

Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Möglichkeiten und Grenzen

J. Bujia

Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten (Direktor: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer) der Ludwig-Maximilians-Universität München

Zusammenfassung

In der rekonstruktiven Chirurgie des Kopf-Hals-Bereichs besteht ein großer Bedarf an Knorpeltransplantatmaterial, welches autolog meist nur durch einen Zusatzeingriff gedeckt werden kann. Der Versuch einer Züchtung einer ausreichenden Menge von autologem Knorpel liegt somit nahe und stellt eine Herausforderung für die Zellbiologie dar. Diese Züchtung erfordert nach der Entnahme kleiner Knorpelpartikel als ersten Schritt eine möglichst umfassende Vermehrung der Zellen in Monolayerkultur. Danach werden die Zellen in dreidimensionale Kultursysteme eingebracht, wobei die Synthese einer neuen Knorpelmatrix erfolgen soll. Dafür können resorbierbare Polymervliese als Trägermaterial und ein geeignetes Perfusionskultursystem erfolgreich eingesetzt werden. Die Chondrozyten behalten in diesem Kultursystem ihre morphologischen und phänotypischen Eigenschaften. Nach der Transplantation in die Nacktmaus entstand ein phänotypischer knorpelähnlicher Gewebeverband. Die Experimente zeigen ein interessantes Modell zur In-vitro-Herstellung von transplantierbarem autologem Knorpelgewebe.

Schlüsselwörter

Gewebezüchtung – Knorpeltransplantation

In vitro Engineering of Autologous Cartilage Tissue for Reconstructive Surgery: Possibilities and Limitations

The engineering of cartilage tissue in vitro for transplantation requires new concepts in cell culture technology. In this study a new approach is presented for an in vitro formation of cartilage transplants. First isolated chondrocytes obtained from a cartilage biopsy have to be substantially increased using monolayer culture systems. In contrast to cell amplification, the development of cartilage depends on a three-dimensional arrangement of cells and the formation or synthesis of an appropriate extracellular matrix. Bioresorbable polymer fleeces of polyglycolic acid and polylactic acid can be used as temporary cell carrier matrices to establish three-dimensional cultures of human chondrocytes. Furthermore, a perfusion culture system to provide a constant supply of nutrient into the cultures is also advantageous. With the described culture procedure, the chondrocytes maintained a differentiated phenotype showing a synthesis of new cartilage matrix. After transplantation in nude mice the pieces of solid cartilage are not resorbed or rejected and remain intact. The experiments demonstrate a promising pathway for in vitro engineering of vital tissues suitable to be used as autologous transplants in reconstructive surgery of the head and neck.

Key words

Tissue engineering – Cartilage transplantation

Einführung

Die heute zur Verfügung stehenden Knorpeltransplantate sind mit verschiedenen Problemen behaftet (23). Autologes Material, das aus immunologischer Sicht vorteilhaft ist, steht ohne Zusatzeingriff meist nicht zur Verfügung, wenn man von Nasenseptum- oder Ohroperationen absieht. Allogene Transplantatgewebe stellen Probleme hinsichtlich der Antigenität, der Infektiosität, der Konservierung und der Gewebevitalität dar. Kunststoffimplantate sind hinsichtlich der Kompatibilität und der Implantatverankerung problematisch. Einen völlig neuen Ausweg aus diesem Dilemma könnte eine gezielte Züchtung von autologen Transplantaten eröffnen.

Ziel einer Zellkulturtechnik zur In-vitro-Herstellung von Geweben ist es, geeignete definierte Umgebungsbedingungen für isolierte Zellen herzustellen, um die Vitalität, die Funktionen und das Wachstum von Zellen zu erhalten. Die Kenntnisse von herkömmlichen Zellkulturen lieferten die theoretischen Voraussetzungen, um in vitro defekte Gewebe bzw. Organe zu rekonstruieren und dann zu transplantieren. Beispiele hierfür sind die In-vitro-Herstellung von endothelialisierten Gefäßprothesen (37), sowie von Hauttransplantaten (22).

Die Knorpelzüchtung für Transplantationszwecke erfordert als ersten Schritt die Möglichkeit, vitale Zellen aus Spendergeweben zu isolieren. Daran anschließend muß aus diesem Material eine möglichst umfassende Vermehrung der Zellen gewährleistet werden. Danach sollen die Zellen in dreidimensionale Kultursysteme eingebracht werden, wobei die Synthese einer neuen Gewebearchitektur in gleichsam physiolo-

gischer Weise erfolgen soll (Abb. 1). Die Wahl geeigneter Kulturbedingungen und Trägersubstanzen ist hierbei von entscheidender Bedeutung.

Optimierung der Kulturtechnik

Voraussetzung für die Herstellung eines dreidimensionalen Zellgewebes ist eine ausreichende Zellzahl, um das benötigte Gewebevolumen mit der gewebetypischen Zelldichte auszufüllen. Zu diesem Zweck müssen in einem ersten Schritt die isolierten Zellen im Monolayer-Kultursystem vermehrt werden. Dabei werden die Chondrozyten aus den Knorpelbiopsien mittels einer enzymatischen Behandlung herausgelöst und in einem geeigneten Kulturmedium suspendiert (5). Anschließend werden die Zellen in Kulturgefäßen aus Polystyren weiterkultiviert.

Eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß eine 100- bis 100 000fache Vermehrung von gewonnenen Chondrozyten aus kleinen Knorpelbiopsien erreicht werden kann (Abb. 2). Die ermittelte Zellvermehrung war ausreichend, um aus kleinen Gewebeproben (z. B. 100 mm³) wesentlich größere Transplantate (z. B. 10 cm³ und mehr) für chirurgische Zwecke herzustellen. Dabei konnten auch keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Alters und des Geschlechts der Patienten im Vermehrungspotential der gewonnenen Chondrozyten gefunden werden.

Das Hauptproblem der Monolayerkultur ist gekennzeichnet durch das Phänomen der Dedifferenzierung, d. h. der Verlust ihrer morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften (36). Die Chondrozyten verlieren schon nach wenigen Tagen ihre runde Form und nehmen fibroblastenartige Gestalt an. Biochemische Untersuchungen zeigen, daß die Synthese des knorpelspezifischen Kollagen Typ II abgeschaltet wird. Stattdessen produzieren die Zellen große Mengen des völlig knorpeluntypischen Kollagen Typ I. Gründe für den Dedifferenzierungsprozeß sind vermutlich die Anheftung der Zellen an ein ungeeignetes Substrat, eine ungeeignete Mediumversorgung, das flächenhafte Zellwachstum und die fehlende Ausbildung einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix.

In einem zweiten Schritt der Gewebeerstellung müssen die vermehrten Knorpelzellen in einen neuen Gewebeverband gebracht und anschließend zu Chondrozyten mit typischen Eigenschaften zurückdedifferenziert werden. *Benya* u. *Schaffer* (3) beobachteten, daß in Agarose eine Redifferenzierung von zuvor dedifferenzierten Chondrozyten hinsichtlich Zellform und Kollagensynthese möglich ist. Damit war bewiesen, daß durch Veränderungen der Kulturbedingungen der Phänotyp von Chondrozyten gesteuert werden kann. Eine Kultur der Zellen mittels einer Gel-ähnlichen Matrix, wie z. B. Agarose, um eine dreidimensionale Zellanordnung zu erzielen, verhindert Veränderungen des Chondrozytenphänotyps. Dabei wird außerdem die Proliferation gehemmt und die Ausbildung einer gewebetypischen Matrix im zellnahen Raum gefördert (6).

Um bei der Gewebeerstellung eine dem Knorpel entsprechende Zelldichte zu erreichen, müssen große Mengen an Zellen zusammengebracht werden. In den üblichen Kulturschalen wird bei dieser relativ hohen Zellkonzentration das Kulturmedium rasch verbraucht. Diese Situation konnte durch Verwendung eines Perfusionskultursystems verbessert werden

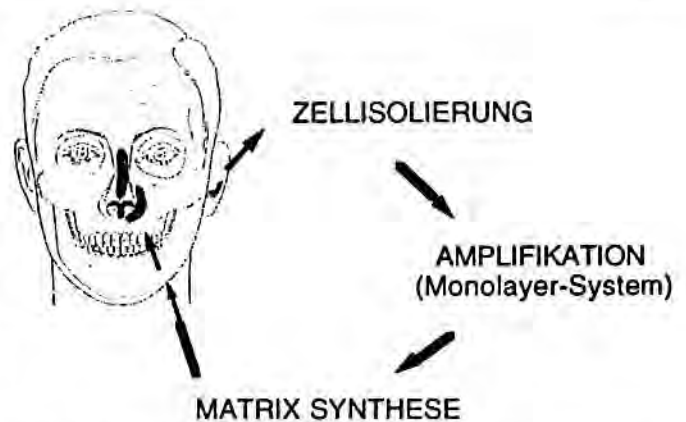


Abb. 1 Konzept der In-vitro-Herstellung von autologen Knorpeltransplantaten mit Hilfe des "Tissue-Engineering". Aus einer kleinen Knorpelbiopsie werden zunächst Knorpelzellen isoliert und in ausreichender Menge im Monolayer vermehrt (Amplifikationsphase). Anschließend stellen die Zellen unter entsprechenden In-vitro-Bedingungen (dreidimensionales Kultursystem) eine extrazelluläre Matrix her.

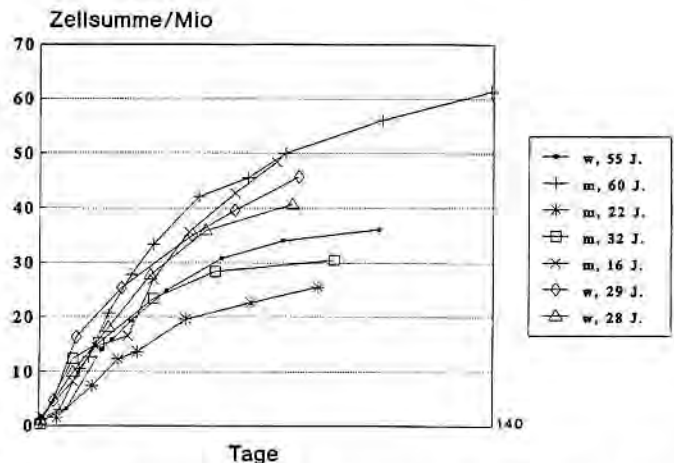


Abb. 2 Zellvermehrung in der Monolayerkultur. Die Chondrozyten wurden aus Knorpelpartikeln aus dem Nasenseptum von sieben Patienten isoliert und in Kulturflaschen vermehrt (Kulturmedium: DMEM + 20% FCS). w = weiblich, m = männlich, J = Lebensalter. Es zeigen sich keine wesentlichen Alters- und Geschlechtsunterschiede im Vermehrungspotential der gewonnenen Chondrozyten.

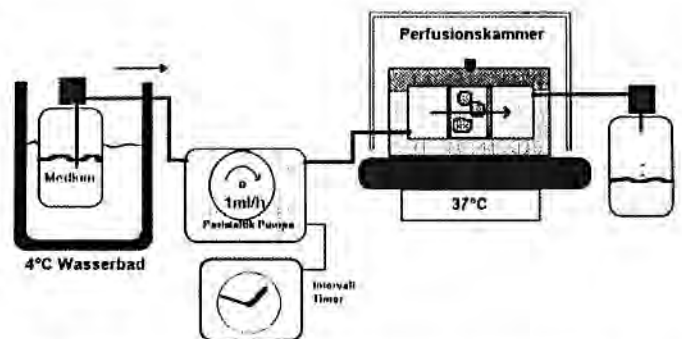


Abb. 3 Perfusionskultursystem: Mediumreservoir in 4 °C Wasserbad, 37 °C Inkubatorplatte mit Abdeckung, Kammer mit Siebeinsätzen und Vliesstruktur, Kassettenschlauchpumpe mit Intervallbetrieb, Auffangbehälter. Die Pumpe wird mit einem Fluß von 1 ml/h in dreißigminütigen Pumpintervallen betrieben.

(Abb. 3). Dabei wird aus einem gekühlten Mediumreservoir mit Hilfe einer langsamen Peristaltikpumpe über eine Zufuhrleitung frisches Nährmedium durch die Perfusionskulturkammer gepumpt. Über einen Ablaufschlauch wird verbrauchtes Nährmedium zu einem Auffangbehälter transportiert (9, 29, 31).

Schließlich können Wachstumsfaktoren eingesetzt werden, um sowohl die Zellvermehrung während der Amplifikationsphase als auch später die Matrixsynthese während der dreidimensionalen Kultur zu beschleunigen (10, 12).

Anforderungen an geeignete Zellträgermaterialien

Bei der dreidimensionalen Zellkultur soll das geeignete Trägermaterial vorübergehend, d. h. während der Matrixsynthese, zur Stabilisierung der Zellen dienen. Um eine Verformung und rasche Einsatzmöglichkeiten zu gewährleisten, sollte es eine gewisse mechanische Stabilität besitzen. Weiterhin soll es ein minimales Fremdvolumen anbieten, damit sich eine neue interzelluläre Matrix ungehindert entwickeln kann und die negativen Wirkungen beim Zerfall des Biomaterials minimiert werden (Tab. 1).

Voruntersuchungen mit Agarose zeigten, daß es eine Differenzierung der Knorpelzellen begünstigt und eine Matrixsynthese ermöglicht (6). Leider besitzt Agarose jedoch nicht die gewünschten Eigenschaften, um insbesondere den mechanischen Ansprüchen eines Knorpelersatzes gerecht zu werden. Neben Gelen sind insbesondere noch Fasern, gewebte Strukturen, ungewebte Vliese, sowie poröse Mikrostrukturen als mögliche Zellträger denkbar (15). Eine regellose aber gleichmäßig dichte Anordnung feinsten resorbierbarer Fasern mit weitgehender mechanischer Stabilität eignet sich am besten zur Herstellung eines dreidimensionalen Zellverbundes. Chondrozyten wurden auf zerkleinerte resorbierbare Fäden ausgesät und erfolgreich in Nacktmäuse zur Knorpelbildung transplantiert (34). Vliesstrukturen besitzen gegenüber diesen gebündelten Fäden zahlreiche Vorteile. Sie besitzen bereits als Trockenstruktur eine gewisse Zug- und Druckfestigkeit und sind außerdem elastisch und damit formstabil. Weiterhin bieten sie eine maximale Materialoberfläche zur Anheftung der Zellen und eine hohe räumliche Homogenität. Eine besondere Schwierigkeit bei der Suche nach einem geeigneten Zellträger besteht darin, daß die resorbierbaren Materialien kaum als Vliesstruktur in der Industrie erhältlich sind.

Bei der Verwendung eines Biomaterials steht jeweils auch dessen Interaktion mit dem Gewebe oder den Zellen im Vordergrund (30). Bei der phänotypischen Entwicklung von Zellen und einer neusynthetisierten Matrix ist es notwendig, daß die Zellen bei der Anheftung auf die Fasern die runde Form behalten (Abb. 4). Eine flächige Ausbreitung auf den Fasern würde zu einem dem Monolayer ähnlichen Zellverhalten führen und damit eine Dedifferenzierung verursachen.

Weiterhin kann das Anheften der Zellen beschleunigt werden, nachdem die Fasern mit Adhäsionsfaktoren beschichtet werden (32). Bei eigenen Experimenten erwies sich Poly-L-Lysin als Adhäsionsfaktor effektiver als andere im menschlichen Organismus vorkommende Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Kollagen Typ II, Fibronectin, Laminin und Vitronectin (Abb. 5).

Tab. 1 Anforderungen an ein Trägermaterial.

Biokompatibilität	
Bioresorbierbarkeit	
Strukturelle Eigenschaften:	Hohe Formstabilität
	Maximale Materialoberfläche
	Minimales Materialvolumen
	Hohe räumliche Homogenität



Abb. 4 Auf den Fasern einer Vliesstruktur haftende Chondrozyten. Vliese sind ungewebte Strukturen mit einer regellosen Anordnung der Fasern. Die Abbildung zeigt, daß die Chondrozyten homogen verteilt sind und in einer ungestreckten Zellform an den Fasern haften. Rasterelektronenmikroskopie. Vlies Ethisorb 200 (Ethicon, D-Norderstedt). Balken = 20 µm.

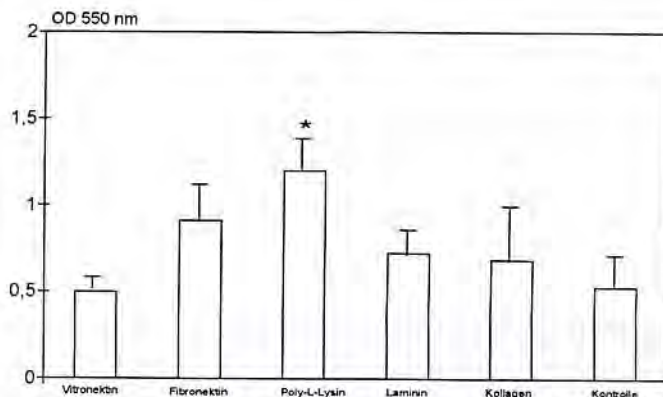


Abb. 5 Quote der Anheftung von humanen Chondrozyten an Polymervliesen. Im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle kam etwa die zweifache Zellzahl an mit Poly-L-Lysin beschichteten Vliesen zur Anheftung. Die Zellzahl wurde mit dem MTT-Test (33) bestimmt. n = 6. Mittelwert ± SEM, *p < 0,05 vs. Kontrolle.

Wie bereits erwähnt, soll das Vlies vorübergehend zur Stabilisierung der Zellen dienen. Dies setzt die Verwendung abbaubarer Strukturen voraus. Neben der Abbaubarkeit müssen auch die Körperfreundlichkeit der Struktur sowie deren Zerfallsprodukte berücksichtigt werden. Während der Degradation resorbierbarer Polymervliese aus Polyester werden als Endprodukte Monomere freigesetzt, aus denen sie aufgebaut sind (26, 27, 28). Eigene Untersuchungen konnten zeigen, daß Glykolat (PGA: poly-glycolic acid) und insbesondere Laktat (PLA: poly-lactid acid) in hohen Konzentrationen von Chondrozyten gut toleriert werden (Abb. 6) (13). Vliese aus PLA

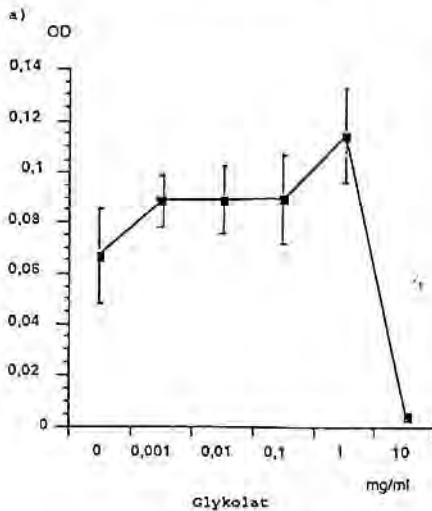
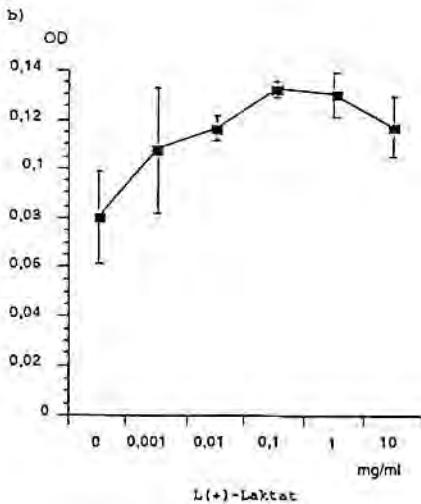


Abb. 6 Kultur von Chondrozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Glykolat und Laktat. Extinktionskurven bei einer optischen Dichte von 550 nm entsprechend der Zellaktivität der Chondrozyten gemessen mit dem MTT-Test. $n = 6$. Mittelwert \pm SEM. n. s. Zwischen 1 und 10 mg/ml Glykolat ist ein deutlich starker Abfall der Zellvitalität zu erkennen.



oder PGA bieten sich daher für die Knorpelzüchtung als besonders geeignet an.

Bioengineering von Knorpel

Um artifizielle Knorpeldefekte zu reparieren, hat man versucht, die Läsionen mit unterschiedlichen autologen ontogenetisch verwandten Geweben zu füllen. Die Erfolgsraten waren jedoch enttäuschend gering, da überwiegend Faserknorpel gebildet wurde (25). Versuche mit isolierten allogenen Chondrozyten, diese mit und ohne vorherige Kultivierung zu transplantieren, waren nur teilweise erfolgreich (2). Wesentlich erfolgreicher waren schließlich Gelenkreparaturen mit Hilfe kultivierter autologer Chondrozyten beim Kaninchen (16,18) und Menschen (4). Obwohl die Knorpelreparatur mit autologen Zellen in Form von Emulsionen, die direkt in die Gelenkknorpeldefekte injiziert wurden, relativ erfolgreich verlief, ist die Handhabung im Vergleich zu ganzen Knorpelstücken wesentlich schwieriger. Besser wäre die In-vitro-Herstellung einer leicht zu handhabenden oder modellierbaren gewebeähnlichen Struktur.

Bei der autologen Transplantation mit Hilfe des "Tissue-Engineerings" können zwei Phasen der Transplantatentwicklung unterschieden werden. Als erste Phase kann man die Verformung bzw. Konditionierung des Gewebes in-vitro betrachten. Die zweite Phase hingegen umfaßt die Reifung und Einheilung des Gewebes in-vivo.

Das wichtigste Ziel des "Tissue-Engineerings" ist die In-vitro-Synthese einer neuen interzellulären Matrix. Dazu sind komplexe Aggregationsvorgänge hochmolekularer Strukturen im Raum außerhalb der Zellen notwendig (24). Daher soll die Zellkultur eine Konzentration der sezernierten Matrixmoleküle im Innenraum des Zellgewebes ermöglichen. Dies kann erreicht werden, wenn die Zellpolymergewebe in eine dünne Agarosegelhülle eingeschlossen werden. Gelstrukturen haben die Eigenschaft, größere Moleküle in ihrer Beweglichkeit stark zu hemmen, so daß Matrixbestandteile nur in geringen Mengen in das Nährmedium ausdiffundieren (35). Die neuen Matrixmoleküle werden auf diese Weise innerhalb des Gewebes angereichert.

Wir konnten mit dem obengenannten In-vitro-System die Bildung einer neuen Matrix beobachten (14,31). Die Chondrozyten synthetisierten extrazellulär reichlich sowohl Proteoglykane (Abb. 7 oben) als auch Kollagenfasern (Abb. 7 unten). Nach einer Kulturzeit von acht Wochen entsprach das neusynthetisierte Gewebe morphologisch Knorpelgewebe (Abb. 8). Während der In-vitro-Phase besteht prinzipiell die Möglichkeit, die Gewebeerentwicklung zu steuern, indem über das Perfusionssystem bestimmte Bedingungen und Faktoren, wie z. B. das bone morphogenetic protein (BMP) (20) konstant vorgegeben werden.

Ein weiterer Aspekt ist die Untersuchung der Weiterentwicklung des Zellpolymergewebes. Die Entwicklung des Zellpolymergewebes wurde deshalb zunächst in Nacktmäusen beobachtet. Die morphologische Beurteilung der Transplantate zeigte, daß im Beobachtungszeitraum bis zu 12 Wochen die Zellpolymerintegrate erhalten blieben und makroskopisch und mikroskopisch dem nativen Knorpel ähnelten (Abb. 9). Weiterhin traten während des gesamten Beobachtungszeitraumes weder in der neusynthetisierten Knorpelmatrix noch in den Polymerfasern Kalzifizierungen auf.

Obwohl Knorpelgewebe als „immunologisch privilegiertes“ (17) Gewebe gilt, kommt es gelegentlich selbst bei autologen Knorpeltransplantaten zu Resorptionen und Abstoßungen (7, 19). Diese Gefahr kann auch bei dem neugebildeten Knorpel gegeben sein, da wegen der noch unvollständig ausgebildeten extrazellulären Matrix den Zellen des Immunsystems sonst versteckte antigene Strukturen zugänglich werden. Weitere experimentelle Transplantationen mit längerer Beobachtungszeit werden zeigen, inwieweit eine Einheilung und qualitative Entwicklung der autologen Zell-Polymergewebe gelingt.

Auch nach der Transplantation besteht die Möglichkeit, die Gewebeerbildung zu beeinflussen bzw. zu beschleunigen. Eine interessante Möglichkeit, geeignete Wachstumsfaktoren gezielt in das Zellpolymergewebe zu bringen, bieten "drug release" Modelle (21). Besonders geeignet könnten hier poröse resorbierbare Mikrosphären (1) z. B. aus Polylaktid, mit gebundenen Peptidfaktoren sein.

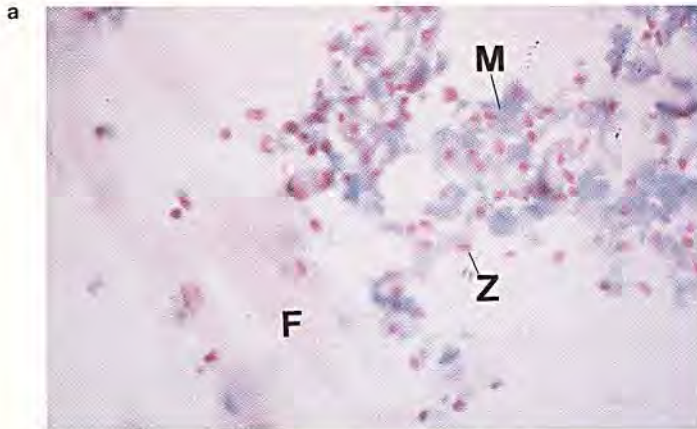


Abb. 7 Die neusynthetisierte interzelluläre Matrix enthält reichlich Proteoglykane (a: oben: blaue Farbe) und Kollagene (unten: b: blaue Farbe). 14 Tage Perfusionkultur. (a: oben: Alcianfärbung; b: unten: Azanfärbung). F = Fasern, Z = Zellkern, M = neusynthetisierte Matrix. Vergrößerung 400 ×.



Abb. 8 Makroskopisches Aussehen nach 3 Wochen in der Perfusionkultur der Zellpolymerstrukturen. Es setzt sich zusammen aus neugebildetem Knorpelgewebe und Vliesresten.

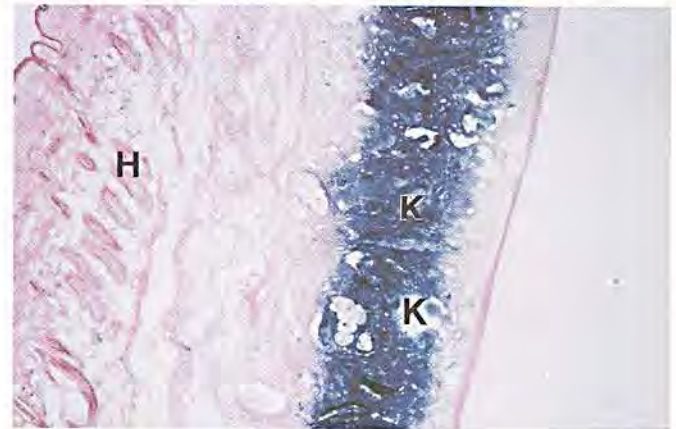


Abb. 9 Gezüchtetes Knorpelgewebe nach 24 Wochen in der Nacktmaus. Das subkutan implantierte Zellpolymerintegrat zeigt Regionen mit einer kollagenhaltigen Interzellulärmatrix (blaue Anfärbung), in dem fortschreitenden Umbau des Transplantates werden die Vliesreste eliminiert. Azanfärbung. H = Haut, K = Kollagen. Vergrößerung 50 ×.

Theoretische-praktische Umsetzung

Wichtigstes Ziel der hier dargestellten experimentellen Bemühungen war die Entwicklung eines Konzeptes zur Schaffung von autologem Gewebe zur Rekonstruktion bzw. „Reparatur“ von Knorpeldefekten beim Menschen. In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, daß in einem dreidimensionalen Kultursystem mit Hilfe eines geeigneten resorbierbaren Trägermaterials und einer konstanten Mediumperfusion eine In-vitro-Herstellung von transplantierbarem menschlichem autologem „Knorpel“-Gewebe möglich ist.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß der Patient zwischen der Entnahme kleiner Teile von autologem Spendermaterial und der Transplantation größerer gezüchteter Knorpelteile mit einem Zeitraum von mehreren Monaten rechnen muß. Allein für die Züchtung ausreichender Zellmengen werden etwa ein bis zwei Monate benötigt. Leider ist derzeit noch kein geeignetes Konzept zur Automatisierung der Zellvermehrung verfügbar, so daß hier mit besonderer Sorgfalt Kontaminationen vermieden werden müssen. Dagegen verläuft die Phase der Gewebekonditionierung in Perfusionkultur bereits relativ sicher und technisch zuverlässig.

Weder die Aufarbeitung der isolierten Zellen noch die Transplantation autologen gezüchteten Knorpelgewebes aus der Perfusionkultur müssen sofort erfolgen, so daß es durchaus möglich ist, die Gewebe zu transportieren oder kurzfristig zu lagern. Hierbei bieten sich aufgrund der Fortschritte in der Zellbiologie und der Zellkulturmethoden sowie der Weiterentwicklung computergesteuerter Einfriergeräte zwei vielversprechende grundsätzliche Wege zu einer erfolgreichen funktionellen und vitalen Konservierung von Geweben an, nämlich die Gewebekultur und die Kryokonservierung. Knorpelgewebe kann mittels konventioneller Gewebekulturtechniken über einen langen Zeitraum erfolgreich vital ohne Verlust der funktionellen Eigenschaften erhalten werden (8). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß sie mit hohem Zeit- und Personalaufwand verbunden ist. Trotz der Erfolge bei der Lagerung isolierter Chondrozyten bei extrem niedrigen Temperaturen (5) führten ähnliche Versuchsansätze bei intaktem Knorpelgewebe bisher nur zu wenig zufriedenstellenden Ergebnissen (11). Die Knorpelpräparation, die Zellvermehrung und die Vlieskultur könnten prinzipiell auch außerhalb der Klinik durchgeführt werden.

Danksagung

Die hier dargelegten Untersuchungen sind Bestandteil der Habilitationsschrift von Dr. Dr. J. Bujia (Ludwig-Maximilians-Universität München). Das experimentelle Vorhaben wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (BU755) gefördert.

Literatur

- 1 *Ammoury, N., M. Dubrasquet, H. Fessi, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, S. Benita*: Indomethacin-loaded poly-DL-lactide nanocapsules: protection from gastrointestinal ulcerations and antiinflammatory activity evaluations in rats. *Clin. Mater.* 13 (1993) 121–130
- 2 *Aston, J. E., G. Bentley*: Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage. *J. Bone Joint Surg. (Br.)* 68 (1986) 29–35
- 3 *Benya, P. D., J. D. Schaffer*: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30 (1982) 215–224
- 4 *Britberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson*: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 889–895
- 5 *Bujia, J., P. Pitzke, E. Wilmes, C. Hammer*: Culture and cryopreservation of chondrocytes from human cartilage: relevance for cartilage allografting in otolaryngology. *ORL* 54 (1992) 80–84
- 6 *Bujia, J., M. Sittinger, P. Pitzke, C. Hammer*: Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *ORL* 55 (1993) 347–351
- 7 *Bujia, J., S. Alsalameh, A. Naumann, E. Wilmes, M. Sittinger, G. R. Burmester*: Humoral immune response against minor collagens type IX and XI in patients with cartilage graft resorption after reconstructive surgery. *Ann. Rheum. Dis.* 53 (1994) 229–234
- 8 *Bujia, J., J. M. Osete, A. Medina, C. Sprekelsen, E. Wilmes, C. Hammer*: Prolonged vital graft preservation using tissue culture methods. *Eur. J. Plast. Surg.* 17 (1994) 20–22
- 9 *Bujia, J., M. Sittinger, C. Hammer, G. Burmester*: Züchtung menschlichen Knorpelgewebes mit Hilfe einer Perfusionskammer. *Laryngorhinootol.* 73 (1994) 577–580
- 10 *Bujia, J., M. Sittinger, E. Wilmes, C. Hammer*: Effect of growth factors on cell proliferation by human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 114 (1994) 539–543
- 11 *Bujia, J., D. Kremer, H. Sudhoff, E. Wilmes*: Determination of the viability of cryopreserved cartilage grafts. *Eur. Arch. Otolaryngol.* Im Druck
- 12 *Bujia, J., P. Pitzke, M. Sittinger, E. Wilmes, C. Hammer*: Effect of growth factors on matrix synthesis of human nasal chondrocytes cultured in monolayer and agar. *Eur. Arch. Otolaryngol.* Im Druck.
- 13 *Bujia, J., D. Reitzel, M. Sittinger*: In-vitro-Züchtung von Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Einfluss von L(+)-Laktat und Glykolat auf kultivierte humane Chondrozyten. *Laryngorhinootol.* Im Druck
- 14 *Bujia, J., M. Sittinger, W. W. Minuth, C. Hammer, E. Kastenbauer*: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* im Druck
- 15 *Cima, L. G., J. P. Vacanti, C. Vacanti, D. Ingber, D. Mooney, R. Langer*: Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J. Biomechanical Engineering* 113 (1991) 143–151
- 16 *Furukawa, T., D. R. Eyre, S. Koide, M. J. Glimcher*: Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J. Bone Joint Surg. Am.* 62 (1980) 79–89
- 17 *Gibson, T., W. B. Davis*: Some further observations on the use of preserved animal cartilage. *Br. Plast. Surg.* 8 (1955) 85–92
- 18 *Grande, D. A., M. I. Pitman, L. Peterson, D. Menche, M. Klein*: The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J. Orthop. Res.* 7 (1989) 208–218
- 19 *Hammer, C., J. Bujia*: Immunologie vitaler und konservierter Transplantate. *Eur. Arch. Otolaryngol. Supp.* 1 (1992) 3–26
- 20 *Hiraki, Y., H. Inoue, C. Shigeno, Y. Sanma, H. Bentz, D. M. Rosen, A. Asada, F. Suzuki*: Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 6 (1991) 1373–1385
- 21 *Hoffman, A. S.*: Immobilization of biomolecules and cells on and within polymeric biomaterials. *Clin. Mater.* 11 (1992) 61–66
- 22 *Iini, P., M. R. Pittelkow*: Autologe Epitheltransplantation mit kultivierten Keratinozyten. *Helv. Chir. Acta* 57 (1990) 519–528
- 23 *Kastenbauer, E. R.*: Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich. *HNO* 31 (1983) 371–380
- 24 *Kimura, Y., Y. Hotta, S. Yasui*: Novel bioresorbable polyesterpolypeptide conjugates. 4th World Biomaterials Congress, Berlin 1992
- 25 *Kon, M.*: Cartilage formation from perichondrium in a weight-bearing joint. An experimental study. *Eur. Surg. Res.* 13 (1981) 387–396
- 26 *Li, S. M., H. Garreau, M. Vert*: Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly-alpha-hydroxy-acids in aqueous media. Part 1: Poly-DL-lactic acid. *J. Mater. Sci. Mat. Med.* 1 (1990) 123–130
- 27 *Li, S. M., H. Garreau, M. Vert*: Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly-alpha-hydroxy-acids in aqueous media. Part 2 Degradation of lactid-glycolide copolymers: PLA37, 5GA25 and PLA75GA25. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 1 (1990) 131–139
- 28 *Li, S. M., H. Garreau, M. Vert*: Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly-alpha-hydroxy-acids in aqueous media. Part 3 Influence of the morphology of poly-L-lactic acid. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 1 (1990) 198–206
- 29 *Minuth, W. W., U. Rudolph*: A compatible support system of cell culture in biomedical research. *Cyto. Technology* 4 (1990) 1881–1889
- 30 *Schaldach, M.*: Verträglichkeit implantatgeeigneter alloplastischer Werkstoffe im Organismus. *Eur. Arch. Otolaryngol. Supp.* 1 (1992) 27–39
- 31 *Sittinger, M., J. Bujia, W. W. Minuth, C. Hammer, G. Burmester*: In vitro formation of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces. *Biomaterials* 15 (1994) 451–456
- 32 *Sommarin, Y., T. Larsson, D. Heinegard*: Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Experimental Cell Research* 184 (1989) 181–192
- 33 *Twentyman, P. R., M. Cuscombo*: A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* 56 (1987) 279–285
- 34 *Vacanti, C. A., R. Langer, B. Schloo, J. P. Vacanti*: Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast. Reconstr. Surg.* 88 (1991) 753–759
- 35 *Verbruggen, G., E. M. Veys, N. Wieme, A. M. Malfait, L. Gijssels, J. Nimmegheers, K. F. Almqvist, C. Broddelez*: The synthesis and immobilisation of cartilage-specific proteoglycan by human chondrocytes in different concentration of agarose. *Clin. Exp. Rheumatol.* 8 (1990) 371–378
- 36 *Von der Mark, K.*: Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatol.* 10 (1986) 272–315
- 37 *Zilla, P., R. Fasol, P. Preiss, M. Kadletz, M. Deutsch, H. Schima, S. Tsangaris, P. Groscurth*: Use of fibrin glue as substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surgery* 105 (1989) 515–522

Dr. Dr. J. Bujia

HNO-Klinik und Poliklinik
Klinikum Großhadern
Marchioninistraße 15
81377 München