

## Züchtung menschlichen Knorpelgewebes in einer dreidimensionalen Perfusionskulturkammer: Charakterisierung der Kollagensynthese

J. Bujá<sup>1</sup>, N. Rotter<sup>1</sup>, W. Minuth<sup>2</sup>, G. Burmester<sup>3</sup>, C. Hammer<sup>4</sup>, M. Sittinger<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Univ. HNO-Klinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. E. Kastenbauer)

<sup>2</sup> Institut für Anatomie, Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. W. Minuth)

<sup>3</sup> Medizinische Universitätsklinik III, Humboldt-Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. G. Burmester)

<sup>4</sup> Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. K. Meßmer)

**Zusammenfassung:** Der große Bedarf an vitalem Knorpeltransplantatmaterial in der rekonstruktiven Chirurgie des Kopf-Hals-Bereiches erfordert die Anwendung moderner Gewebekulturmethoden zur Züchtung von autologen Transplantaten. Ein kürzlich entwickeltes dreidimensionales Perfusionskultursystem stellte die Voraussetzungen zum Erhalt der funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von Chondrozyten in vitro bereit. Ziel der Studie war die Charakterisierung der Kollagensynthese von Chondrozyten unter diesen Bedingungen. Aus gesundem humanem Septumknorpel wurden Chondrozyten enzymatisch isoliert und in Monolayerkultur angezüchtet. Anschließend wurde eine 1%-Zell-Agarose-Suspension hergestellt, die nach ihrer Verfestigung mit einer 3% Agarosehülle umgeben wurde. Diese Kulturen wurden in das Perfusionskultursystem eingebracht und dort über 2 Wochen beobachtet. Es zeigte sich elektronenmikroskopisch die Bildung neuer Kollagenfibrillen. Die Fibrillen konnten immunohistochemisch als Kollagen Typ II identifiziert werden. Durch In-situ-Hybridisierung wurde keine mRNA für Kollagen Typ X nachgewiesen und damit die Entwicklung eines hypertrophischen Phänotyps der Chondrozyten ausgeschlossen. Die Zellen wiesen nur geringe Variationen in Form und Größe auf, die Zellkerne waren rund konfiguriert. Die vorliegenden Ergebnisse erlauben den Schluß, daß unter den angegebenen Kulturbedingungen eine knorpelähnliche Matrix entsteht.

**Schlüsselwörter:** Knorpeltransplantation – Chondrozyten – Dreidimensionale Zellkultur – Elektronenmikroskopie – Immunohistochemie – In-situ-Hybridisierung

*Cultivation of Human Cartilage in a Three-Dimensional Perfusion Chamber: Characterization of the Collagen Synthesis:* In reconstructive head and neck surgery, there is a great need for cartilage transplants. Sufficient autologous graft is often not available. Heterologous cartilage is used frequently, although there is danger of transmitting viral infections and resorption rates are high. We have developed a three-dimensional model for the formation of cartilage in vitro. The aim of this study was to characterize the collagen synthesis under these culture conditions. Human chondrocytes were isolated by digesting septal cartilage matrix in the presence of type II collagenase, hyaluronidase, and Dnase II in Ham's F12 medium. The resulting cells were kept in monolayer culture for one week and then suspended in 2% ultra-low-melting agarose (1:1). The

cell-agarose conglomerate was encapsulated with a 3% ultra-low-melting agarose solution and placed in a perfusion culture chamber. A permanent flow of fresh medium (Ham's F-12 supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid and 2% fetal calf serum) was provided by a peristaltic pump which delivered 1 ml/h with on/off intervals of 30 min. Samples were recovered after two weeks. Using electron microscopy abundant collagen fibril formation was shown. The collagen fibrils were identified histologically as cartilage specific type II collagen. No mRNA expression of collagen type X was observed using in situ hybridization. The cells appeared in a round cell shape with round nucleus and only slight variations in form and size. The present results indicate that the chondrocytes maintain their differentiated phenotype and continue to synthesize typical matrix products in this three-dimensional perfusion culture chamber. The synthesis of cartilage as graft material in reconstructive surgery might be possible with this new culture system.

**Key words:** Cartilage grafting – Chondrocytes – Three-dimensional cell culture – Histology – In-situ hybridization – Electron microscopy

### Einleitung

In der rekonstruktiven Chirurgie des Kopf-Hals-Bereiches besteht ein großer Bedarf an Knorpeltransplantatmaterial, welcher aus autologen Quellen nicht immer gedeckt werden kann. Allogene Knorpeltransplantate bergen jedoch – trotz der verschiedenen Konservierungsverfahren – die Möglichkeit der Übertragung von Infektionen [10,11], außerdem weisen sie eine hohe Resorptions- und Abstoßungsrate auf [13,15,16]. Transplantationen von isoliertem, autologem Perichondrium, die zunächst tierexperimentell erfolgversprechend schienen [9,17], ließen sich später nur mit mäßigem Erfolg klinisch realisieren [18]. Neuere Untersuchungen zum Verhalten von Chondrozyten in vitro [1,19] führten zur Verwendung isolierter Chondrozyten als Transplantationsgrundlage [14].

Erkenntnisse über das Differenzierungsverhalten von Chondrozyten (Abb. 1) erlauben die Definition der Charakteristika differenzierter Chondrozyten. Im Rahmen der enchondralen Ossifikation reifen mesenchymale Vorläuferzellen, die die Kollagene Typ I und Typ II synthetisieren, zu Chondrozyten, die im differenzierten Zustand im wesentlichen Kollagen Typ II bilden. Werden die Chondrozyten hypertrophisch, so produzieren sie anfänglich die Kollagene Typ II und X, bei weiterem

Monoklonale Antikörper gegen humanes Kollagen Typ I (Chemicon, Temecula, USA) und Kollagen Typ II (Chemicon) wurden in der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode eingesetzt. Die Objektträger mit Gefrierschnitten wurden in einem Gemisch aus kaltem Äthanol und Aceton (1:1) fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% Schweineserum abgedeckt (1:5 verdünnt in PBS bei pH 7,4). Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über 30 min, dann die Inkubation mit dem Brückenantikörper (Kaninchen anti-Maus IgG; Dako, Hamburg, Deutschland) und dem APAAP-Komplex (Dako) für ebenfalls jeweils 30 min. Die beiden letzten Inkubationen wurden stets einmal wiederholt. Mit Hilfe der Neufuchsin-Methode wurden die gebundenen Antikörper sichtbar gemacht. Die Präparate wurden in Hämalaum 1 min lang gegengefärbt.

#### c-DNA-Proben

Die Probe für Kollagen Typ X wurde von Dr. Reichenberger (MPI, Erlangen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt [24].

Markierte RNA antisense Probe wurden mit Hilfe der T7-Polymerase (Promega, Madison, USA) und  $^{35}\text{S}$ -UTP (Amersham, Arlington Heights, USA) hergestellt. Die sense Probe wurde nach einer Transkription in der Gegenrichtung mit einer anderen RNA Polymerase und einer Linearisierung mit dem entsprechenden Enzym hergestellt.

Anschließend wurden die Proben mit DNase I für 20 min verdaut und hydrolisiert. Nach Zugabe von 20 mM DTT und 2 M Ammoniumacetat wurden die markierten Proben mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Hilfe von 20  $\mu\text{g}$  tRNA in Äthanol präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation, Waschen und Präzipitation wurden sie in 20 mM DTT bis einer Konzentration von  $20 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{l}$  resuspendiert.

#### In-situ-Hybridisierung [12]

Für die Hybridisierung wurden 4–5  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitten wie bereits beschrieben angefertigt. Als positive Kontrolle zum Nachweis von Kollagen Typ X dienten Gefrierschnitten von humanem Rippenknorpel.

Die Schnitte wurden 15 min lang in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach Waschen in  $3 \times \text{PBS}$  über 5 min wurden die Schnitte nochmal in  $1 \times \text{PBS}$  5 min lang gespült. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholoereihe und eine zweistündige Trocknung im Vakuum. Nach einer Azetylierung in 0,1 M Triäthanolamin (pH 8) und 0,25% acetic anhydride erfolgte eine Inkubation während 20 min mit 0,1 M Glycin, 0,2 M Tris HCL, pH 7,4. Nun wurden die Schnitten mit 50% Formamid,  $2 \times \text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC} = 0,15 \text{ NaCl}$  und  $0,015 \text{ M Na-Citrat}$ ), 1 mg/ml tRNA und 1 mg/ml DNA prähybridisiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 15,5  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsmix ( $2 \times \text{SSC}$ , 50% Formamid, 500  $\mu\text{g}$ /ml tRNA, 2 mg/ml BSA, 1 mg/ml DNA, 10 mg/ml Polyäthylenglykol), welche  $1 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{l}$  der Kollagenproben enthielt, gegossen. Die aufgelegten Deckgläschen wurden mit Ruberzement abgedichtet. In einer feuchten Kammer erfolgte bei 50°C die Hybridisierung über Nacht. Nach Abdecken und kurzem Spülen in  $2 \times \text{SSC}$ , 1 mM DTT bei Raumtemperatur wurden die Präparate zweimal mit  $2 \times \text{SSC}$ , 50% Formamid, 1 mM DTT bei 50°C gewaschen. Die Objektträger wurden in  $2 \times \text{SSC}$

eingetaucht und anschließend erfolgte eine Inkubation mit 50  $\mu\text{g}$ /ml RNase A 500 mM NaCl, 1 mM EDTA und 30 ml Tris HCL, pH 7,5 während 30 min bei 37°C. Nach einem Waschen mit  $2 \times \text{SSC}$ , 50% Formamid, 1 mM DTT bei 50°C, erfolgte ein dreimaliges Waschen in  $2 \times \text{SSC}$  bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte in Äthanol dehydriert, getrocknet und in einer NTB-2-Emulsion (1:1 mit 600 nM Ammonium-Azetat bei 42°C) eingetaucht. Dann wurden sie bei 4°C für 3 Tage gelagert. Die Schnitte wurden 4 min bei 15°C in einem Kodak D19-Developer entwickelt. Schließlich erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaum.

#### Ergebnisse

Während der gesamten Kulturzeit wiesen die Zellen hinsichtlich Größe und Form nur kleine Variationen auf. Die Chondrozyten waren meist rund konfiguriert und zeigten an der Zelloberfläche zahlreiche Ausläufer, die vermutlich auf der gerade stattfindenden Exozytose der produzierten Kollagene und Proteoglykane beruhten. Weiterhin ließ sich der Golgi-Apparat, der Ort der Synthese des Chondroitinsulfatanteils der Proteoglykane, erkennen. Im ebenfalls sichtbaren rauen endoplasmatischen Retikulum werden Kollagene und das Core-Protein der Proteoglykane synthetisiert. Die Zellkerne der Chondrozyten waren rund bis oval geformt, daneben ließen sich unterschiedlich große Einschlüsse im Zytoplasma beobachten (Abb. 2).

Die Produktion von Kollagenfibrillen konnte elektronenmikroskopisch anhand ihrer typischen periodischen Streifung gezeigt werden (Abb. 3). Die Durchmesser der Kollagenfibrillen erreichten maximal 100 nm. Kollagene fanden sich sowohl in unmittelbarer Nähe der Chondrozyten, als auch zwischen weiter entfernt gelegenen Zellen. Sie füllten diese Zwischenräume teilweise aus.

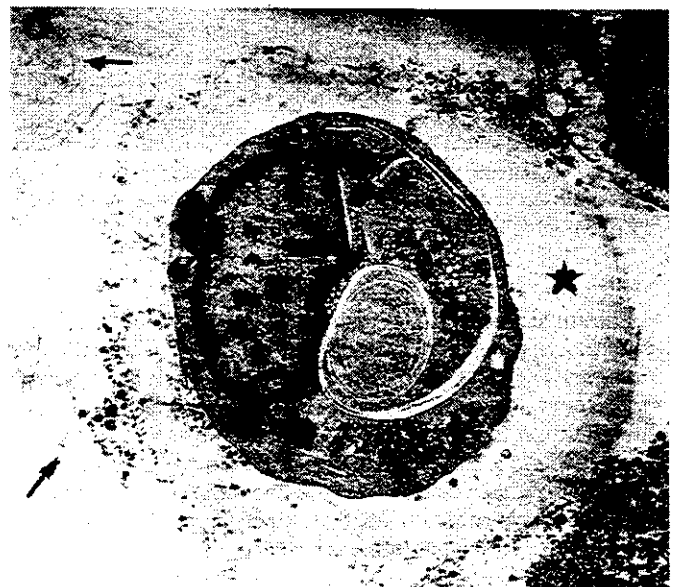


Abb. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chondrozyten. Kulturzeit 2 Wochen. Die Chondrozyten zeigen eine runde Konfiguration. Intrazellulär lassen sich der Golgi-Apparat, das endoplasmatische Retikulum und zahlreiche Ausläufer an der Zelloberfläche unterscheiden. Im extrazellulären Raum (\*) sind deutlich Faserstrukturen zu erkennen (Pfeile).

kompatibilität und der Fähigkeit die Zellfunktionen zu unterstützen, ist somit ein wichtiges, noch zu bearbeitendes Problem [25].

### Danksagung

Die Autoren danken Frau Anne-Marie Allmeling sowie Frau Katrin Lempart für die hervorragende technische Assistenz. Dank gilt auch der DFG (Bu 755) für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen. Die In-situ-Hybridisierungs-Untersuchungen wurden durch J. B. unter der Leitung von Prof. Dr. G. Firestein an den Laboratorien der Firma GENSLIA (San Diego, USA) mit der finanziellen Unterstützung der Europäischen Gesellschaft für Transplantationschirurgie durchgeführt.

### Literatur

- 1 Aulhouse, A. L., M. Beck, E. Griffey, J. Sanford, K. Arden, M. A. Machado, W. A. Horton: Expression of the human chondrocyte phenotype in-vitro. *In-vitro Cell. Dev. Biol.* 25 (1989) 659–669
- 2 Benya, P. D., S. Padilla, M. E. Ninni: Independent regulation of collagen types of chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15 (1978) 1313–1321
- 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 Bruckner, P., I. Hörler, M. Mendler, Y. Houze, K. H. Winterhalter, S. G. Eich-Bender, M. A. Spycher: Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J. Cell. Biol.* 109 (1989) 2537–2545
- 5 Bujía, J., E. Wilmes, F. Krombach, C. Hammer, E. Kastenbauer: The effect of gammainterferon on HLA class II antigen expression on isolated human nasal chondrocytes. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 247 (1990) 287–290
- 6 Bujía, J., M. Sittinger, P. Pitzke, E. Wilmes, C. Hammer: Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *ORL* 55 (1993) 347–351
- 7 Bujía, J., M. Sittinger, C. Hammer, G. Burmester: Züchtung menschlichen Knorpelgewebes mit Hilfe einer Perfusionskammer. *Laryngo-Rhino-Otol.* 73 (1994) 577–580.
- 8 Castagnola, P., B. Dozin, G. Moro, R. Cancedda: Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in-vitro. *J. Cell. Biol.* 106 (1988) 461–467
- 9 Coutts, R. D., D. Amiel, S. L. Y. Woo, Y. K. Woo, W. H. Akeson: Technical aspects of perichondrial grafting in the rabbit. *Eur. Surg. Res.* 16 (1984) 322–328
- 10 Davis, Ae: Homograft materials in otolaryngology: the risk of transmitting human immunodeficiency virus. *Clin. Otolaryngol.* 13 (1988) 159–161
- 11 Dickson, W. A., T. J. J. Inglis: Cialit preserved cartilage: failure to guarantee sterility. *Br. J. Plast. Surg.* 41 (1988) 408–409
- 12 Firestein, G. S., M. M. Paine, B. H. Littman: Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *Arthr. Rheum.* 34 (1991) 1094–1105
- 13 Gibson, T.: Cartilage grafts. *Br. Med. Bul.* 21 (1965) 153–156
- 14 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.* (1989) 208–218
- 15 Hellmich, S.: Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich. *HNO* 30 (1982) 140–144
- 16 Kastenbauer, E. R.: Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich. *HNO* 31 (1993) 371–380
- 17 Kon, M.: Cartilage formation from perichondrium in a weight-bearing joint. *Eur. Surg. Res.* 13 (1981) 387
- 18 Kwan, M. K., S. Woo, D. Amiel, J. B. Kleiner, F. P. Field, R. D. Coutts: Neocartilage generated from rib perichondrium: a long term multidisciplinary evaluation. *Trans. 33 rd. Orthop. Res. Soc. Meeting* 12 (1987) 277
- 19 von der Mark, K.: Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatology* 10 (1986) 272–315
- 20 Mayne, R., M. Vail, P. M. Mayne, E. J. Miller: Changes in the type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1674–1678
- 21 Minuth, W. W., G. Stöckl, S. Kloth, R. Dermietzel: Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions. *Eur. J. Cell. Biol.* 57 (1992) 132–137
- 22 Minuth, W. W., U. Rudolph: A compatible support system of cell culture in biomedical research. *Cyto. Technology* 4 (1990) 1881–1889
- 23 Reddi, A. H., N. S. Cunningham: Recent progress in bone induction by osteogonin and bone morphogenetic proteins: Challenges for biomechanical and tissue engineering. *J. Biomech. Eng.* 113 (1991) 189–190
- 24 Reichenberger, E., T. Aigner, K. von der Mark, H. Stöß, W. Bertling: In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev. Biol.* 148 (1991) 562–572
- 25 Sittinger, M. J., Bujía, J., W. W. Minuth, C. Hammer, G. Burmester: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 15 (1964) 451–456
- 26 Sokoloff, L.: Pathology and pathogenesis of osteoarthritis. In McCarthy, D. J. (ed.): *Arthritis and Allied Conditions*. Lea and Ferbig, Philadelphia, PA (1979) 1135–1153
- 27 Verbruggen, G., E. M. Veys, N. Wieme, A. M. Malfait, L. Gijssels, J. Nimmegheers, K. F. Almqvist, C. Broddez: The synthesis and immobilisation of cartilage-specific proteoglycan by human chondrocytes in different concentrations of agarose. *Clin. Exp. Rheumatol.* 8 (1990) 371–378

Dr. Dr. J. Bujía

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten  
Klinikum Großhadern  
Marchioninistraße 15  
81377 München