

## Tissue Engineering: Künstlicher Gewebeersatz aus vitalen Komponenten

M. Sittlinger

Medizinische Klinik III, Charité  
(Direktor: Prof. Dr. med. Gerd R. Burmester)  
Humboldt-Universität zu Berlin

**Zusammenfassung:** Tissue Engineering, ein noch sehr junges Forschungsgebiet, hat in den letzten Jahren rasch an Bedeutung gewonnen. Es beruht insbesondere auf einer interdisziplinären Zusammenarbeit der Bereiche Biomaterialentwicklung, Zellbiologie und Zellkulturtechnik. Im Vordergrund steht die Herstellung bioartifizieller Konstrukte oder Gewebe aus lebenden Zellen bzw. Zellmatrix und Biomaterialien. Moderne Zelltechniken ermöglichen jetzt erstmals die Entwicklung lebender Ersatzgewebe für den Einsatz in Klinik und Forschung. **Konzepte:** Biomaterialien bieten eine dreidimensionale Struktur, um ein Gewebe zu formen oder ein Gewebewachstum zu leiten. Isolierte Knorpelzellen eines Patienten können in einer resorbierbaren Faserstruktur verteilt werden und ein neues Gewebe ausbilden. Um eine ausreichende Menge autologer Zellen zu erhalten, müssen Zellen von Biopsien in Monolayer vermehrt werden. Dedifferenzierte und undifferenzierte mesenchymale Zellen sind für die künstliche Herstellung von Knorpel und Knochen denkbar. Relativ hohe Zelldichten in den dreidimensionalen Kulturen erfordern Perfusionstechniken, um die Kulturbedingungen zu stabilisieren. Für die Differenzierung der künstlichen Gewebe spielen morphogene Faktoren, z.B. BMPs (bone morphogenetic proteins), eine Schlüsselrolle. **Schlussfolgerung:** Die Techniken des Tissue Engineering eröffnen neue Möglichkeiten für die Entwicklung lebender Ersatzgewebe für den Einsatz in der Klinik. Gewebedefekte können so mit gezüchteten autologen Zellen repariert bzw. gefüllt werden, ohne langfristig auf künstliche Materialien angewiesen zu sein. Das Tissue Engineering eröffnet aber auch neue Ansätze für die Entwicklung von *n-vitro*-Modellen der extrazellulären Matrix oder Erkrankungen, bei denen vorwiegend diese Matrix betroffen ist. Dieser Beitrag soll aktuelle Untersuchungen des Tissue Engineerings darstellen und das medizinische Potential, insbesondere für die rekonstruktive Chirurgie, analysieren.

**Schlüsselwörter:** Tissue Engineering – Knorpeltransplantation – Zelldifferenzierung – Gewebekultur – Zelltransplantation – Resorbierbare Polymere – Perfusion

**Tissue Engineering. Artificial Tissue Replacement Containing Vital Components:** Tissue engineering as a new field of research has gained increasing importance in recent years. The interdisciplinary field combines, biomaterials cell biology, and cell culture bio-engineering technology. The main focus of tissue engineering is the synthesis of artificial constructs or tis-

sues based on vital cells or cell matrix. Biomaterials provide a three-dimensional structure to shape or guide tissue development. Isolated cartilage cells from a patient can form new tissues when suspended in non-woven resorbable polymers for reconstructive surgery. To achieve sufficient amounts of autologous cells for transplant formation, cells from biopsies have to be multiplied in monolayer culture. Dedifferentiated and undifferentiated mesenchymal cells may be used for bone and cartilage engineering. High cell densities in three-dimensional cultures require perfusion techniques to stabilize culture conditions. Morphogenetic factors such as BMP (bone morphogenetic protein) are thought to play a key role in inducing and controlling phenotypic tissue formation. In conclusion, modern *in vitro* approaches open new avenues for the development of vital tissue replacements for the clinic. Tissues can be repaired with the patient's own cells eventually leaving no residual artificial materials. Tissue engineering further provides new approaches for *in vitro* models of the extracellular matrix or diseases which mainly affect this matrix such as rheumatoid arthritis or osteoarthritis. This article describes recent developments in connective tissue engineering and discusses the potential for human tissue repair and reconstructive surgery.

**Key words:** Tissue Engineering – Cartilage transplantation – Cell differentiation – Tissue culture – Cell transplantation – Resorbable polymers – Perfusion

### Einführung

In der Medizin besteht ein großer Bedarf an Ersatzmaterialien, um unterschiedlichste Defekte, insbesondere z.B. in Knochen und Knorpel, zu füllen. Eine Vielzahl unterschiedlichster Materialien, wie z.B. Polymere, Metalle, konservierte Gewebederivate, werden am Patienten eingesetzt. Alle diese Füllstoffe stellen jedoch im Organismus einen Fremdkörper dar. Im Gegensatz zu lebendigen Strukturen fehlen ihnen jegliche Erneuerungsprozesse. Während xenogene bzw. allogene Transplantate vorwiegend unter immunologischen Abstoßungsreaktionen leiden [10,12,33], sind die übrigen Materialien meist durch Korrosion und Degradation gefährdet [33]. Prinzipiell kann für eine Defektfüllung an anderer Stelle desselben Patienten entsprechendes Gewebe entnommen werden [18]. Leider ist es aber nicht immer möglich, auf diese Weise die benötigten Materialmengen zu gewinnen.

Ein neuartiges Forschungsgebiet schafft jetzt Perspektiven für die In-vitro-Züchtung autologer artifizierender Ersatzgewebe. Die Zellen einer Gewebeprobe können isoliert und in Kultur vermehrt werden. Mit Hilfe des Tissue Engineerings werden die in ausreichenden Mengen gewonnenen Zellen in vitro zu einem dreidimensionalen vitalen gewebetypischen Konstrukt geformt.

### Die extrazelluläre Matrix

In Bindegewebe, wie z.B. Knorpel, bilden die Kollagene Fibrillen, welche in einem Hydrogel extrem großer Aggregate aus Proteoglykanen und Hyaluronsäure eingebettet sind. Das Molekulargewicht derartiger Aggregate kann  $100 \times 10^6$  Dalton und mehr betragen und die Größe eines Bakteriums erreichen. Sezernierte Kollagene haben ein Molekulargewicht von etwa  $300 \times 10^3$  Dalton. Selbst große Moleküle wie Aggrecan im Knorpel mit einem Molekulargewicht von mehr als  $3 \times 10^6$  werden bereits als fertige ganze Moleküle in den extrazellulären Raum abgegeben [13]. Proteoglykane können in ihrer Struktur äußerst komplex und heterogen sein. Bislang ist nur wenig über die Bedeutung dieser komplizierten Zuckerstrukturen bekannt. Es gibt jedoch eine zunehmende Zahl von Beobachtungen, die auf eine aktive Rolle beim interzellulären Stoff- und Signalaustausch hinweisen. Die Proteoglykane können z.B. Gele mit variabler Ladungsdichte bilden und so Diffusionsbewegungen steuern [26]. Ferner nehmen sie aktiven Einfluß auf die Signalnetze von Zytokinen und Wachstumsfaktoren [19]. Das Glykosaminoglykan Heparansulfat bindet FGF und setzt es mit stark erhöhter Aktivität frei [8]. Ein weiteres Beispiel ist TGF- $\beta$  (transforming growth factor). Dieses Zytokin wird inaktiviert durch Decorin, einem kleinen Proteoglykan, das vermutlich den Durchmesser der Kollagenfibrillen während der Fibrillogenese steuert. Man darf also davon ausgehen, daß die extrazelluläre Matrix neben ihren strukturellen und physikalischen Eigenschaften eine zentrale Rolle beim funktionellen Zusammenspiel unterschiedlichster Zellaktivitäten spielt.

### Gewebeherstellung in vitro

Das Tissue Engineering in vitro setzt in erster Linie eine dreidimensionale Verteilung der Zellen voraus. Schon seit langem suspendiert man Zellen in Agarose- oder Kollagengele [2,6] als Modell zur Untersuchung phänotypischer Zellveränderungen. Moderne Ansätze zur Entwicklung dreidimensionaler Zellkonstrukte konzentrieren sich vorwiegend auf die In-vitro-Herstellung vitaler Ersatzgewebe zur Transplantation.

Hierzu sind insbesondere biokompatible resorbierbare Trägerstrukturen interessant. Derartige Materialien sollen die Entwicklung eines dreidimensionalen Zellgewebes räumlich leiten. Sobald das artifizierende Zellgewebe entsprechend gereift ist und die notwendige mechanische Konsistenz besitzt, wird die Trägerstruktur selbst überflüssig und kann schließlich resorbiert werden. So wurden zunächst einfache resorbierbare Fasern mit Chondrozyten besiedelt [27]. In ähnlicher Weise wurden zur Herstellung eines Hautersatzes resorbierbare Netze mit Fibroblasten besiedelt [9]. Ungewebte Vliesstrukturen wurden für die Herstellung von Urothel und Knorpelgewebe eingesetzt [1,17,22]. Im Vergleich zu Gelstrukturen bieten diese Polymerträger vor allem eine gewisse mechani-

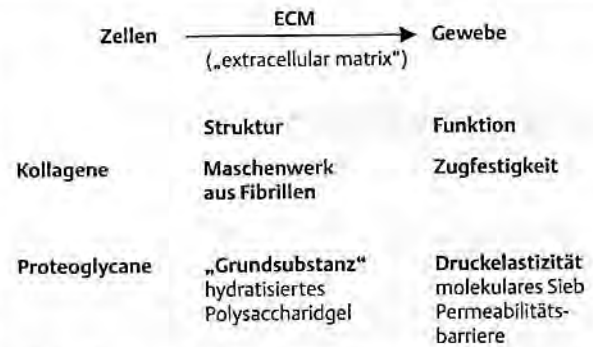


Abb.1 Die zentrale Bedeutung der extrazellulären Matrix für das "Tissue Engineering": Bestandteile, Struktur und Funktion der ECM.

Anforderungen an die Struktur eines Trägermaterials:

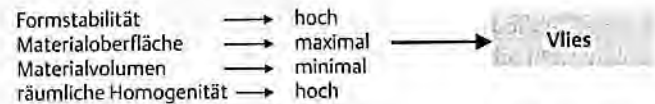


Abb.2 Dreidimensionale Zell-Immobilisation: Vlies als geeignete Zellträgerstruktur zur Transplantatherstellung.

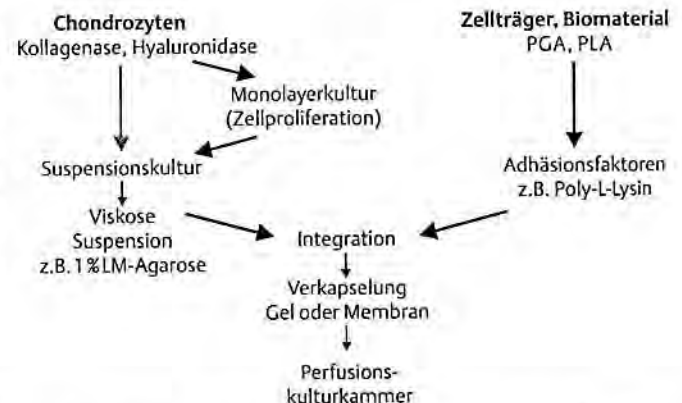


Abb.3 Herstellung eines Chondrozyten-Vlies-Gewebes: Chondrozyten werden aus Knorpelstücken isoliert und in Monolayerkultur vermehrt. Die Zellen werden dann in einer leicht viskosen Suspension vorbereitet. Die Polymervliesträger werden mit Adhäsionsfaktoren beschichtet. Die Zellsuspension wird über das Vlies pipettiert und aufgesaugt. Zur Akkumulation neusynthetisierter Matrixmoleküle wird das Vlies in eine Gel- oder Membranhülle eingeschlossen.

sche Festigkeit und Formstabilität. Gemeinsam ist diesen Trägermaterialien eine hohe innere Oberfläche, um eine gute dreidimensionale Verteilung der Zellen zu ermöglichen. Vliesstrukturen haben den besonderen Vorteil, daß die Menge des benötigten Biomaterials besonders gering ist und somit auch störende Effekte durch die Degradationsprodukte minimiert werden (Abb. 2 u. 4). Sowohl poröse als auch faserige Strukturen haben im Vergleich zu Gelen jedoch den Nachteil, daß eine räumlich gleichmäßige Zellbesiedelung erschwert ist [24]. Hervorgerufen wird dieses Problem durch unvermeidliche Gravitationskräfte. Um Zellen einer Suspension in einer dreidimensionalen Verteilung zu halten, müssen sie entweder

rasch an einer 3 D-Struktur anhaften oder durch Polymerisierung bzw. Verfestigung des Suspensionsmediums gefangen werden. Zur In-vitro-Herstellung von Knorpelgewebe mittels Polymervliese wurden beide Lösungen kombiniert [20]. Zunächst wurde die Oberfläche der Polymerfasern mit Poly-L-Lysin beschichtet und anschließend die Zellsuspension durch Zugabe geringer Mengen Agarose in einen viskosen Zustand gebracht (Abb. 3). Poly-L-Lysin stellt hier einen sehr effektiven Adhäsionsfaktor für Chondrozyten dar, der die Zellen innerhalb weniger Minuten bindet. Darüber hinaus stabilisiert Polylysine aber auch den Phänotyp der Chondrozyten und hält aufgrund seiner Eigenschaften als Polykation neu synthetisierte extrazelluläre Matrixmoleküle im Vliesgewebe zurück, da diese fast ausschließlich Polyanionen sind [11]. Beispiele für in dieser Weise in vitro hergestellte Knorpelgewebe sind in Abb. 5 dargestellt.

### Kulturtechnik

Bei der artifiziiellen Herstellung eines Zellgewebes in vitro mittels einer Trägerstruktur kommt es im wesentlichen auf eine Aggregation von extrazellulärer Matrixstrukturen aus neusynthetisierten Matrixmolekülen an. Im Beispiel einer Monolayer- oder einer einfachen Vlieskultur diffundieren diese Moleküle zunächst in das Nährmedium und verbleiben größtenteils nicht im zellnahen Bereich [29]. Völlig anders verhält es sich mit Gelkulturen wie z.B. Agarose [3]. Große Moleküle wie Aggrecan bleiben nur im perizellulären Bereich, so daß eine interzelluläre Matrix nicht gebildet werden kann [28]. Um die Neubildung einer extrazellulären Matrix in Vlieskulturen zu begünstigen, werden die Gewebe mit einer Gelhülle oder besser mit einer semipermeablen Membran eingeschlossen [23] (Abb. 6). Auf diese Weise werden hochmolekulare Proteoglykane und Kollagene im Inneren des Vlieses zurückgehalten.

Dreidimensionale Zellkulturen haben im Vergleich zu Monolayerkulturen meistens wesentlich höhere Zelldichten. Gerade bei der Züchtung gewebeähnlicher Strukturen strebt man Zelldichten an, die der Situation in vivo vergleichbar sind. So findet man im humanen Gelenkknorpel etwa  $15 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter [25]. Derartige Zelldichten erfordern einen mindestens täglichen Mediumwechsel. Eine äußerst hilfreiche Alternative stellen hier Perfusions-Kulturkammern dar [5,16,22]. Parameter wie der pH-Wert oder die Glukosekonzentration können auf diese Weise über Wochen annähernd stabil gehalten werden [20] (Abb. 7). Die Handhabung der Kulturen wird wesentlich vereinfacht, und das Risiko von Verkeimungen ist deutlich niedriger.

### Das zelluläre Ausgangsmaterial

Ausgangsmaterial für die in vitro Herstellung eines autologen Transplantats sind isolierte Zellen einer Gewebeprobe des Patienten selbst. Ziel ist es, auch größere Gewebedefekte, ausgehend von einer möglichst kleinen Gewebeprobe, zu reparieren. Dies setzt eine umfangreiche in vitro Vermehrung der isolierten Zellen aus der Biopsie voraus. Die meisten humanen Zellen können in herkömmlichen Zellkulturschalen ausgesät und zur Proliferation in serumhaltigem Medium angeregt werden. Im allgemeinen hängt das Potential zur Proliferation vom Differenzierungsgrad der Zellen ab. Bei isolierten humanen Chondrozyten des Nasenseptums findet



Abb. 4 Dreidimensionales Chondrozyten-Vlies-Gewebe im Lichtmikroskop. Die Vliesstruktur ist durch eine regellose Anordnung der Fasern gekennzeichnet und dient als Grundgerüst für die dreidimensionale Zellverteilung.

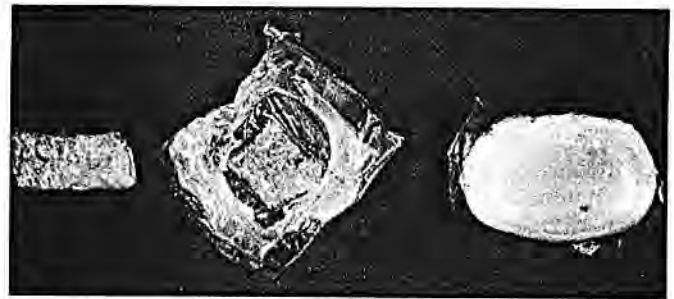


Abb. 5 In vitro mit Hilfe des Tissue Engineering gezüchtete Knorpelstücke.

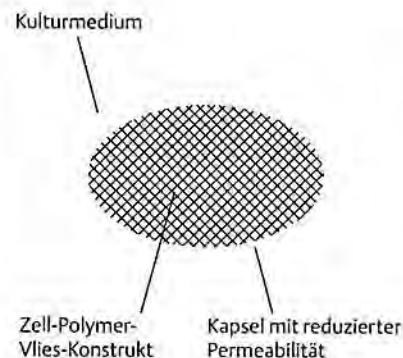


Abb. 6 Die Verkapselung des Zellpolymergewebes sorgt für eine Akkumulation hochmolekularer Matrixmoleküle innerhalb des Gewebes.

man eine relativ hohe Proliferationsrate [20]. Dagegen teilen sich Chondrozyten aus dem Kniegelenk nur sehr wenig. In jedem Fall ist eine In-vitro-Vermehrung der Knorpelzellen mit einer morphologischen und biochemischen Dedifferenzierung der Zellen verbunden. Weitere Untersuchungen werden zeigen, inwieweit als Ausgangsmaterial für die Transplantatzüchtung auch undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen eingesetzt werden können [32]. So lassen sich z.B. Zellen des Periosts oder Perichondriums gut in Monolayer vermehren. Denkbar wäre auch die Verwendung von Zellmaterial humaner Embryonen, obgleich hier sicher ethische Probleme zu berücksichtigen sind.

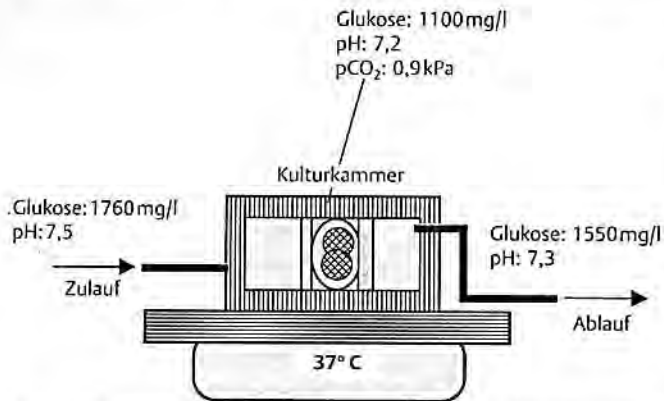


Abb. 7 Züchtung von Knorpelgewebe in einer Perfusionsskammer: Typische Meßwerte für Glukose, pH-Wert und  $pCO_2$  im Perfusionssystem mit Zell-Polymer-Geweben.

### Kontrolle des Phänotyps und Gewebedifferenzierung

In üblichen Monolayer-Kultursystemen fehlt isolierten Zellen im allgemeinen eine gewebetypische extrazelluläre Matrix. Nach Suspension in Kulturmedium haften isolierte Zellen am Boden der Kulturgefäße an und können sich dort vermehren. Dabei verändern sie häufig in kurzer Zeit ihre Form und funktionellen Eigenschaften. Ein typisches Beispiel hierfür sind Knorpelzellen. In Monolayerkultur nehmen sie eine fibroblastenförmige Form [31] an und schalten ihre Kollagensynthese vom knorpeltypischen Kollagen Typ II um auf Kollagen Typ I, welches normalerweise nicht im Knorpel vorkommt [30]. Derartige Veränderungen des Phänotyps sind wahrscheinlich auf die fehlende extrazelluläre Matrix zurückzuführen. In geeigneten dreidimensionalen Kulturen ist es zwar möglich, den Phänotyp *in vitro* zu erhalten, eine gleichzeitige Vermehrung der Zellen ist dann jedoch nicht möglich. Um ausreichende Mengen autologer Zellen für eine Transplantatherstellung zu gewinnen, müssen die Zellen zunächst in Monolayerkultur vermehrt werden. Die eigentliche Aufgabe des Tissue Engineerings ist es, anschließend Bedingungen zu schaffen, in denen Zellen wieder ihre typischen oder gewünschten Eigenschaften ausbilden. Bislang ist allerdings noch nicht ausreichend geklärt, inwieweit dedifferenzierte Chondrozyten zur vollständigen Redifferenzierung fähig sind. Die bisherigen Erkenntnisse zur Differenzierung von Zellen und Geweben des Bindegewebes sind noch sehr lückenhaft. Eine wesentliche Rolle in diesem Zusammenhang scheinen sogenannte Morphogene zu spielen. Dazu gehören z. B. BMP (bone morphogenetic protein) [14] oder CDMP (cartilage derived morphogenetic protein) [7]. Mit Hilfe derartiger Faktoren könnten sich für das Tissue Engineering neue Möglichkeiten eröffnen, um die Züchtung künstlicher Gewebe aktiv zu steuern [20]. Die Faktoren könnten z. B. an die Trägermaterialien gebunden werden oder über resorbierbare Mikropartikel direkt im Inneren des Gewebekonstrukts freigesetzt werden. Mit derartigen Release-Konzepten wäre eine Beeinflussung der Differenzierung auch noch nach der Transplantation *in vivo* möglich [20]. So könnte beispielsweise eine unbeabsichtigte Entwicklung zum Faserknorpel verhindert werden. Der Einsatz morphogener Faktoren könnte ein entscheidender Fortschritt gegenüber den bisherigen Ansätzen der Gewebezüchtung sein, in denen im wesentlichen über

optimierte Kulturbedingungen die Gewebeentwicklung begünstigt wird.

### Künstliches Gewebe als In-vitro-Modell

Untersuchungen an isolierten Zellen in Kultur finden seit langem breite Anwendung in der Biologie und Medizin. Die eigentlichen Methoden der Zellkultur haben sich dabei bis heute kaum geändert. Die Kultur von Zellen in Plastikflaschen oder Petrischalen mit serumhaltigem Medium wurde zum Standard. Trotz der vielfältigen Möglichkeiten, die die Zellkultur bietet, kann damit aber noch längst nicht jedes gewebetypische Verhalten *in vitro* simuliert werden [20]. Einen wesentlichen Fortschritt dazu könnten Kulturmodelle liefern, in denen eine funktionierende extrazelluläre Matrix einbezogen wird. Insbesondere bei Erkrankungen, in denen vorwiegend die Zellmatrix betroffen ist, eröffnet das Tissue Engineering neue Perspektiven zur Entwicklung komplexer Modelle zur Untersuchung pathogenetischer Mechanismen. So können z. B. In-vitro-Modelle für die Untersuchung der rheumatoiden Arthritis oder der Arthrose entwickelt werden [21].

### Tissue Engineering in der Klinik

Das wichtigste Ziel der hier dargestellten Ansätze des Tissue Engineerings ist eine In-vitro-Züchtung autologen vitalen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie. Für die autologe Knorpelzüchtung in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik können isolierte Knorpelzellen aus dem Nasenseptum als Ausgangsmaterial verwendet werden, da diese Zellen meistens um das tausendfache vermehrt werden können. Je nach Größe der entnommenen Biopsie und der Größe des Defekts muß für die Phase der Zellvermehrung ein Zeitraum von einigen Wochen bis zwei Monaten geplant werden. Der eigentliche Vorgang des Tissue Engineerings dauert schließlich nochmals etwa ein bis zwei Wochen. Dies hängt auch davon ab, inwieweit künftig ein Differenzierungs- bzw. Redifferenzierungsprozeß mittels geeigneter Faktoren aktiv gesteuert werden kann. Wegen individueller Unterschiede kann für den Patienten wahrscheinlich erst nach der Zellvermehrung ein genauer Termin für die Transplantation festgelegt werden. Insgesamt erfordert diese autologe Transplantatherstellung durchaus eine beachtliche Anzahl unterschiedlicher Arbeitsschritte, in denen jeweils die Gefahr einer Kontamination oder eines Zellverlusts besteht [20].

Weitere Forschungsergebnisse des Tissue Engineerings könnten vor allem die noch problematische Vermehrungsphase durch den Einsatz teilungsaktiver pluripotenter Vorläuferzellen wesentlich verbessern. Ein derartiger Ansatz muß z. B. für die Reparatur des Gelenkknorpels angestrebt werden, da artikulare Chondrozyten nur ein sehr geringes Potential zur Proliferation besitzen [4,20]. In einem weiteren Schritt des Tissue Engineerings könnte schließlich auch eine Gentherapie *ex vivo* an pluripotenten Zellen in Betracht kommen [15]. So könnte z. B. ein Enzymdefekt in Vorläuferzellen gentechnisch repariert werden und die veränderten Zellen anschließend für eine In-vitro-Gewebezüchtung herangezogen werden.

## Danksagung

Die hier dargestellten Untersuchungen werden gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft Bu 445/3-1 und Bu 755.

## Literatur

- <sup>1</sup> Atala, A., J. P. Vacanti, C. A. Peters, J. P. Mandell, A. B. Retik, M. R. Freeman: Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J. Urol.* 148 (1992) 658-662
- <sup>2</sup> Aydelotte, M. B., K. E. Kuettner: Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Con. Tiss. Res.* 18 (1988) 205-222
- <sup>3</sup> Bassleer, C., P. Gysen, J. M. Foidart, R. Bassleer, P. Franchimont: Human chondrocytes in tridimensional culture. *In Vitro Cell. Devl. Biol.* 22 (1986) 113-119
- <sup>4</sup> Brittberg, 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
- <sup>5</sup> Bujia, J., N. Rotter, W. Minuth, C. Hammer, M. Sittinger: Züchtung menschlichen Knorpelgewebes mit Hilfe einer Perfusionskammer. Charakterisierung der Kollagensynthese. *Laryngo-Rhino-Otol.* (1995) in press
- <sup>6</sup> Bujia, J., M. Sittinger, P. Pitzke, E. Wilmes, C. Hammer: Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *ORL J Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 55 (1993) 347-351
- <sup>7</sup> Chang, S. C., B. Hoang, J. T. Thomas, S. Vukicevic, F. P. Luyten, N. J. Ryba, C. A. Kozak, A. H. Reddi, M. J. Moos: Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28227-28234
- <sup>8</sup> Colige, A., B. Nusgens, C. M. Lapiere: Effect of EGF on human skin fibroblasts is modulated by the extracellular matrix. *Arch. Dermatol. Res.* 280 (Suppl.) (1988) 42-46
- <sup>9</sup> Cooper, M. L., J. F. Hansbrough, R. L. Spielvogel, R. Cohen, R. L. Barttel, G. Naughton: In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable PGA or polyglactin mesh. *Biomaterials* 12 (1991) 243-248
- <sup>10</sup> Hammer, C., J. Bujia: Immunologie vitaler und konservierter Transplantate. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. (Suppl.)* 1 (1992) 3-26
- <sup>11</sup> Kahn, A., L. A. Pottenger, J. G. Albertini, A. D. Taitz, E. J. Thonar: Chemical stabilization of cartilage matrix. *J. Surg. Res.* 56 (1994) 302-308
- <sup>12</sup> Kastenbauer, E. R.: Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich. *Hals-Nasen-Ohren-Klinik* 31 (1983) 371-380
- <sup>13</sup> Lohmander, S.: Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Bailliere's Clinical Rheumatology* 2 (1988) 37-60
- <sup>14</sup> Luyten, F. P., N. S. Cunningham, S. Vukicevic, V. Paralkar, U. Ripamonti, A. H. Reddi: Advances in osteogenin and related bone morphogenetic proteins in bone induction and repair. *Acta Orthop. Belg.* 58, Suppl 1 (1992) 263-267
- <sup>15</sup> McIntire, L. V.: 1992 ALZA Distinguished Lecture: bioengineering and vascular biology. *Ann Biomed. Eng.* 22 (1994) 2-13
- <sup>16</sup> 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
- <sup>17</sup> Puelacher, W. C., D. Mooney, R. Langer, J. Upton, J. P. Vacanti, C. A. Vacanti: Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials* 15 (1994) 774-778
- <sup>18</sup> Rettinger, G.: Autogene und allogene Knorpeltransplantate in der Kopf- und Halschirurgie (ohne Mittelohr und Trachea). *Eur. Arch. Oto Rhino Laryngol. (Suppl.)* 1 (1992) 127-162
- <sup>19</sup> Ruoslahti, E., Y. Yamaguchi: Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell.* 64 (1989) 867-869
- <sup>20</sup> Sittinger, M.: In vitro Herstellung von vitalem Knorpelgewebe mit Hilfe resorbierbarer Polymere. Dissertation, Universität Regensburg (1994)
- <sup>21</sup> Sittinger, M.: Cartilage obtained by tissue engineering as a model substance for pannus formation. Workshop, XIIIth European Congress of Rheumatology, Juni 1995, Amsterdam, Niederlande
- <sup>22</sup> Sittinger, M., J. Bujia, W. W. Minuth, C. Hammer, G. R. Burmester: Engineering of cartilage tissue bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 15 (1994) 451-456
- <sup>23</sup> Sittinger, M., B. Lukanoff, G. Burmester, H. Dautzenberg: Encapsulation of arteficial tissues in polyelectrolyte complexes: Preliminary studies. *Biomaterials* (1995) in press
- <sup>24</sup> Sittinger, M., D. Reitzel, H. Planck, M. Dauner, H. Hierlemann, J. Bujia, G. R. Burmester: Resorbable polyesters in cartilage engineering: Affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J. Appl. Biomat.* submitted
- <sup>25</sup> Sledge, C. B.: Biology of the joint. In Kelly, M. D., M. D. Harris, M. D. Ruddy, M. D. Sledge (eds.): *Textbook of Rheumatology* (Vol 1). W. B. Saunders Company, London 1993
- <sup>26</sup> Stockwell, R. A.: The cell density of human articular and costal cartilage. *J. Anat.* 101 (1967) 753-763
- <sup>27</sup> 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
- <sup>28</sup> Verbruggen, G., E. M. Veys, A. M. Malfait, M. Cornelissen, C. Broddelez, L. De Ridder: Characterisation of the aggrecans synthesized by human chondrocytes cultured in suspension culture in agarose. XIIIth European Congress of Rheumatology, Amsterdam (1995)
- <sup>29</sup> Verbruggen, G., E. M. Veys, N. Wieme, A. M. Malfait, L. Gijssels, J. Nimmegheers, K. F. Almquist, C. Broddelez: The synthesis and immobilisation of cartilage-specific proteoglycan by human chondrocytes in different concentrations of agarose. *Clin. Exp. Rheumatol.* 8 (1990) 371-378
- <sup>30</sup> von der Mark, K.: Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. In Kühn, K., T. Krieg (eds.): *Connective tissue: Biological and clinical aspects.* Karger, Basel 10 (1986) 272-315
- <sup>31</sup> von der Mark, K., B. Gauss, H. von der Mark, P. Müller: Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267 (1977) 531-532
- <sup>32</sup> Wakitani, S., T. Goto, S. J. Pineda, R. G. Young, J. M. Mansour, A. I. Caplan, V. M. Goldberg: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 76 (1994) 579-592
- <sup>33</sup> Westhues, M.: Die antigene Wirkung des Knorpels. I. Nachweis der antigenen Wirkung des transplantierten Knorpels durch histologische Untersuchungen. *Laryngol. Rhinol. Otol.* 49 (1970) 750-761

Dr. rer. nat. Michael Sittinger

Medizinische Klinik III, Humboldt Universität, Charité  
Tucholskystraße 2, 10117 Berlin