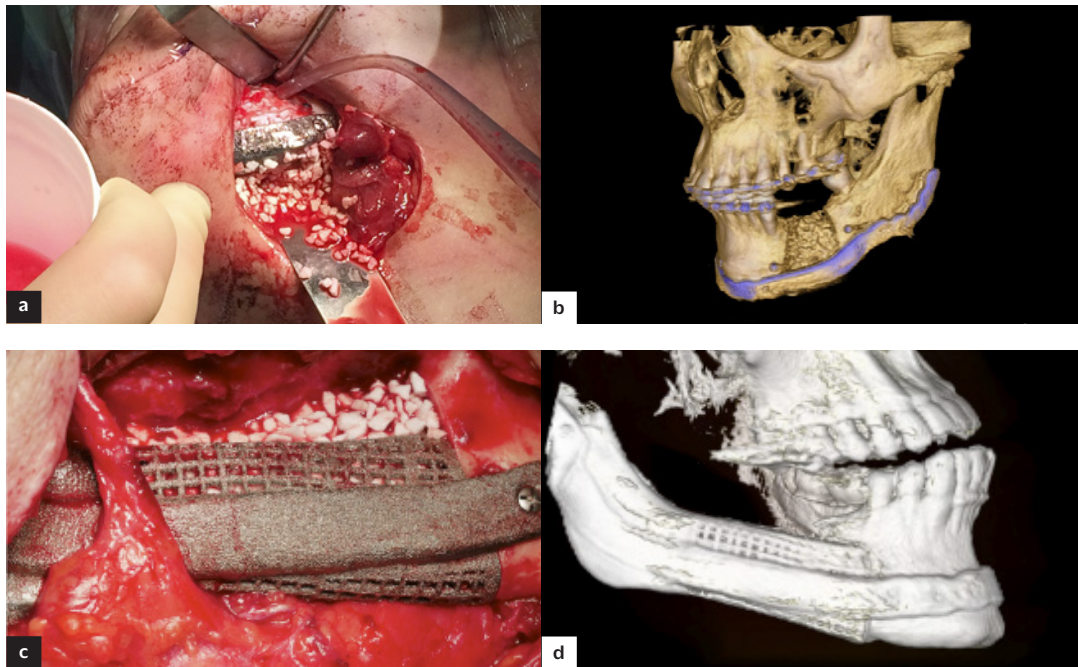
”Vid en inledande operation togs cirka 200 ml subkutan fettvävnad från buken via ett cirka 5 cm långt hudsnitt.”



Figur IV a–b

Figur IV a–b. 3D-modell för operationsplanering på en av patienterna (patient 1). a) Defekten i mandibel innan korrektion. b) Efter resektion och återskapande av korrekt intermaxillär relation och ocklusion. Den blå skenan representerar den individuella rekonstruktionsplattan.

Figur V a–d. Peroperativa situationer och postoperativa röntgenbilder av patient 1 (a–b) och patient 2 (c–d).



Figur V a–d

REGA Cell and Tissue Center, BioMediTech, Tammerfors universitet.

Ingrepp nummer 2

Inför ingrepp nummer 2 tillverkades 3D-modeller baserade på DICOM-filer från CT-undersökningar gjorda cirka en månad innan planerad operation (figur IV). Dessa modeller utgjorde grund för operationsplaneringar (Planmeka, Helsinki, Finland) och förflyttningar av de ingående mandibelfragmenten för att återupprätta en korrekt relation inom respektive käke samt förhållande till motstående käke. Defekternas storlek var i första fallet 13 x 18 mm och i andra fallet 45 x 20 mm.

Baserat på dessa justeringar tillverkades en indi-

viduell rekonstruktionsplatta till respektive patient och för patient nummer 2 framställdes även en U-formad korg av titannät.

Isamband med ingrepp nummer 2 frilades respektive område tänkt för rekonstruktion via submandibulär entré. Planerade resektioner och korrekationer av respektive defekt gjordes och de individuella rekonstruktionsplattorna applicerades, enligt den preoperativa planen. Därefter applicerades ett resorberbart nät av PLA/PGA (patient 1; KLS Martin, Tuttlingen, Tyskland) eller en U-formad korg av titannät (patient 2) runt respektive defekt. Avslutningsvis fylldes respektive defekt med kombinationen av celler, tillväxtfaktor och biomaterial (figur V), innan såren slöts i skikt.

”I samband med implantat-installationen noterades kliniskt en normal benvävnad.”

Postoperativt genomfördes förnyad CT som grund för bedömning av resultat och framtida läkning (figur V).

Installation av implantat

Efter läkning i tolv (fall 1) respektive elva månader (fall 2) genomfördes installation av dentala implantat (Straumann, Standard Plus/SLActive/Roxid, Basel, Schweiz). Ingreppen gjordes vid SU/Sahlgrenska i Göteborg under generell anestesi och nasal intubering.

I samband med implantatinstallationen noterades kliniskt en normal benvävnad (figur VI). Borrprotokoll från implantattillverkaren följdes utan avvikelser.

Biopsier från det rekonstruerade området togs med hjälp av ett trepanbör, 3 mm i diameter, för histologisk analys.

Histologi

Histologisk analys genomfördes för undersökning av benkvantitet och benkvalitet. Biopsierna tagna i samband med fixturinstallation fixerades i 4 procent paraformaldehyd (48 timmar) varefter de urkalkades med 10 procent EDTA under fem dagar. Efter röntgenkontroll bäddades preparaten in i paraffin och snittades (snittjocklek 5–8 µm). Snitten färgades med hematoxyllin-eosin och undersöktes därefter i ett Nikon Eclipse 50i (Bergström Instrument, Stockholm, Sverige) utrustat med program för histomorfometri. Snitten undersöktes och fotograferades i varierande förstoringar x1–x40.

Godkänd pilotstudie

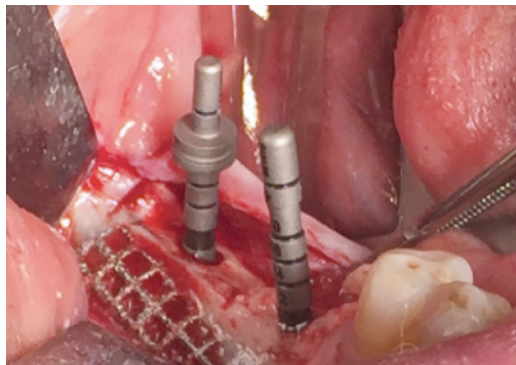
Denna kliniska pilotstudie på människa är godkänd av Finska Säkerhets- och utvecklingscentret för läkemedelsområdet, Fimea, Dnr 615/11.01.06./2010.

PRELIMINÄRA RESULTAT OCH DISKUSSION

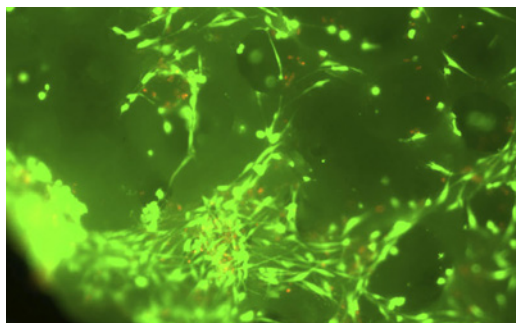
De postoperativa faserna förflöt i båda fallen utan komplikationer. Kliniska och radiologiska kontroller var helt igenom utan anmärkningar.

Stamceller från fettvävnad odlade i autologt serum uppvisade spindelliknande form (figur VII) vilket indikerar vitalitet och proliferation, och i båda fallen konstaterades en cellöverlevnad på > 90 procent. Differentiering av ASC mot benbildande celler *in vitro* kunde påvisas i cellkulturerna från båda patienterna med ALP, både i kombination med biomaterialet (β-TCP) och utan. Vidare noterades att ASC adhererar till, och prolifererar på, de tredimensionella β-TCP-partiklarna. Liknande resultat har observerats i tidigare publicerade studier [6, 16]. Det förefaller vidare som att ASC överlever också i relativt låg syresättning, vilket är en förutsättning för cellöverlevnad då blodflödet är lågt.

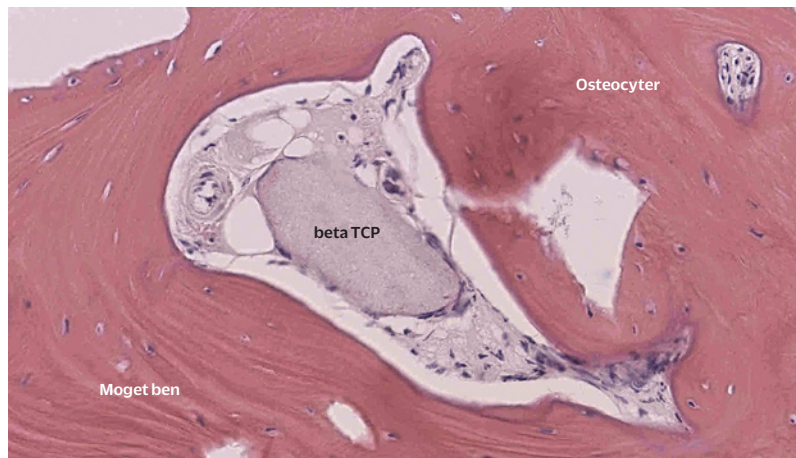
Rekonstruktionsplattor i titan valdes i båda fallen för att stabilisera mandibeln och för patient 2 även i form av ett nät för att hålla implantatet av benbildande stamceller och β-TCP på plats. Detta mot bak-



Figur VI. Installation av dentala implantat i ben bildat av benceller som odlats fram ur fettvävnad på patienten.



Figur VII. Fluorescensmikroskopi från cellkultur på patient 2. Levande celler fluorescerar grönt och döda celler rött.



Figur VIII. Benbiopsi från nybildat ben. x20 Htx-eosin. Visar vitalt ben under remodelering och enstaka β-TCP-partiklar.

grund av att titan är väl utprovat och dokumenterat i liknande situationer [17] och tolereras väl av både hård- och mjukvävnad utan tecken till inflammation eller avstötning. I fall 1 användes ett resorberbart nät av PLA/PGA, som också har en gedigen dokumentation, men som i djurförsök gett upphov till en relativt kraftig inflammation under nedbrytningsprocessen [18], vilket dock inte noterades i detta fall.

Vid den histologiska utvärderingen av resultatet kunde man i båda fallen se ett moget lamellärt ben, och rikligt med sekundära osteon indikerade en normal benmetabolism (figur VIII). Rester av β-



”Preliminära resultat så här långt är lovande ... Metoden är dock tidskrävande och kostsam.”

TCP kunde ses i några av snitten, men en majoritet av biomaterialet föreföll resorberat och ersatt med kroppsegen benvävnad.

De två patienter som redovisas i denna fallbeskrivning fick samma typ av GMP-klassade (Good Medical Practice) autologa stamceller som tidigare presenterats av Mesimäki och medarbetare [15]. I de här presenterade fallen föregicks dock inte implantationen av nybildat ektopiskt ben, det vill säga ben som bildats på annan plats i organismen. I stället placerades stamceller och β -TCP direkt i en bendefekt i behov av regeneration. Detta operationsprotokoll har tidigare presenterats som *In situ bone formation* [15, 19].

Den nödvändiga läkningstiden före belastning, i form av till exempel installation av titanimplantat tänkta att bära en protetisk brokonstruktion, är i dagsläget inte känd. I de föreliggande fallen valdes läkningstid enbart baserat på radiologisk mineraliseringsgrad av det nybildade benet. En torque (vridmotstånd) på > 35 Ncm kunde uppmätas vid samtliga fyra implantatinstallationer, indikerande en utmärkt primär stabilitet hos implantaten, och förenligt med ett moget ben.

Kommande kliniska och experimentella studier syftar till att svara på hur lång läkningstiden behöver vara samt om en kombination med BMPs är nödvändig för differentiering av stamceller från fettvävnad till benbildande celler.

KONKLUSION

- Defekter i mandibeln på två patienter rekonstruerades med autologt ben utvunnet ur stamceller från patienternas egen fettvävnad.
- Differentiering och cellvitalitet avseende benproducerande celler kunde bekräftas före reimplantation.
- Nybildat moget käkben kunde konstateras histologiskt, radiologiskt och kliniskt.
- Installation av implantat med god primärstabilitet kunde göras efter cirka ett år.

KLINISK RELEVANS

Preliminära resultat så här långt är lovande och metoden bedöms ha stor klinisk relevans för de få patienter som inte kunnat rekonstrueras med fria bentransplantat eller benersättningsmedel. Metoden är dock tidskrävande och kostsam. ●

Referenser

1. Pogrel MA, Podlesh S, Anthony JP et al. Comparison of vascularized and non-vascularized bone grafts for reconstruction of mandibular continuity defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1200–6.
2. Goh BT, Lee S, Tideman H et al. Mandibular reconstruction in adults. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37: 597–605.
3. Schlipphake H. Revascularized tissue transfer for repair of complex midfacial defects in oncologic patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 1212–8.
4. Hidalgo DA. Fibula free flap: A new method of mandible reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1989; 84: 71–9.
5. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol* 2014; 7 Suppl 2: S203–17.
6. Sándor GK, Tuovinen VJ, Wolff J et al. Adipose stem cell tissue-engineered construct used to treat large anterior mandibular defect: A case report and review of clinical application of good manufacturing practice-level adipose stem cells for bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 2013; 71: 938–50.
7. Hattori H, Sato M, Masuoka K et al. Osteogenic potential of human adipose tissue derived stroma cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 2–12.
8. Lendeckel S, Jodicke P, Christophis P et al. Autologous stem cells and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg* 2004; 32: 370–3.
9. Kulakov AA, Goldshtein DV, Grigoryan AS et al. Clinical study of the efficiency of combined cell transplant on the basis of multipotent mesenchymal stromal adipose tissue cells in patients with pronounced deficit of the maxillary and mandibular bone tissue. *Cell Technol Biol Med* 2008; 4: 522–5.
10. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl* 2008; 23: 197–212. doi: 10.1177/0885328208096798.
11. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893–9.
12. Barr T, McNamara AJ, Sándor GK et al. Comparison of the osteoinductivity of bioimplants containing recombinant human bone morphogenetic protein 2 and 7. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 531–40.
13. Sándor GK, Suuronen R. Combining adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds and growth factors: An overview of tissue engineering. *J Can Dent Assoc* 2008; 74: 167–70.
14. Lappalainen OP, Haapea M, Serpi R et al. Iron-labeled adipose stem cells and neovascularization in rabbit calvarian critical-sized defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016; 121: 104–10.
15. Mesimäki K, Lindros B, Törnwall J et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38: 201–5.
16. Gimble JM, Zvonice S, Floyd ZE et al. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006; 98: 251–66.
17. Tidstrom KD, Keller EE. Reconstruction of mandibular discontinuity with autogenous iliac bone graft graft: Report of 34 consecutive patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 28: 336–46.
18. van der Elst M, Klein CP, de Bleeck-Hogervorst JM, Patka P, Haarman HJ. Bone tissue response to biodegradable polymers used for intra medullary fracture fixation: a long-term in vivo study in sheep femora. *Biomaterials* 1999; 20: 121–8.
19. Sándor GK, Numminen J, Wolff J, Thesleff T, Miettinen A, Tuovinen VJ, Mannerström B, Patrikoski M, Sääpinnen S, Miettinen S, Rautiainen M, Öhman J. Adipose stem cells used to reconstruct 3 cases with cranio-maxillofacial hard tissue defects. *Stem Cell Translat Med* 2014; 3: 530–40.