

C. Perka¹ · O. Schultz² · M. Sittinger^{2,3} · H. Zippel¹ · ¹ Orthopädische Klinik und Poliklinik, Humboldt-Universität Berlin (Charité) · ² Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik III, Humboldt-Universität Berlin (Charité) · ³ Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin

Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen

Zusammenfassung

Die Transplantation von chondrogenen Zellen in supportiven Trägerstrukturen erweist sich zunehmend als eine alternative Methode zur Behandlung von Knorpeldefekten. Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war die Transplantation allogener Chondrozyten in einem biodegradierbaren Polymervlies (PGLA/Polydioxanon) in Gelenkknorpeldefekte in einem Kaninchenmodell. In Knorpel-Knochen-Defekte der femoralen Patellagleitbahn wurden Transplantate aus isolierten allogenen Chondrozyten in einem bioresorbierbaren Polymerkonstrukt eingesetzt und mit Leerdefekten sowie Polymerkonstrukten ohne Zellen als Kontrollgruppen verglichen. Die Resultate wurden nach 4 und 12 Wochen histologisch und histochemisch beurteilt. Die Beurteilung der Transplantatintegration und der Architektur des neugebildeten Knorpels erfolgte mit einem semi-quantitativen Score. Bereits nach 4 Wochen war die Entwicklung der Zell-Polymer-Transplantate zu einem hyalinartigen Knorpel nachweisbar, nach 12 Wochen waren die Defekte fast vollständig mit hyalinartigem Knorpel gefüllt. Veränderungen der Transplantatstruktur durch die Biodegradation des Trägermaterials wurden nicht beobachtet. Die Defekte der Kontrollgruppen wiesen keine Heilungszeichen auf oder heilten mit Faserknorpel. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sich resorbierbare Polymere aufgrund der Möglichkeit der In-vitro-Generation eines semisoliden Knorpeltransplantats und der resultierenden einfachen Fixationsmöglichkeit im Defekt als geeignetes Trägermaterial für die Knorpeltransplantation erwiesen. In vivo stellen sie

ein adäquates Mikromilieu für die Bildung von hyalinem Knorpel dar und lassen bei Bindung von Wachstumsfaktoren durch eine protrahierte Freisetzung eine weitere Verbesserung der Ergebnisse nach Chondrozytentransplantation erwarten.

Schlüsselwörter

Chondrozytentransplantation · Tissue engineering · Bioresorbierbare Polymere

Die Wiederherstellung pathologisch veränderter Gelenkflächen durch Knorpeltransplantate dient dem Ziel der Prävention sekundär arthrotischer Veränderungen. Die regenerative Fähigkeit artikulären Knorpels zur Heilung solcher Defekte ist stark limitiert. Verletzungen ohne Penetration des subchondralen Knochens zeigen nur eine minimale Heilungstendenz [17]. Nach Alteration des subchondralen Knochens ist das Reparaturgewebe fibröses Bindegewebe, Faserknorpel oder auch hyalinartiger Knorpel in Abhängigkeit von der Spezies, dem Alter und der Lokalisation der Verletzung [18, 21]. Selbst wenn dieses Reparaturgewebe histologisch hyalinartigem Knorpel entspricht, unterscheidet sich dieser biomechanisch und biochemisch von normalem Knorpel, so dass sich bereits nach 6 Monaten extensive degenerative Veränderungen des Reparaturgewebes zeigen [13]. Bisherige Strategien, wie die Durchführung von Abrasionsarthroplastiken,

Bohrungen, Knorpeldébridements und das arthroskopische „Shaven“, waren langfristig klinisch wenig erfolgreich [12]. Ursächlich dafür ist, dass das durch diese Verfahren induzierte Reparaturgewebe mechanisch inadäquat belastbarer Faserknorpel ist [8]. Die biologische Rekonstruktion der Gelenkflächen durch die Transplantation von Chondrozyten stellt eine Alternative dar, in deren Resultat eine langfristig erfolgreiche Rekonstruktion der Gelenkflächen möglich erscheint [5, 9, 30]. Der dabei entstehende hyaline Knorpel ist hinsichtlich der mechanischen Stabilität dem Faserknorpel deutlich überlegen, wenngleich er noch nicht die Stabilität des originalen Knorpels besitzt [6].

Voraussetzung für eine erfolgreiche Chondrozytentransplantation ist das Vorhandensein einer ausreichenden Zahl vitaler, phänotypisch stabiler Chondrozyten in einer mechanisch stabilen Matrix. Für das „Tissue engineering“ charakteristisch ist die initiale Entnahme eines Gewebes, die anschließende Isolation der Zellen aus ihrer Matrix und deren nachfolgende Vermehrung. Diese Amplifikation erfolgt aufgrund der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Zahl von Zellen. Bei Chondrozyten ist die nachfolgende Kultivierung in einer dreidimensionalen Matrixsubstanz für den Erhalt der phänotypischen Sta-

Dr. C. Perka
Klinik und Poliklinik für Orthopädie,
Universitätsklinikum Charité,
Humboldt-Universität zu Berlin,
Schumannstraße 20/21, D-10117 Berlin

C. Perka · O. Schultz · M. Sittlinger · H. Zippel

Chondrocyte transplantation using PGLA/Polydioxanon fleeces

Summary

The transplantation of chondrogenic cells in a supportive carrier structure proved to be a promising alternative for the treatment of cartilage defects. In the study presented we focused on the transplantation of allogeneic chondrocytes in a biodegradable polymer scaffold (PGLA/Polydioxanon) in articular cartilage defects in a rabbit defect model. Isolated allogeneic chondrocytes embedded in a PGLA polymer scaffold were transplanted into osteochondrogenic defects of the patellar groove and compared with empty defects and transplants of polymer scaffolds without cells. The histological and histochemical analysis was performed after 4 and 12 weeks. The transplant integration and the architecture of the newly formed cartilage were evaluated with a semiquantitative score. After 4 weeks the development of a hyaline-like cartilage tissue of the cell-polymer-transplants was observed, after 12 weeks the defects were nearly completely filled with hyaline-like cartilage. The biodegradation of the polymer construct did not affect the histological structure of the transplant area. Defects of the groups with empty defect and polymer transplants without cells revealed no or insufficient healing indices. The study demonstrated that biodegradable polymers served as suitable carriers for the chondrocyte transplantation, which is due to the in-vitro establishment of a semi-solid cartilage transplant and the resulting effective transplant fixation into the defect. In vivo the polymer cell transplants seem to provide a supportive microenvironment for the development of hyaline cartilage. The controlled release of morphogenic factors or bioactive molecules and the use of pluripotent mesenchymal progenitor cells opens new perspectives for the optimization of cartilage repair procedures.

Key words

Chondrocyte transplantation · Tissue engineering · Bioresorbable polymers

bilität notwendig [4]. Diese Zell-Matrix-Interaktionen beeinflussen über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, vermittelt über zelluläre Adhäsionsmoleküle, direkt Morphologie und Funktion der Zellen, wie beispielsweise Proliferation, phänotypische Differenzierung und Matrixsynthese [24]. Sie stellen somit einerseits einen essentiellen Parameter für die Herstellung eines funktionellen Knorpeltransplantats dar, sind jedoch andererseits auch für die operative Handhabbarkeit, die Transplantatintegration in das Wirtsgewebe und für die immunologische Privilegierung allogener und xenogener Zellen entscheidend [2].

Unterschiedliche Matrixsubstanzen, wie Agarosegel, Kollagen, Fibrin, Alginat, Hyaluronsäure und deren Kombinationen, wurden daher auf der Suche nach den optimalen Bedingungen zur Chondrozytendifferenzierung und nachfolgenden Transplantation verwendet [19]. Eine alternative Technik ist die Kultivierung isolierter Chondrozyten in unterschiedlichen Matrixsubstanzen (z. B. Agarose, Fibrin) auf resorbierbaren Polymergerüsten [22, 23, 27, 28].

Diese atoxischen, bioresorbierbaren und biodegradablen Polymere besitzen eine gute mechanische Stabilität und ermöglichen den Erhalt des Phänotyps, da sie ein supportives zelluläres Mikromilieu für die chondrozytäre Differenzierung bieten [22, 23, 27, 28]. Zudem zeigen diese eine hohe Formvariabilität und erlauben die gezielte Modifikation der In-vitro-Transplantgeneration durch die kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren [1, 10]. Infolge der höheren mechanischen Stabilität gegenüber flüssigen und gelartigen Träger-substanzen erscheinen auf diese Weise in vitro präformierte Gewebe zudem einfach und mit hoher Sicherheit am Transplantationsort fixierbar.

Unklar ist gegenwärtig jedoch, welche Auswirkungen die schnellere Biodegradation des Trägermaterials auf die Zelladhäsion, die Transplantatintegrität und die Transplantatintegration in vivo hat. In der vorliegenden Studie wurde ein synthetisches Polymerkonstrukt auf der Basis von L-Milchsäure und Glycolsäure auf seine Tauglichkeit als chondrozytäre Trägerstruktur analysiert und die Potenz der in vitro amplifizierten und nachfolgend in dem Polymerkonstrukt kultivierten Chondrozy-

ten zur Knorpelregeneration untersucht. Weiterhin sollte die Technik der Implantation synthetischer Polymere in Gelenkknorpeldefekte des Kaninchens etabliert werden.

Material und Methode

Polymervliese

Für die vorliegenden Versuche wurde Ethisorb® (Ethicon, Norderstedt) verwendet. Dabei handelt es sich um ein ungewebtes Material, welches aus resorbierbarem poly[lactid-co-glycolic] acid (PGLA) besteht. Zusätzlich ist in einem geringen Prozentsatz Polydioxanon enthalten. Durch die Verwendung als Nahtmaterial haben sich die Bestandteile seit vielen Jahren in den chirurgischen Fachgebieten bewährt. Eine starke Degradation des Ethisorbs® in vitro beginnt nach ca. 3 Wochen [23]. Zylindrische Vliese mit einer Dicke von 2 und einem Durchmesser von 4 mm wurden für diese Versuche eingesetzt.

Isolation der Chondrozyten

Der Knorpel des Hüft- und Kniegelenks von 6 Monate alten weißen Neuseeland-Kaninchen wurde disseziert und unter sterilen Bedingungen in Ham's F-12 (Seromed, Berlin) unter Zusatz von Nystatin gesammelt. Der hyaline Knorpel wurde über 12 h durch 2 mg/ml Kollagenase P (Boehringer, Mannheim) in Ham's F-12 unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (Seromed), 100 IE/ml Penicillin, und 100 µg/ml Streptomycin verdaut. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann durch einen 100 µm Polyesterfilter (Estal mono, Thal, Schweiz) gegeben und 3mal mit Ham's F-12 gewaschen. Die isolierten Zellen wurden 3mal passagiert und nachfolgend für die Transplantatpräparation verwendet.

Tissue engineering

Zunächst wurde unter Verwendung der Trypan-blau-Färbung mit einem Hämozytometer die Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Für die Präparation des Zell-Fibrin-Gemisches wurde eine 24-Well-Platte (Costar, Cambridge, USA) verwendet. Die in Ham's F-12 Medium suspendierten Zellen wurden danach mit der Fibrinogenkomponente eines Gewebeklebers (Tissucol Duo S® – Immu-

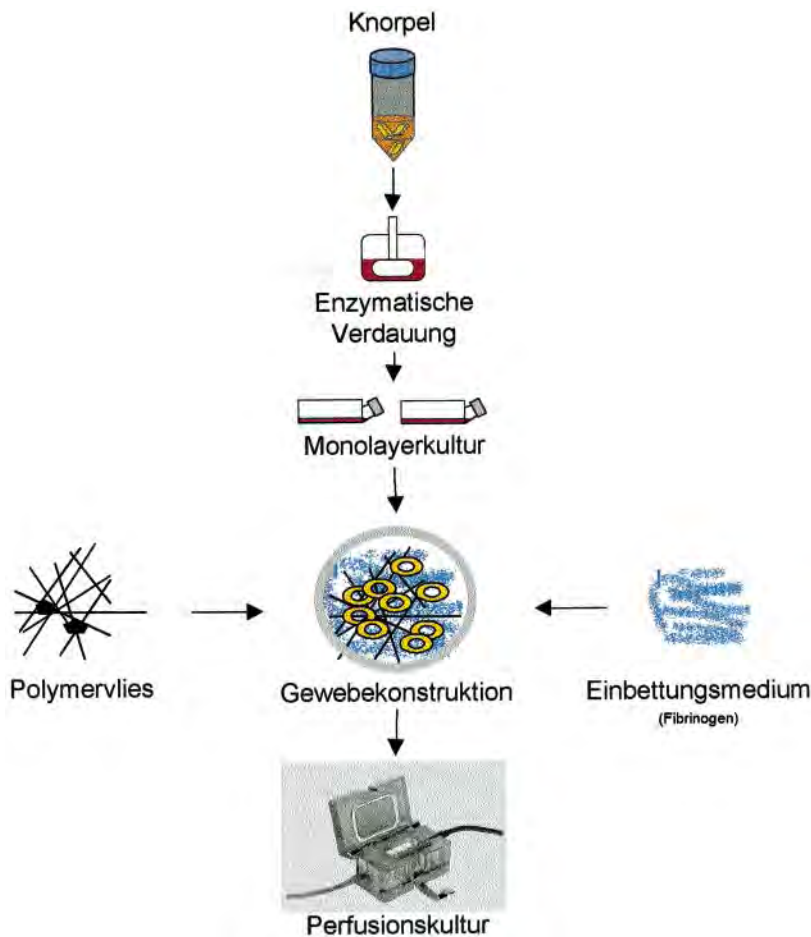


Abb. 1 ▲ Prinzip der Herstellung von Knorpeltransplantaten (Tissue engineering)

no, Heidelberg) im Verhältnis 3:1 gemischt. Diese Zellsuspension wurde nachfolgend auf runde Ethisorb-Vliese mit einem Durchmesser von 4 mm gebracht (Abb. 1). Die Polymerisation erfolgte mit einer Thrombinlösung (Tissucol Duo S®) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Die Zell-Polymer-Transplantate wurden nachfolgend für 2 Wochen in einer speziellen Perfusionskammer für dreidimensionale Matrixsysteme kultiviert (Minucells and Minutissue GmbH, Bad Abbach) (Abb. 2).

Operation

Bei 24 Kaninchen wurden insgesamt 48 Knorpeldefekte in standardisierter Technik gesetzt. Die Tiere wurden durch i. m.-Applikation von 0,4 ml/kg Hypnorm® (10 mg/ml Fluanisone/0,315 mg/ml Fentanyl) 25 min vor der Operation anästhesiert. Nach einem medialen parapatellären Zugang wurde die Patella

luxiert und die Femurkondyle dargestellt. Durch eine Hohlfräse wurde ein 4 mm großer osteochondraler Defekt in der femoralen Gleitbahn der Patella gesetzt (Abb. 3). Die Tiere wurden in 3

Gruppen, eine experimentelle Gruppe und 2 Kontrollgruppen geteilt. In den Defekten der experimentellen Gruppe wurden die Chondrozyten-PGLA-Vliese mit Fibrinkleber (Tissucol Duo S®) fixiert. In der ersten Kontrollgruppe erfolgte die Defektfüllung mit einem Ethisorb-Vlies ohne Zellen, in der zweiten blieben die Defekte leer. Anschließend wurde die Patella reponiert und die Wunde mit Vicryl-Nähten (Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Nach 4 bzw. 12 Wochen wurden die Tiere getötet.

Histologische und histochemische Untersuchung

Die Gelenke wurden makroskopisch untersucht und die Weichteile nachfolgend von den Femurkondylen entfernt. Sofort anschließend wurden die Femora in 4 % Formaldehyd-PBS-Lösung (pH 7,2) mit 0,5 % Cetylpyridiniumchlorid fixiert. Nach der Dekalzifizierung erfolgte die Dehydrierung mit Ameisensäure und danach die Einbettung der Präparate in Paraffin. Die 5 µm dicken, transversalen Schnitte des distalen Femur wurden jeweils mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Masson-Goldner und Alcian blau (pH 1,0) gefärbt.

Heilungsindices

Die Schnitte wurden von 2 unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis der Defektbehandlung untersucht. Alle Defekte wurden entsprechend dem histologischen Score nach Wakitani [30] klassifiziert (Tabelle 1). Dabei wurde

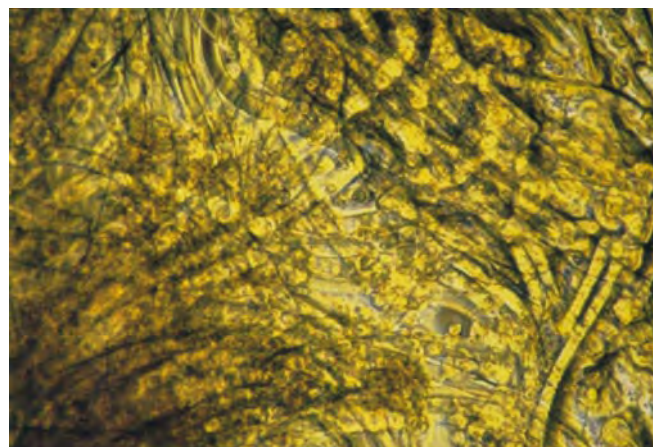


Abb. 2 ▲ Darstellung der auf einem PGLA/Polydioxanon-Vlies kultivierten Chondrozyten in vitro

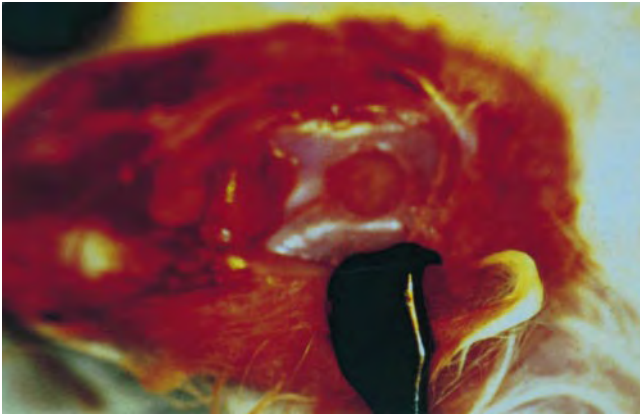


Abb. 3 ▲ Makroskopisches Bild eines Knorpeldefekts der Femurkondyle nach Transplantation eines mit Chondrozyten besiedelten PGLA/Polydioxanon-Vlieses

das Implantat in 5 Kategorien beurteilt: Zellmorphologie, Matrixfärbung, Oberflächenregularität, Knorpeldicke und Transplantatintegration.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Resultate erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse

Makroskopische Beobachtungen

Alle Tiere zeigten nach 7 Tagen ein unauffälliges Gangbild. Wundheilungsstörungen wurden nicht beobachtet.

In der experimentellen Gruppe der Chondrozytentransplantate fanden sich bei der Übersichtsuntersuchung keine Hinweise auf degenerative Veränderungen, Arthrosezeichen, entzündliche Reaktionen, synoviale Proliferationen oder Knorpeldestruktionen. Nach 4 Wochen waren die Defekte komplett mit weichem, weißen knorpelähnlichen Gewebe gefüllt, welches die Oberfläche bereits nahezu vollständig wiederhergestellt hatte. Der Originaldefekt war jedoch deutlich gegenüber der Umgebung abgrenzbar. Nach 12 Wochen war die Abgrenzung der Defektränder gegenüber dem normalen Knorpel deutlich erschwert. Das Implantat erschien vollständig in den umgebenden Knorpel integriert.

Im Gegensatz dazu, beobachteten wir in den Kontrollgruppen in der Umgebung des Defekts Zeichen der Knor-

pelerosion. Die Defekte nach Implantation eines Polymervlieses waren klar abgrenzbar und mit einem weiß-grauen Gewebe nahezu vollständig gefüllt. Die Leerdefekte waren mit einem dunklen,

matten gelblichen Gewebe gefüllt. Nach 12 Wochen war eine unregelmäßige Defektoberfläche bei nur partieller Füllung mit Bindegewebe zu verifizieren. Die Defektzone erschien infolge der Erosion des angrenzenden Knorpels vergrößert. Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen wurden zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet.

Histologie

Experimentelle Gruppe

4 Wochen nach der Operation waren die Defekte mit hyalinartigem Knorpelgewebe gefüllt. Dabei wurde eine hohe Zelldichte und eine uniforme Verteilung der transplantierten Chondrozyten gefunden (Abb. 4). Durch die hohe Chondrozytendichte bedingt, war das Matrix-Zellverhältnis herabgesetzt. Die Oberfläche der Patellargrube war histologisch nur unvollständig wiederhergestellt. Der neu geformte

Tabelle 1

Histologischer Score für Knorpeldefekte nach Wakitani [30]

Kategorie	Punkte
Zellmorphologie	
Hyaliner Knorpel	0
Überwiegend hyaliner Knorpel	1
Überwiegend Faserknorpel	2
Überwiegend kein Knorpel	3
Kein Knorpel	4
Matrixfärbung (Metachromasie)	
Normal (im Vergleich zum normalen Knorpel)	0
Gering reduziert	1
Deutlich reduziert	2
Keine Metachromasie	3
Oberflächenregularität	
Glatt ($> \frac{3}{4}$)	0
Moderat ($> \frac{1}{2} - \frac{3}{4}$)	1
Irregulär ($\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$)	2
Hochgradig irregulär ($< \frac{1}{4}$)	3
Knorpeldicke	
$> \frac{2}{3}$	0
$\frac{1}{3} - \frac{2}{3}$	1
$< \frac{1}{3}$	2
Integration des Transplantats im Empfängerknorpel	
Beide Ränder integriert	0
Ein Rand integriert	1
Kein Rand integriert	2
Maximale Punktzahl	14

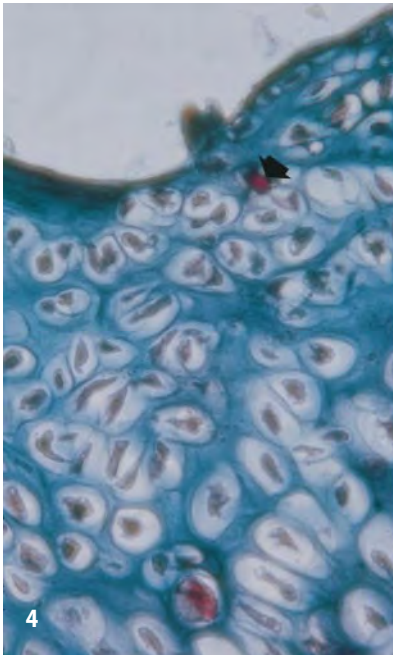


Abb. 4 ▲ Knorpeldefekt 4 Wochen nach Implantation eines PGLA/Polydioxanon-Vlieses mit kultivierten allogenen Chondrozyten. Hohe Zelldichte der transplantierten Chondrozyten. Nachweis von Faserresten (Pfeil) (Originalvergr.: 400:1, Masson-Goldner)

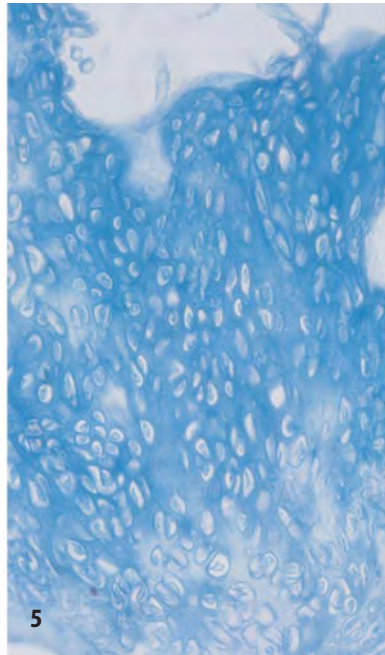


Abb. 5 ▲ Nachweis der Glycosaminoglycansynthese 4 Wochen nach Transplantation allogener Chondrozyten in einem Polymervlies (Originalvergr.: 100:1, Alcian blau)

Knorpel grenzte direkt an den Wirtsknorpel.

Im Vergleich zu normalem Knorpel war eine deutlich stärkere interzelluläre Matrixfärbung mit Alcian blau zu beobachten (Abb. 5). Eine Anzahl mononukleärer und Riesenzellen fand sich an der Grenze des Transplantats zum subchondralen Knochen (Abb. 6). Das Polymer war weitestgehend resorbiert. Beginn der Knorpel-Knochen-Transfor-

mation in den tieferen Defektzonen (Abb. 7). Die Resultate des histologischen Scores der experimentellen Gruppe unterschieden sich nach 4 Wochen signifikant von den Resultaten der Kontrollgruppen ($p < 0,05$; Tabelle 2).

Nach 12 Wochen wurde eine komplette Füllung des Defektes mit hyalinartigem Knorpelgewebe beobachtet (Abb. 8). Das Transplantat hatte direkten Kontakt zum Knochen und zum ori-

ginalen Knorpel. Die Chondrozyten insbesondere in den tieferen Regionen des Transplantats unterlagen einer Clusterbildung und progredienten Hypertrophie. Im oberen Transplantatbereich zeigten die Zellschichten eine zunehmende spindelförmige Morphologie. Die Alcianblau-Färbung war weniger intensiv als 4 Wochen nach der Implantation. In den Masson-Goldner-Färbungen konnte eine diskrete Akkumulation von perizellulär befindlichem Kollagen nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Polymere vollständig resorbiert. Nekrosen oder Granulationsgewebe wurden nicht beobachtet. Die histologischen Resultate der experimentellen Gruppe unterschieden sich signifikant von den Ergebnissen der Kontrollgruppen nach 12 Wochen ($p < 0,05$; Tabelle 2).

Kontrollgruppen

Ethisorb-Vliese ohne Zellen; unbehandelte Defekte. Zu beiden Zeitpunkten fanden sich keine markanten Differenzen zwischen den beiden Kontrollgruppen. Keiner der Defekte heilte mit hyalinartigem Gewebe. 4 Wochen nach der Transplantation war ein weiches, den Defektgrundfüllendes Gewebe in der Gruppe der Leerdefekte und in das Polymer einwachsendes Bindegewebe in der anderen Kontrollgruppe nachweisbar (Abb. 9). Nach 12 Wochen zeigten die Leerdefekte Fasergewebe mit spindelförmigen Fibroblasten und nur wenig metaplastischem Knorpel, währenddessen die mit dem Polymer gefüllten Defekte mit unregelmäßig geformtem Fa-

Tabelle 2

Resultate des histologischen Scores nach Wakitani. Entsprechend der Feststellung von Wakitani [30] wurde eine statistische Analyse nicht durchgeführt, da der Score nicht linear angelegt bzw. zwischen den 5 Kategorien vergleichbar ist

Defektfüllung	Zeit nach der Implantation [Wochen]	Zellmorphologie	Matrixfärbung	Oberflächenregulartät	Knorpeldicke	Transplantatintegration	Gesamt [Punkte]
Experimentelle Gruppe	4	0,8	0,5	1,0	0,7	0,2	3,2
	12	0,9	0,3	0,6	0,4	0,6	2,8
Kontrollgruppe I (Polymervlies ohne Zellen)	4	3,9	2,5	1,4	2,1	1,2	11,1
	12	3,2	2,2	1,7	1,6	0,5	9,2
Kontrollgruppe II (Leerdefekte)	4	3,8	2,6	2,6	2,0	1,9	12,9
	12	3,2	2,4	2,0	1,7	1,3	10,6

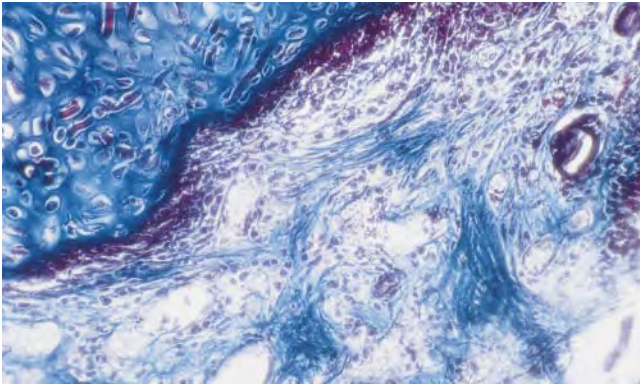


Abb. 6 ▲ **Akkumulation von mononukleären und Riesenzellen um den Defekt 4 Wochen nach Transplantation der Zell-/Polymerkonstrukte. Kein Nachweis einer Zellmigration in den Defekt (Originalvergr. 200:1, Masson-Goldner)**

serknorpel gefüllt waren. Zu beiden Zeitpunkten nach der Transplantation war nur eine minimale metachromatische Färbung mit Alcianblau nachweisbar. Die Polymere waren nach 4 Wochen partiell und nach 12 Wochen vollständig resorbiert. Eine Rekonstruktion des subchondralen Knochens wurde nicht beobachtet.

Erfolgsrate

Die Transplantation wurde als erfolgreich definiert, wenn der Defekt mit einem hyalinartigen Knorpelgewebe gefüllt war. Die Erfolgsrate in der experimentellen Gruppe nach 4 Wochen betrug 80 % (6 von 8) und nach 12 Wochen 100 % (8 von 8). In den beiden Kontrollgruppen war, wie oben beschrieben, kein Nachweis von hyalinartigem Knorpel möglich.

Diskussion

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt, dass tiefe Knorpeldefekte nach Transplantation allogener Chondrozyten in PGLA/Polydioxanon-Vliesen mit hyalinartigem Knorpelgewebe heilen. Der Vorteil der Verwendung von bioresorbierbaren Vliesen besteht in der resultierenden besseren mechanischen Stabilität, da nach der Kultivierung ein semisolides Transplantat zur Verfügung steht. Bereits die Transplantation der Chondrozyten erfolgt in ihrer eigenen Matrix, was die Vulnerabilität der Zellen gegenüber Einflüssen aus der Umgebung herabsetzt [15].

Das Einkleben der semisoliden Implantate stellt eine einfache und sichere Möglichkeit der Implantatfixation dar. Dagegen beobachteten andere Autoren eine häufige Herauslösung der verwendeten gelartigen Matrixsubstanzen [20].

Bei der gegenwärtig etablierten, kommerziell genutzten Methode nach Brittberg [5] wird eine liquide Matrix verwendet, da eine homogenere Verteilung der Zellen im Transplantat postuliert wird. Daraus resultiert die Notwendigkeit, zunächst einen Periostlappen in den den Defekt umgebenden Knorpel einzunähen. Nachfolgend wird eine die amplifizierte, kultivierte Zellen enthaltende Suspension unter den Periostlappen injiziert.

Nachteile sind das zusätzliche Trauma des umgebenden Knorpels sowie Probleme an der Entnahmestelle des Periostlappens und dessen mögliche Ab-

lösung. Zudem zeigt Brittbergs Technik trotz generell guter Ergebnisse einige Fälle mit zentralem Substanzverlust, was auf die ungenügende Fixierung der implantierten Chondrozyten im Defekt zurückgeführt wird [15].

Unsere Studie zeigt, dass auch bei der Verwendung von PGLA/Polydioxanon-Vliesen die Zellen im Implantat homogen verteilt sind. Der Vorteil besteht jedoch in der einfachen Fixierung des semisoliden Transplantats durch Einkleben in den Defekt. In der vorliegenden Arbeit wurde in keinem Fall das Herauslösen des ab dem ersten postoperativen Tag mechanisch belasteten Implantats beobachtet. Daraus ist zu schließen, dass der Abbau der Polymere durch die simultane Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine ausgeglichen wird, so dass kein Verlust an mechanischer Stabilität eintritt [11]. Die verwendeten biodegradierbaren PGLA/Polydioxanon-Vliese erhalten gleichzeitig die spezifische zelluläre Architektur der Chondrozyten und ermöglichen die Synthese von knorpeltypischen Matrixsubstanzen wie Typ-II-Kollagen und Proteoglycanen [28]. Neueste Arbeiten zeigen, dass das Gesamtmodul von in vitro gezüchtetem Knorpel unter Verwendung von Polymervliesen bereits 40 % des normalen Knorpels erreicht und damit das höchste bisher für in vitro gezüchtete Knorpel ist; zugleich bleiben die Zellularität, die Zellgröße und die Permeabilität konstant [16].

4 Wochen nach der Implantation waren in allen Fällen noch Reste der Faserstrukturen nachweisbar, nach 12 Wochen waren diese vollständig resorbiert.

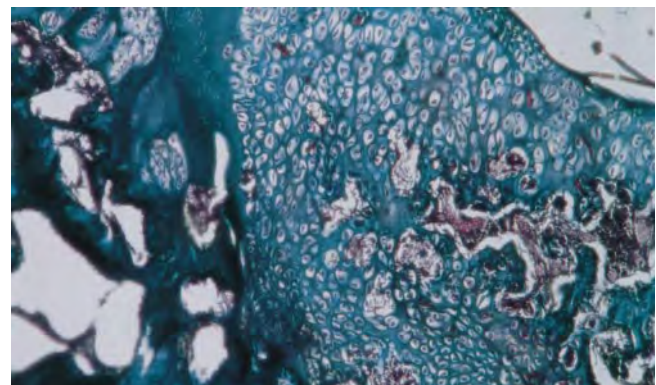


Abb. 7 ▲ **Bereits 4 Wochen nach der Transplantation der Chondrozyten im bioresorbierbaren Polymer Nachweis des Transplantatumbaus durch einwachsende mesenchymale Zellen (Originalvergr. 100:1, Masson-Goldner)**

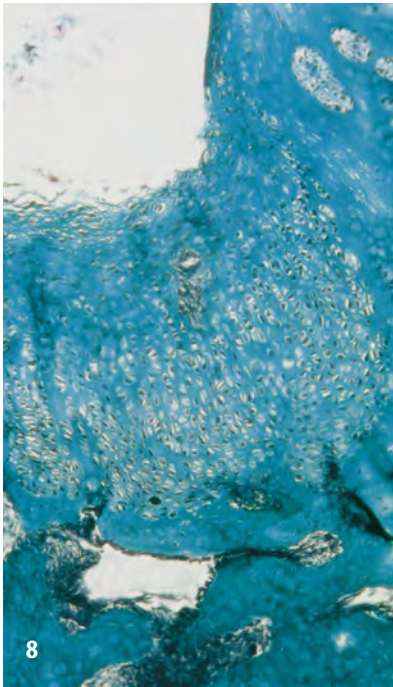


Abb. 8 ▲ Knorpeldefekt 12 Wochen nach Transplantation allogener Chondrozyten auf einem PGLA/Polydioxanon-Vlies. Defektfüllung mit hyalinartigem Knorpel und nahezu vollständige Wiederherstellung der Regularität der Oberfläche (Originalvergr. 100:1, Masson-Goldner)

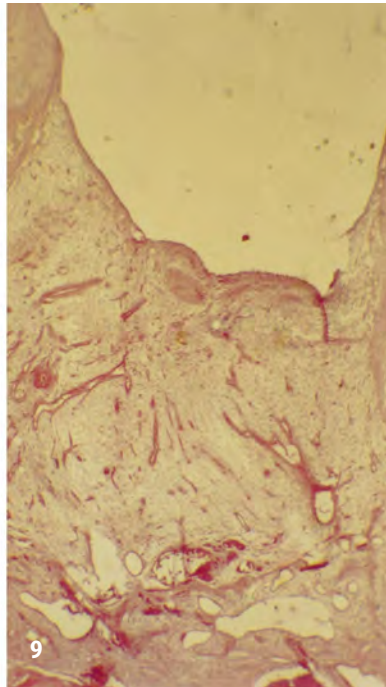


Abb. 9 ▲ Defekt 12 Wochen nach Transplantation eines Polymervlieses ohne Zellen. Nachweis einer deutlichen Defektheilung (Originalvergr. 30:1, HE)

Eine Ansammlung mononukleärer Zellen um den Defekt infolge der Degradation der polymeren Grundsubstanz konnte 4 Wochen nach der Implantation gezeigt werden. Eine Zellmigration in den Defekt wurde jedoch in keinem Fall gefunden; 12 Wochen nach der Operation waren keine Entzündungszellen mehr um den Defekt zu beobachten, da die Polymere bereits vollständig resorbiert waren. Polymervliesstrukturen haben den Vorteil einer sehr geringen Materialmenge pro Gewebevolumen, so dass die Belastung des Gewebes durch die Polymerdegradation minimiert wird. Eine gute Biokompatibilität des biodegradierbaren Polymers wurde auch beim experimentellen [3] und klinischen Einsatz [25] in Form von Schrauben gefunden.

Die Implantation der bioresorbierbaren Polymere allein führt ebenso wie die Defektreparatur in den Leerdefekten nicht zur Bildung von hyalinem Knorpel. In jedem Fall erfolgte die Defektreparatur mit Faserknorpel. Diese Reparatur ist Folge der Migration mesenchymaler Zellen in den Defekt, was zur Re-

organisation von funktionell minderwertigem Gewebe sowohl in Leerdefekten [21] als auch nach Implantation eines Polymers führt [27]. Der gebildete Faserknorpel ist instabil und führt zum Fortschreiten der Degeneration [14]. Beide Kontrollgruppen zeigten in der semiquantitativen Beurteilung vergleichbare Ergebnisse, wenngleich nach Implantation der Polymere eine vollständigere Füllung der Defekte nachweisbar war. Jedoch erfolgte nur nach Transplantation der Chondrozyten unter Berücksichtigung der Zellarchitektur, der Proteoglycansynthese und der Kollagensynthese die Defektheilung mit hyalinartigem Knorpel.

Nach 4 Wochen wurde in 75 % und nach 12 Wochen in 100 % der Fälle die Heilung mit hyalinartigem Knorpel beobachtet.

Individuelle Unterschiede zwischen den Tieren in allen Gruppen können Resultat einer unterschiedlichen Defekttiefe sein, da hiermit die Migrationsmöglichkeit von Knochenmarkstammzellen und immunologischen Zellen beeinflusst wird.

Fazit für die Praxis

Resorbierbare Polymervliese stellen ein exzellentes Matrixsystem für die Transplantation isolierter Chondrozyten und deren Fixierung im Defekt dar. Neuere Ergebnisse zur Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion im Hinblick auf die Zelldifferenzierung und Homöostase unter Verwendung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren lassen perspektivisch noch effizientere Möglichkeiten für das Tissue engineering des Gelenkknorpels erwarten [7, 26]. Insbesondere die Bindung dieser Wachstums- und Differenzierungsfaktoren an bioresorbierbare Polymere und die daraus resultierende prolongierte Freisetzung dieser Faktoren ermöglicht die Optimierung der Knorpeltransplantation. Langzeitversuche sind jedoch zur Beurteilung der Rekonstruktion des subchondralen Knochens und des Aufbaus der knorpelspezifischen Architektur sowie der daraus resultierenden mechanischen Belastbarkeit notwendig.

Literatur

1. Agrawal CM, Pennick A, Wang X, Schenck RC (1997) **Porous-coated titanium implant impregnated with a biodegradable protein delivery system.** J Biomed Mater Res 36: 516–521
2. Alsalameh S, Mollenhauer J, Hain N, Stock KP, Kalden JR, Burmester GR (1990) **Cellular immune response toward human articular chondrocytes. T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases.** Arthr Rheum 33: 1477–1486
3. An YH, Friedman RJ, Powers DL, Draughn RA, Latour RA Jr. (1998) **Fixation of osteotomies using bioabsorbable screws in the canine femur.** Clin Orthop 355: 300–311
4. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P (1994) **Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads.** Exp Cell Res 212: 97–104
5. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.** N Engl J Med 331: 889–895
6. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L (1996) **Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes.** Clin Orthop 326: 270–283
7. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) **Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.** Instr Course Lect 47: 477–486

Das Verhalten der Weichteilstrukturen bei der operativen Beinverlängerung

Orthopäde (1999) 28: 1007–1014

Im englischen Summary des o. g. Beitrags erschien durch ein Versehen ein sinnentstellendes Wort. Im 2. Satz muß das Wort „vessels“ durch „tendons“ ersetzt werden. Das korrigierte Summary wird hier noch einmal wiedergegeben.

Summary

Experimental animal studies and clinical investigations show three processes going on during extremity lengthening with the Ilizarov-method. At first degenerative changes including cell necroses in the muscles, the nerves and the tendons occur as well as denervation of muscle fibers resulting in neurogenous muscle atrophies. These alterations are followed by reparative and regenerative processes as well as the reinnervation of the denervated muscle fibers. Secondly histoneogenesis occur which leads to a high increase of tissue-specific cells and a growth of the muscles, tendons and vessels. Therefore tensile-stress is an important factor of tissue growth. Thirdly adaptive processes precede during leg lengthening. For example the high biosynthetic activity during tissue growth seems to indicate an increase of vasa vasorum.

8. Campbell CJ (1969) **The healing of cartilage defects.** Clin Orthop 64: 45–63
9. Chesterman PJ, Smith AU (1968) **Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits.** J Bone Joint Surg Br 50: 184–197
10. Davies MJ, Mitchell CA, Maley MA et al. (1997) **In vitro assessment of the biological activity of basic fibroblast growth factor released from various polymers and biomaterials.** J Biomater Appl 12: 31–56
11. Freed LE, Vunjak Novakovic G, Langer R (1993) **Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors.** J Cell Biochem 51: 257–264
12. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM (1997) **Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair.** J Bone Joint Surg Br 79: 831–836
13. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) **Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee.** J Bone Joint Surg Am 62: 79–89
14. Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) **Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane.** J Bone Joint Surg Am 78: 721–733
15. Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI, Shino K, Ochi T (1998) **Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it.** Acta Orthop Scand 69: 56–62
16. Ma PX, Langer R (1999) **Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage.** J Biomed Mater Res 44: 217–221
17. Mankin HJ (1982) **The response of articular cartilage to mechanical injury.** J Bone Joint Surg Am 64: 460–466
18. Mitchell N, Shepard N (1976) **The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone.** J Bone Joint Surg Am 58: 230–233
19. Perka C, Lindenhayn K, Heilmann HH, Sittlinger M, Muschik M (1996) **Experimentelle Untersuchungen mechanisch induzierter Gelenkknorpeldefekte nach Implantation allogener embryonaler Chondrozyten in einem Kollagen-Fibrin-Gel beim Huhn.** Z Orthop 134: 562–572
20. Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R (1998) **Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits.** Osteoarthr Cartil 6: 50–65
21. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) **Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage.** J Bone Joint Surg Am 75: 532–553
22. Sittlinger M, Bujia J, Hammer C, Minuth WW, Burmester G-R (1994) **Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture.** Biomaterials 15: 451–456
23. Sittlinger M, Reitzel D, Dauner M et al. (1996) **Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes.** J Biomed Mater Res 33: 57–63
24. Sokoloff L (1976) **Articular chondrocytes in culture: matrix production and hormonal effects.** Arthr Rheum 19 [Suppl 3] 426–429
25. Stahelin AC, Weiler A, Rufenacht H, Hoffmann R, Geissmann A, Feinstein R (1997) **Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: a report of six cases.** Arthroscopy 13: 238–244
26. Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K (1998) **Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review.** Semin Arthr Rheum 27: 392–399
27. Vacanti CA, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti JP (1994) **Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures.** Am J Sports Med 22: 485–488
28. Vacanti CA, Upton J (1994) **Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices.** Clin Plast Surg 21: 445–462
29. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) **Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.** J Bone Joint Surg Am 76: 579–592
30. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K (1989) **Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel.** J Bone Joint Surg Br 71: 74–80