

Die Rekonstruktion von Knorpel- und Knochendefekten

Untersuchungen zu den strategischen Möglichkeiten des Tissue Engineering

in der Orthopädie

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Orthopädie

vorgelegt dem

Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Carsten Perka

geboren am 04.07.1965 in Cottbus

Präsident: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

eingereicht: 01.08.1999

verteidigt: 17.10.2000

Gutachter:

Prof. Dr. med. B. D. Katthagen

Prof. Dr. med. G. Weseloh

1	Einleitung	5
2	In-vitro-Untersuchungen zum Einsatz differenter Matrixsysteme für die Chondrozytentransplantation	7
2.1	Perka, C., Spitzer, R.S., Lindenhayn, K., Sittinger, M., Schultz, O.: Matrix-mixed culture - a new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. J. Biomed. Mater. Res. 2000; 49: 305-311	8
2.2	Lindenhayn, K., Perka, C., Spitzer, R.S., Heilmann, H.H., Pommerening, K., Mennicke, J., Sittinger, M.: Retention of hyaluronic acid in alginate beads: Aspects for in vitro cartilage engineering. J. Biomed. Mater. Res. 1999; 44: 149-155	10
2.3	Haisch, A., Schultz, O., Perka, C., Jahnke, V., Burmester, G.R., Sittinger, M.: Tissue-engineering humanen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung biokompatibler resorbierbarer Fibringel- und Polymervliesstrukturen. HNO 1996; 44: 624-629	11
3	Dreidimensionale Systeme zur Kultivierung periostaler Zellen	12
3.1	Spitzer, R.S., Perka, C., Lindenhayn, K.: In vitro cultivation of rabbit and porcine periosteal cells in matrix-mixed cultures for bone replacement. In: H. Stein, Se-II Suk, Ping-Chung Leung, K.-G. Thorngren, W. Akeson, ed., SIROT 99, Tel Aviv, Freund Publishing House Ltd., 1999	13
3.2	Redlich, A., Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R.S., Häupl, T., Burmester, G.R., Sittinger, M.: Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. J. Mater. Sci.: Materials in Medicine 1999; 10: 767-772	14
4	Ergebnisse der Chondrozytentransplantation in unterschiedlichen Tiermodellen	16
4.1	Sittinger, M., Perka, C., Schultz, O., Häupl, T., Burmester, G.R.: Joint cartilage regeneration by tissue engineering. Z. Rheumatol. 1999; 58: 130-135	17
4.2	Perka, C., Schultz, O., Sittinger, M., Zippel, H.: Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. Orthopäde 2000; 138: 39-45	18

4.3	Perka, C., Spitzer, R.S., Lindenhayn, K., Sittinger, M.: Tissue engineered repair of full-thickness articular cartilage defects using allogenic chondrocytes. In: H. Stein, Se-II Suk, Ping-Chung Leung, K.-G. Thorngren, W. Akeson, ed., SIROT 99, Tel Aviv, Freund Publishing House Ltd., 1999	19
4.4	Perka, C., Schultz, O., Lindenhayn, K., Spitzer, R.S., Muschik, M., Sittinger, M., Burmester, G.R.: Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin-matrices. Clin. Exp. Rheumatol. 2000; 18: 13-22	20
4.5	Perka, C., Sittinger, M., Schultz, O., Spitzer, R.S., Schlenzka, D., Burmester, G.R.: Joint cartilage repair using cryopreserved and non-cryopreserved chondrocytes. Clin. Orthop. 2000; 378: 245-254	21
5	Verwendung multipotenter mesenchymaler Zellen zur Rekonstruktion von Gelenkknorpeldefekten	22
5.1	Perka, C., Lindenhayn, K., Heilmann, H.-H., Sittinger, M., Muschik, M.: Experimentelle Untersuchungen mechanisch induzierter Gelenkknorpeldefekte nach Implantation allogener embryonaler Chondrozyten in einem Kollagen-Fibrin-Gel beim Huhn. Z. Orthop. 1996; 134: 562-572	23
5.2	Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R.S., Lindenhayn, K.: The influence of transforming growth factor β 1 on mesenchymal cell repair of full-thickness cartilage defects. J. Biomed. Mater. Res. 2000; 52: 543-552	24
6	Die Rekonstruktion von Knochendefekten mittels Tissue Engineering	25
6.1	Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R.S., Lindenhayn, K., Burmester, G.R., Sittinger, M.: Segmental Bone Repair by Tissue Engineered Periosteal Cell Transplants with Bioresorbable Fleece and Fibrin Scaffolds in Rabbits. Biomaterials 2000; 21: 1145-1153	26
7	Diskussion	27
7.1	Knorpeltransplantation	27
7.2	Knochenrekonstruktion	30
7.3	Ausblick auf weitere Einsatzmöglichkeiten des Tissue Engineering	33
8	Zusammenfassung	35

1 Einleitung

Die effiziente Regeneration von Knorpel und Knochen stellt eine der größten Herausforderungen des neuen Jahrtausends für die Orthopädie dar. Im Mittelpunkt steht dabei die Erforschung der molekularen Basis der Morphogenese des Skeletts in der Phase der embryonalen Entwicklung und der bei der Initiierung und Regulation der Gewebsformationen ablaufenden Prozesse [80].

Der Knorpel bildet dabei ebenso wie der Knochen ein homöostatisches System, welches durch lokale, systemische und biomechanische Faktoren reguliert wird. Die immer komplexere und umfassendere Wiederholung der sich in der Ontogenese abspielenden Vorgänge ist Gegenstand der Forschung auf dem Gebiet des Tissue Engineering. Das prinzipielle methodische Vorgehen ist für alle Gewebsarten vergleichbar. Nach der initialen Entnahme einer Probe des zu ersetzenden Gewebes erfolgt die Isolierung der Zellen aus ihrer Matrix. Danach werden die Zellen in einer Monolayerkultur vermehrt und anschließend in einer für die Gewebsentwicklung spezifischen Matrixstruktur kultiviert.

Unterschiedliche Definitionen existieren für das Tissue Engineering. Die National Science Foundation der USA definierte den Inhalt dieses Forschungsgebietes wie folgt:

„Tissue Engineering is the application of the principles and methods of engineering and the life sciences toward the fundamental understanding of structure/function relationships in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain or improve functions.“ [National Science Foundation, USA 1988]

Für das Tissue Engineering werden sowohl spezifische differenzierte Zellen des zu ersetzenden Gewebes (z. B. Chondrozyten für die Bildung von Knorpel), aber auch undifferenzierte Zellen verwendet. Viele adulte Gewebe enthalten Populationen von Zellen, welche die Fähigkeit zur Regeneration von Geweben nach Trauma, Erkrankung oder infolge von Alterungsprozessen besitzen. So können multipotente Zellen des Knochenmarks oder der Kambiumschicht des Periosts die Regeneration mesenchymaler Gewebe, wie Knochen, Knorpel, Muskel, Sehne, Band oder Stroma, bewirken [25, 41, 77, 99, 123].

Neben der Art der verwendeten Zellen wird die Bildung des Gewebsverbandes aus Zellen in vitro durch

- die Signale, die die Morphogenese initiieren (Wachstumsfaktoren, nutritive Bedingungen),
- die zur Kultivierung verwendete Matrix sowie
- die extrazellulär synthetisierte Matrix

beeinflusst. Untersuchungen zur Optimierung der Kulturbedingungen, insbesondere zu den Zell-Matrix-Interaktionen bei der Züchtung von Knorpel- und Knochengewebe und die Verbesserung der Techniken für die klinische Nutzung der eingesetzten Verfahren sind Gegenstand dieser Arbeit.

2 In-vitro-Untersuchungen zum Einsatz differenter Matrixsysteme für die Chondrozytentransplantation

Das zelluläre Wachstum sowie die Morphologie und die Differenzierung der Zellen werden wesentlich durch die Bedingungen der zellulären Mikroumgebung beeinflusst. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Chondrozytentransplantation ist eine ausreichende Zahl vitaler Zellen in einer die phänotypische Differenzierung fördernden Matrix.

Für die Kultivierung von Chondrozyten ist eine dreidimensionale Matrix notwendig, da nur so die phänotypische Stabilität der Zellen erhalten werden kann [6, 8]. Unterschiedliche Matrixsubstanzen, wie Agarosegel [16, 17], Kollagen [29, 53], Fibrin [43], Alginat [38, 39, 114, 74], Hyaluronsäure [100] und biodegradable Polymere wurden für die Kultivierung der Chondrozyten verwendet [19, 78, 95, 96, 97, 111].

Die optimale Matrix für die Zellkultivierung, insbesondere im Hinblick auf eine potentielle Implantation ist durch folgende Charakteristika gekennzeichnet:

- Erhalt des Phänotyps
- Akkumulationsmöglichkeit der Matrixsubstanzen
- Atoxizität
- Bioresorbierbarkeit
- Biodegradierbarkeit
- ausreichende mechanische Stabilität
- Formvariabilität
- Erhalt der immunologischen Toleranz

Die Matrix dient dabei der mechanischen Stabilisierung, beeinflusst gleichzeitig jedoch die Zellproliferation, den zellulären Phänotyp und die Matrixsynthese durch die Bedingungen der zellulären Mikroumgebung [31, 63, 98, 121]. Sie ist somit für die Herstellung des Knorpeltransplantats, aber auch für die Handhabbarkeit zum Implantationszeitpunkt essentiell. Zudem werden allogene und xenogene Zellen bei der Transplantation vor immunologischen Reaktionen geschützt [1, 27].

2.1 Perka, C., Spitzer, R.S., Lindenhayn, K., Sittinger, M., Schultz, O.: Matrix-mixed culture - a new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. J. Biomed. Mater. Res. 2000; 49: 305-311

Die bisher verwendeten unterschiedlichen Matrixsubstanzen für die Kultivierung von Chondrozyten sind ein Hinweis darauf, daß eine optimale Verbindung bisher nicht gefunden wurde. Das häufig für die Kultivierung verwendete Alginat ist für den Erhalt der Differenzierung der Chondrozyten optimal, jedoch durch die fehlende Biodegradierbarkeit und eingeschränkte Biokompatibilität für die Knorpeltransplantation und damit die In-vivo-Anwendung nicht geeignet.

Alginat ist ein lineares Polysaccharid, welches aus Braunalgen isoliert wird. Dabei handelt es sich um ein Co-Polymer zweier Uronsäuren: L-Guluronic- und D-Mannuronic-säure, die durch Glycoside bei β 1,4 und α 1,4 verbunden sind. In der Gegenwart von divalenten Kationen, wie z. B. Kalzium, geliert das Polymer sofort. Im Vergleich zu anderen Gelen kann jedoch durch die Herauslösung des Kalziums, z. B. durch Zitrat, das Polymer wieder in seine Monomere zerfallen.

Sinnvoll erschien es daher, das Alginat mit einer biodegradierbaren und biokompatiblen Substanz zu mischen, anschließend die Zellen in einem solchen Mischgel zu kultivieren, und unmittelbar vor dem Zeitpunkt der geplanten Transplantation das Alginat herauszulösen. Untersucht wurde die Kombination des Alginats mit Fibrin, da Fibrin als Komponente des Gewebeklebers den oben beschriebenen Anforderungen entspricht und ausreichende Erfahrungen über dessen klinischen und experimentellen Einsatz vorliegen [52, 89, 101]. Die alleinige Verwendung des Fibrins ist aufgrund der schnellen Dedifferenzierung der Chondrozyten nicht möglich [43].

Das Ergebnis der Arbeit zeigt, daß durch die Herstellung einer Matrixmischkultur die Vorteile zweier Substanzen verbunden werden können. Der Erhalt des chondrozytären Phänotyps ist auch bei Kultivierung der Zellen in einem Mischgel aus Alginat und Fibrin möglich. Die im Mischgel durch die Chondrozyten synthetisierten knorpelspezifischen Makromoleküle bilden ein semisoliden Knorpelgewebe mit den spezifischen Zell-Matrix-

Wechselwirkungen unter Erhalt des chondrozytären Phänotyps. Daher bleibt dieses Gel nach Herauslösung des Alginats ausreichend mechanisch stabil und ist für die nachfolgende Transplantation einfach handhabbar.

2.2 Lindenhayn, K., Perka, C., Spitzer, R.S., Heilmann, H.H., Pommerening, K., Mennicke, J., Sittinger, M.: Retention of hyaluronic acid in alginate beads: Aspects for in vitro cartilage engineering. J. Biomed. Mater. Res. 1999; 44: 149-155

Chondrozyten sind durch die Sekretion knorpelspezifischer Moleküle, wie der Kollagentypen II, IX und XI [65], und von aggregierenden Proteoglycanen wie Aggrecan und Decorin, charakterisiert [56]. Nach Kultivierung im Monolayer verlieren Chondrozyten jedoch ihren spezifischen Phänotyp und dedifferenzieren mit der Folge, daß Moleküle synthetisiert werden, die sonst nur in Fibroblasten und Prächondrozyten gefunden werden. Typische Syntheseprodukte dieser Zellen sind die Kollagene I, III, V und das Proteoglycan Versican [124].

Nach Kultivierung solcher dedifferenzierten Zellen in Alginaten konnte gezeigt werden, daß eine Redifferenzierung zu Chondrozyten möglich ist [8]. Werden differenzierte Chondrozyten in Alginaten kultiviert, so behalten sie ihren chondrozytären Phänotyp [36] und exprimieren die Proteoglycane Aggrecan und Decorin [38], Kollagen II [104] und XI [60]. Alginate sind jedoch keine Bestandteile des natürlichen Knorpels. Aus diesem Grund supplementierten wir in der vorliegenden Arbeit das Alginate mit Hyaluronsäure, einem natürlichen Bestandteil der Knorpelgrundsubstanz, und untersuchten die Retention der Hyaluronsäure in unterschiedlichen Alginategelen.

Die Arbeit belegt, daß bei niedrigen Alginatkonzentrationen der größte Teil der neu synthetisierten Matrix in das Medium diffundiert. Die bisher angenommene Möglichkeit der In-vitro-Herstellung einer suffizienten hygroskopischen Knorpelgrundsubstanz ist in diesem System daher nur in sehr geringem Maße möglich. Eine suffiziente Retention der Hyaluronsäure konnte nur mit Alginatkonzentrationen über 1,2 % oder durch Zugabe von Fibrin erreicht werden.

Die Arbeit belegt, daß neben der üblichen Untersuchung des zellulären Phänotyps, der Zellproliferationsrate und der Synthese knorpelspezifischer Makromoleküle, die Akkumulation der neu gebildeten knorpelspezifischen Matrixmoleküle im Transplantat und die Degradation der zur Kultivierung eingesetzten Matrix essentielle Parameter der In-vitro-Untersuchungen zur Herstellung funktioneller Knorpeltransplantate sind.

2.3 Haisch, A., Schultz, O., Perka, C., Jahnke, V., Burmester, G.R., Sittinger, M.: Tissue-engineering humanen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung biokompatibler resorbierbarer Fibringel- und Polymervliesstrukturen. HNO 1996; 44: 624-629

Für die Herstellung von Knorpeltransplantaten ist die potentielle Implantierbarkeit von höchster Bedeutung. Aus klinischer Sicht sind gelartige oder feste Implantate besser handhabbar als flüssige. Bioresorbierbare Polymere entsprechen diesen Anforderungen und stellen ein supportives zelluläres Mikromilieu für die Chondrozytendifferenzierung dar [93-97, 111-113]. Außerdem erlauben sie eine hohe Formvariabilität der Transplantate sowie eine spezifische Modulation des Gewebegenerationsprozesses durch die Zugabe von morphogenen Faktoren, wie TGF- β (transforming growth factor- β) und BMP's (bone morphogenetic protein).

Die Immobilisierung der Zellen im Polymer während der Phase der Kultivierung, ist jedoch nur durch Zugabe weiterer Substanzen zu erreichen. Die bisher am häufigsten verwendete Low-melting-Agarose ist für den klinischen Einsatz nicht geeignet. Subkutan in dieser Matrix transplantierte Chondrozyten degenerieren schnell [93].

Ziel der vorliegenden Untersuchung war daher, die Immobilisierung der Zellen im Polymer durch die Verwendung eines biokompatiblen Materials zu erreichen. Dazu wurden die Zellen innerhalb des Polymers mit Fibrin vernetzt. Wir konnten nachweisen, daß diese Matrix den Phänotyp der darin befindlichen Chondrozyten erhält. Die im Implantat befindlichen Zellen zeigten eine homogene Verteilung und synthetisieren knorpelspezifische Matrixmoleküle. Auf der Basis der vorliegenden Untersuchungen ist die Herstellung eines vollständig biokompatiblen und biodegradiblen Knorpeltransplantats mit semisolider Struktur und guter Handhabbarkeit bei der Implantation möglich.

3 Dreidimensionale Systeme zur Kultivierung periostaler Zellen

Die Behandlung von Knochendefekten und Pseudarthrosen wird durch die teilweise unzureichenden therapeutischen Optionen limitiert. Der sogenannte "gold standard" ist das autologe Knochentransplantat. Es besitzt eine optimale immunologische Toleranz und biologisch aktive Wachstumsfaktoren, welche die knöcherne Regeneration beschleunigen. Andererseits ist autologer Knochen nur begrenzt verfügbar. Zudem sind die Morbidität an der Entnahmestelle und die Devitalisierung des Transplantats, abgesehen von gefäßgestielten Knochenspänen zu berücksichtigen.

Dagegen sind allogene Knochenmaterialien ausreichend vorhanden und verursachen keine zusätzliche Morbidität an der Entnahmestelle. Die Nachteile dieser Transplantate sind in einem höheren Risiko der Infektionstransmission, der immunologischen Rejektion bzw. der infolge der vorangegangenen Temperaturbehandlung weitestgehenden Avitalität zu sehen. Der in vivo dann einsetzende Reparatursprozeß geht dadurch immer mit einer stabilitätsmindernden Resorption des Implantats einher. Der Zeitraum bis zur knöchernen Konsolidierung des Defektes erfordert so oftmals eine langdauernde Entlastung des betroffenen Körperteils.

Das Tissue Engineering von Knochen auf der Basis von mesenchymalen Stammzellen ist ein vielversprechender neuer Therapieansatz [46]. Der wesentliche Vorteil gezüchteter Knochentransplantate besteht darin, daß durch die Amplifikation und nachfolgende Kultivierung der Zellen ein autologes und auch vitales Transplantat zur Verfügung steht. Der Nachteil sonstiger autologer Knochentransplantate, die limitierte Verfügbarkeit, entfällt durch die Möglichkeit der Zellvermehrung in vitro. Auch die Morbidität an der Entnahmestelle kann weitestgehend vernachlässigt werden, da die Gewinnung der Zellen lediglich eines minimalen Zugangs bedarf.

Für die Herstellung gezüchteter Knorpeltransplantate sind mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks und des Periosts am besten geeignet. Dabei ist es das Ziel, die Heilungsprozesse des Knochens bei Frakturen nachzuahmen. So bilden bei der enchondralen Ossifikation pluripotente mesenchymale Zellen vor allem aus der Kambiumschicht des Periosts in Kombination mit Osteoblasten und der Matrix den initialen Frakturkallus [42, 109].

3.1 Spitzer, R.S., Perka, C., Lindenhayn, K.: In vitro cultivation of rabbit and porcine periosteal cells in matrix-mixed cultures for bone replacement. In: H. Stein, Se-Il Suk, Ping-Chung Leung, K.-G. Thorngren, W. Akeson, ed., SIROT 99, Tel Aviv, Freund Publishing House Ltd., 1999

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Modifikation des Kulturmediums selektiv die Expression des chondrogenen oder des osteogenen Phänotyps mesenchymaler Zellen begünstigt [76]. Eine chondrogene Differenzierung wird z. B. durch die Zugabe von TGF- β [49, 68] gefördert. Stimulanzen für eine osteogene Differenzierung sind Prostaglandin-E2 [35], BMP2 [48], Dexamethason [59] und β -Glycerophosphat [106].

Aufgrund ihrer osteokonduktiven Eigenschaften werden Trikalziumphosphate mit gutem klinischen Erfolg für den Ersatz von Knochendefekten in der Orthopädie verwendet [62]. Erste Untersuchungen in Zellkulturen zeigen, daß auch in vitro die Expression osteogener Marker gefördert wird [26]. Zudem besitzen Keramiken, wie für das Hydroxylapatit nachgewiesen, einen mitogenen Effekt [22].

Ziel der vorliegenden Untersuchung war festzustellen, inwieweit Fibrin als biokompatibles und biodegradibles Material als Trägersubstanz für periostale Zellen geeignet ist und diese unter den gegebenen Kulturbedingungen knochenspezifische Matrixprodukte bilden. Nachfolgend war dann, der Einfluß des Zusatzes von α -Trikalziumphosphat auf die Syntheserate dieser Moleküle zu untersuchen.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß periostale Zellen in Fibrinbeads in vitro einen osteoblastischen Phänotyp ausbilden. Spezifische Marker wie die alkalische Phosphatase und das Osteocalcin konnten nachgewiesen werden. Nach dem Zusatz von α -Trikalziumphosphat wurde eine Steigerung des DNA-Gehalts der Kultur und der Osteocalcinsynthese beobachtet. Neben den gewählten osteogenen Kultivierungsfaktoren (Zusatz von Ascorbinsäure, Dexamethason und β -Glycerophosphat) ist eine weitere Steigerung der Synthese knochenspezifischer Matrixmoleküle somit durch den Zusatz von α -Trikalziumphosphat möglich.

3.2 Redlich, A., Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R.S., Häupl, T., Burmester, G.R., Sittinger, M.: Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. J. Mater. Sci.: Materials in Medicine 1999; 10: 767-772

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Technik der In-vitro-Herstellung eines präossären Gewebes aus periostalen Zellen in bioresorbierbaren Polymeren (Polyglycol-Polylactidsäure/Polydioxanon). Entsprechend der Kultivierung von Chondrozyten-transplantaten ist die Möglichkeit, durch die Form der verwendeten bioresorbierbaren Polymere die äußere Gestalt des späteren Transplantats vorgeben zu können, für den späteren klinischen Einsatz von großer Bedeutung.

Für die Verwendung periostaler Zellen für das Bone Engineering sprechen mehrere Faktoren:

- Periostale Zellen bilden sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch während der Frakturheilung Knochen [42, 109].
- Periostale Zellen behalten ihr osteochondrogenes Potential auch nach längerer Kultivierung, wie nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse nachgewiesen wurde [70].
- Das osteogene Potential periostaler Zellen ist auch bei älteren Individuen nachgewiesen und bleibt während des gesamten Lebens erhalten [54].
- Knochenzellen, wie Osteoblasten und Osteozyten sind schwer in ausreichender Zahl zu kultivieren, so daß viele Untersuchungen mit fetalen oder neonatalen Zellen durchgeführt wurden [35, 112].

In Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, daß periostale Zellen einfach und in ausreichender Menge auch bei älteren Patienten zu entnehmen sind. Dagegen ist die Gewinnung einer adäquaten Zahl von multipotenten mesenchymalen Zellen des Knochenmarks im höheren Spenderalter nur schwer zu realisieren. Insbesondere die zunehmende Zahl älterer Patienten, z. B. mit periprothetischen Knochendefekten um gelockerte Endoprothesen, bedarf jedoch einer effizienteren Strategie des Knochenersatzes.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß periostale Zellen auf bioresorbierbaren Polymeren sehr gut für das Bone Engineering geeignet sind. Die immunhistochemische und die histologische Untersuchung weisen deutlich die Formation eines unkalzifizierten Knochengewebes nach. Daraus ist zu schlußfolgern, daß mit dem verwendeten Versuchsaufbau die Ex-vivo-Herstellung eines präossären Transplantats mit vielfältigen klinischen Einsatzmöglichkeiten realisierbar ist.

Abb. 1: Phasenkontrastmikroskopisches Bild periostaler Zellen in einer Alginate-Fibrin-Matrix (x 100)