

# Die Knorpeltransplantation mit bioresorbierbaren Polymeren im tierexperimentellen Modell\*

S. Stern, K. Lindenhayn, C. Perka

## Einleitung

Eine der großen Herausforderungen zu Beginn des neuen Jahrhunderts ist die erfolgreiche Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. Die biologische Rekonstruktion pathologisch veränderter Gelenkknorpelflächen mit Hilfe von Knorpeltransplantaten könnte schließlich sogar eine Alternative zum endoprothetischen Gelenkersatz darstellen [8]. Grundlegendes Prinzip der verschiedenen Strategien, welche dieses Ziel verfolgen, ist die Integration vitaler Zellen in den Knorpeldefekt, um die originäre Gewebetextur und seine funktionellen Eigenschaften annähernd wiederherzustellen.

In einem ersten Schritt erfolgt die Vervielfachung der in begrenzter Zahl verfügbaren Zellen und die nachfolgende phänotypische Stabilisierung in einem geeigneten Trägerkonstrukt, wie es z.B. atoxische, biodegradierbare Polymervliese sind, welche durch ein supportives Mikromilieu die Differenzierung der Chondrozyten unterstützen [15–17, 20–22]. Polymervliese zeigen eine hochgradige Formvariabilität und ermöglichen durch Zusatz und kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren eine spezifische Modifizierung des *in vitro* präformierten Transplantats. Es resultiert eine hohe mechanische Stabilität bei sicherer Fixation des Transplantats am Transplantationsort. Im Vergleich mit anderen Trägermatrices, wie z.B. Fibrin und Kollagen, werden Polymere nur langsam resorbiert, wodurch die Transplantatstabilität aufgrund der simultanen Synthese der spezifischen zellulären Matrix ständig gegeben ist [5].

Für die potentielle klinische Anwendung ist allerdings ein zeitliches Intervall zwischen Zellentnahme und autologer Retransplantation

wünschenswert. Neben einer hohen therapeutischen Flexibilität könnte dadurch die Bereitstellung autologer Transplantate mittels Zell- und Gewebekbanken erforderlich werden. Bei Verwendung konservierender Verfahren muss jedoch die Vitalität und phänotypische Stabilität der Zellen erhalten bleiben. Obwohl die Kryokonservierung von intaktem Knorpelgewebe zur irreversiblen Schädigung von Chondrozyten führt [3, 10], bleibt die Synthese knorpelspezifischer Matrixmakromoleküle (Kollagen Typ II, Proteoglykane) durch kryokonservierte isolierte Chondrozyten über einen langen Zeitraum erhalten [13]. Klinisch zeigten kryokonservierte osteochondrale Transplantate eine deutliche Degeneration der Knorpelschicht mit entsprechenden Veränderungen in der Ultrastruktur [7, 18]. *In vitro* Untersuchungen an kryokonservierten Chondrozyten haben des Weiteren trotz unveränderter Vitalität und Proteoglykansynthese der Zellen im Vergleich mit unbehandelten Chondrozyten eine reduzierte mechanische Integrität des synthetisierten Knorpels nachgewiesen [19]. Über den Einfluss der Kryokonservierung auf Chondrozytentransplantate liegen bisher keine Ergebnisse vor.

In dieser Studie wurde daher die Rekonstruktion von Gelenkknorpeldefekten durch Chondrozyten, welche in einem PGLA-Polymervlies eingebettet wurden, beurteilt. Ferner wurde die Auswirkung einer vorangehenden Kryokonservierung auf die Transplantatintegration im Vergleich mit nativen Zelltransplantaten detailliert bewertet.

## Methode

28 sechs Monate alte männliche Kaninchen mit insgesamt 56 Knorpeldefekten wurden in die Studie eingeschlossen. Je Kniegelenk wurde ein Defekt gesetzt. Die Kaninchen wurden randomi-

\* Diese Studie wurde finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (BU 445-5/1) sowie die Steinbeiss-Stiftung (ER 6800)

siert in 4 Gruppen eingeteilt. Die Defekte wurden entweder 4 oder 12 Wochen nach der Operation makroskopisch und mikroskopisch beurteilt.

■ **Polymervliese.** Für die vorliegenden Versuche wurden Ethisorb®-Zylinder mit einer Dicke von 2 mm und einem Durchmesser von 4 mm (Ethisorb, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Ethisorb® ist ein ungewebtes Material, welches aus resorbierbarem PGLA (= poly[lactid-co-glycolic]acid) 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 relevante Degradation des Ethisorb® *in vitro* beginnt nach ca. 3 Wochen [22].

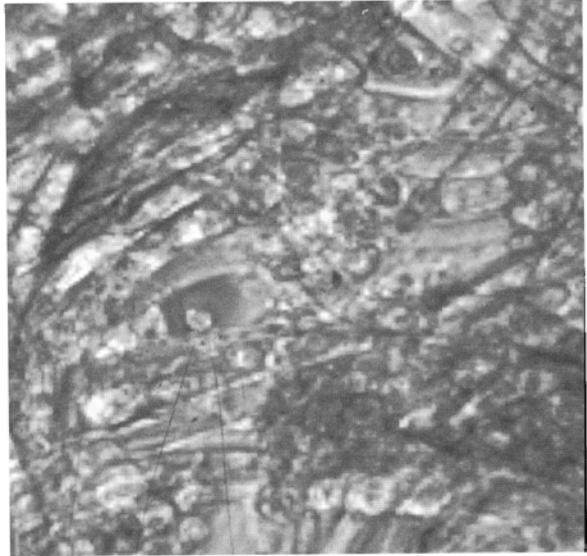


Abb. 1. Darstellung der auf einem PGLA-Vlies kultivierten Chondrozyten

■ **Isolation der Chondrozyten.** Der Knorpel des Hüft- und Kniegelenkes von sechs Monate alten weißen Neuseeland-Kaninchen wurde dissektiert und unter sterilen Bedingungen in Ham's F-12 (Seromed, Berlin, Deutschland) unter Zusatz von Nystatin gesammelt. Der hyaline Knorpel wurde über 12 Stunden durch 2 mg/ml Kollagenase P (Boehringer, Mannheim, Deutschland) in Ham's F-12 unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Seromed, Berlin, Deutschland), 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 dreimal mit Ham's F-12 gewaschen. Die isolierten Zellen wurden in zwei Gruppen eingeteilt: die Zellen der Gruppe I, welche nicht kryokonserviert wurden, wurden dreimal passagiert und nachfolgend für die Transplantatpräparation verwendet; die Zellen der Gruppe II wurden zunächst in 10% Dimethylsulfoxid inkubiert, bei -80°C für 8 Wochen kryokonserviert und anschließend nach schnellem Auftauen in Kulturschalen ausgesät.

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® - Immuno, Heidelberg, Deutschland) in Phosphat-gepufferter 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, Deutschland) [9].

■ **Operation.** Bei 28 Kaninchen wurden insgesamt 56 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 Minuten vor der Operation anästhesiert. Nach einem medialen parapatellaren 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. Die Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt:

- 1) PGLA-Vliese mit nativen allogenen Zellen,
- 2) PGLA-Vliese mit kryokonservierten allogenen Zellen,
- 3) PGLA-Vliese ohne Zellen,
- 4) Leerdefekte mit Fibrinkleber. Die Transplantate wurden in den Defekten mit Fibrinkleber (Tissucol Duo S® - Immuno, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Anschließend wurde die

■ **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 Fibrinogen-Komponente eines Gewebeklebers (Tissucol Duo S® - Immuno, Heidelberg, Deutschland) im Verhältnis 3:1 gemischt.

Patella reponiert und die Wunde mit Vicryl®-Nähten (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Nach 4 bzw. 12 Wochen wurden die Tiere getötet.

#### ■ Histologische und histochemische Untersuchung.

Die Gelenke wurden makroskopisch untersucht und die Weichteile anschließend von den Femurkondylen entfernt. Die Femora wurden in 4% Formaldehyd-PBS-Lösung (pH 7,2) mit 0,5% Cetylpyridiniumchlorid fixiert. Nach der Dekalzifizierung erfolgte die Dehydrierung mit Ameisensäure und anschließend 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 des histologischen Scores nach Wakitani et al. [23] und Pineda et al. [11] klassifiziert (Tabelle 1). Dabei wurde das Implantat in 5

**Tabelle 1.** Histologischer Score für Knorpeldefekte nach Pineda und Wakitani [11, 23]

Kategorie	Punkte
■ <b>Zellmorphologie</b>	
hyaliner Knorpel	0
überwiegend hyaliner Knorpel	1
überwiegend Faserknorpel	2
überwiegend kein Knorpel	3
kein Knorpel	4
■ <b>Matrixfärbung (Metachromasie)</b>	
normal (im Vergleich zum normalen Knorpel)	0
gering reduziert	1
deutlich reduziert	2
keine Metachromasie	3
■ <b>Oberflächenregularität</b>	
glatt (> 3/4)	0
moderat (> 1/2–3/4)	1
irregulär (1/4–1/2)	2
hochgradig irregulär (< 1/4)	3
■ <b>Knorpeldicke</b>	
> 2/3	0
1/3–2/3	1
< 1/3	2
■ <b>Integration des Transplantats im Empfängerknorpel</b>	
beide Ränder integriert	0
ein Rand integriert	1
kein Rand integriert	2
■ <b>Maximale Punktzahl</b>	14

Kategorien beurteilt: Zellmorphologie, Matrixfärbung, Oberflächenregularität, Knorpeldicke und Transplantatintegration.

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

## Resultate

■ **Makroskopische Beobachtungen.** Alle Tiere zeigten nach 7 Tagen ein unauffälliges Gangbild. Wundheilungsstörungen wurden nicht beobachtet.

In den Verumgruppen 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 knorpelähnlichem Gewebe gefüllt, welches die Oberfläche bereits nahezu vollständig wiederhergestellt hatte. Der Originaldefekt war jedoch eindeutig 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 Defektes Zeichen der Knorpelerosion. 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 beobachten. Die Defektzone erschien in Folge der Erosion des angrenzenden Knorpels vergrößert. Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen wurden zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet.

## ■ Histologie

### Verumgruppen

4 Wochen nach der Operation waren die Defekte mit hyalinartigem Knorpelgewebe gefüllt. Native Chondrozyten zeigten eine höhere Zelldichte und eine gleichmäßigere Verteilung, was wiederum zu besseren Ergebnissen in der Bewertung

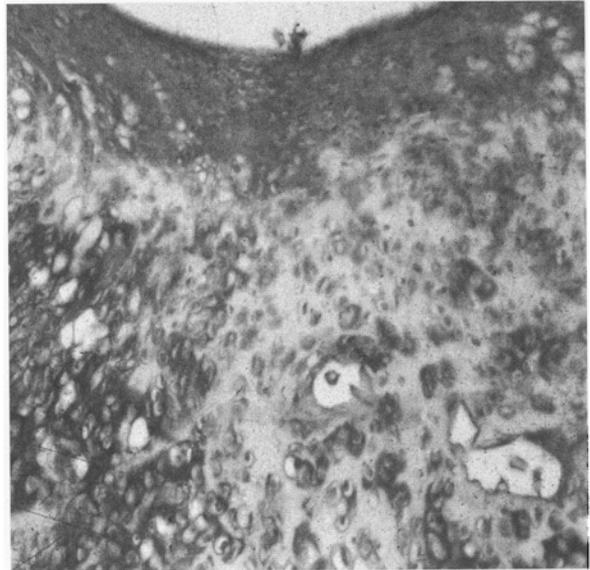


**Abb. 2.** Regenerationsgewebe nach Transplantation von nativen Chondrozyten mit homogener Zellverteilung und hyalinknorpelartigen Matrixcharakteristika (Masson-Goldner, Originalvergrößerung  $\times 50$ )

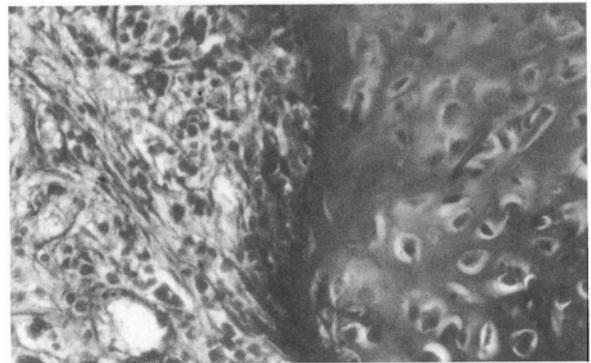
nach Pineda et al. [11] und Wakitani et al. [23] führte (Abb. 2 u. 3). Jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p=0,80$ ; Tabelle 2). In beiden Gruppen wurde eine hohe Zahl kleiner runder Zellen sowie ein im Vergleich zu gesundem Knorpel herabgesetztes Matrix-/Zellverhältnis beobachtet. Die Oberfläche der Patellargrube war histologisch nur unvollständig wiederhergestellt. Der neu geformte Knorpel grenzte direkt an den Wirtsknorpel.

Im Vergleich zu normalem Knorpel war eine verstärkte interzelluläre Matrixfärbung mit Alcian-Blau zu beobachten. Zahlreiche mononukleäre Zellen und Riesenzellen fanden sich an der Grenze des Transplantats zum umgebenden subchondralen Knochen (Abb. 4). Eine Einwanderung dieser Zellen in den Defekt infolge einer entzündlichen Reaktion wurde nicht beobachtet. Das Polymer war nach 4 Wochen teilweise resorbiert, eine Bindung der Chondrozyten an das PGLA-Vlies fand nicht statt (Abb. 5). Die Resultate des histologischen Scores der Verumgruppen unterschieden sich nach 4 Wochen signifikant von den Resultaten der Kontrollgruppen ( $p < 0,05$ ; Tabelle 2).

Nach 12 Wochen wurde in beiden Verumgruppen eine komplette Füllung des Defektes



**Abb. 3.** Nachweis der Bildung eines hyalinartigen Knorpels mit inhomogener Zellverteilung und unterschiedlich ausgeprägter Matrixsynthese bei kryokonservierten Chondrozyten (Alcian-Blau, Originalvergrößerung  $\times 50$ )



**Abb. 4.** Grenzschrift zwischen neu gebildetem und originärem Knorpel mit Migration zahlreicher mononukleärer Zellen in das den Defekt umgebende Gewebe 4 Wochen nach Transplantation nativer Chondrozyten (Masson-Goldner, Originalvergrößerung  $\times 100$ )

mit hyalinartigem Knorpelgewebe beobachtet. Das Transplantat zeigte direkten Kontakt zum Knochen und zum Wirtsknorpel. Allerdings war eine mangelhafte Integrität des neu-gebildeten Knorpels 12 Wochen nach Transplantation bei kryokonserviertem Knochen offensichtlich. Die Chondrozyten insbesondere in den tieferen Regionen des Transplantates gingen eine Clusterbildung ein und unterlagen einer progredienten Hypertrophie. Im oberen Transplantatbereich zeigten die Zellschichten eine zunehmende spin-



**Abb. 5.** Partielle Resorption der Polymere nach 4 Wochen bei fehlendem Zellkontakt der Chondrozyten zum Polymergerüst (Alcian-Blau, Originalvergrößerung  $\times 1000$ )

delförmige Morphologie. Die Alcian-Blau-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 konnten nicht nachgewiesen werden. Native Chondrozyten zeigten im semiquantitativen Score gegenüber kryokonservierten Zellen in PGLA-Vliesen signifikant bessere Ergebnisse ( $p < 0,05$ ; Tabelle 2). Des Weiteren unterschieden sich die histologischen Re-

sultate der Verumgruppen von den Ergebnissen der Kontrollgruppen nach 12 Wochen ( $p < 0,05$ ; Tabelle 2).

### Kontrollgruppen

Zu keinem Zeitpunkt fanden sich markante Differenzen zwischen den beiden Kontrollgruppen. Keiner der Defekte heilte mit hyalinartigem Gewebe. 4 Wochen nach der Transplantation war ein weiches, den Defektgrund füllendes Gewebe in der Gruppe der Leerdefekte sowie in das Polymer einwachsendes Bindegewebe in der anderen Kontrollgruppe nachweisbar. Nach 12 Wochen zeigten die Leerdefekte Fasergewebe mit spindelförmigen Fibroblasten und nur wenig metaplastischem Knorpel, währenddessen die mit Polymervlies gefüllten Defekte mit unregelmäßig geformtem Faserknorpel ausgekleidet waren. 4 und 12 Wochen nach der Transplantation war nur eine minimale metachromatische Färbung mit Alcian-Blau zu beobachten. 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 durch ein hyalinartiges Knorpelgewebe geschlossen wurde. Die Erfolgsrate in der Gruppe mit nativen Chondrozyten betrug nach 4 Wochen 71% (5 von 7) und nach 12 Wochen 100% (7 von 7). Bei kryokonservierten Chondrozyten wurde bei 71% (5 von 7) nach 4 Wochen und 85% (6 von 7) nach 12 Wochen die Bildung von hyalinem Knorpel beobachtet. In den beiden Kontroll-

**Tabelle 2.** Resultate des histologischen Grading Scores nach Pineda und Wakitani [11, 23]

	Zeit nach der Zell- Implantation (Wochen)	Zell- morphologie	Matrix- färbung	Oberflächen- regulartät	Knorpeldicke	Transplantat- integration	Gesamt
■ Verumgruppe I native Chondrozyten	4	0,7	0,4	1,0	0,8	0,2	3,1
	12	0,8	0,3	0,8	0,4	0,5	2,8
■ Verumgruppe II kryokonservierte Chondrozyten	4	1,2	0,4	1,5	0,9	0,2	4,2
	12	1,0	0,3	1,0	0,6	1,0	3,9
■ Kontrollgruppe I Polymervlies ohne Zellen	4	3,8	2,4	1,4	2,0	0,2	9,8
	12	3,2	2,2	1,6	1,6	0,4	9,0
■ Kontrollgruppe II Leerdefekte	4	3,8	2,6	2,7	2,0	1,8	12,9
	12	3,1	2,6	2,0	1,6	1,3	10,6

gruppen wurde nach 12 Wochen lediglich Faserknorpel gefunden.

## Diskussion

Zur Wiederherstellung von Knorpel durch Verfahren des Tissue engineering sind Zellen erforderlich, welche in einer biodegradierbaren Matrix ihr chondrogenes Potential und ihre phänotypische Differenzierung erhalten, um die Integrität und Funktion des Gewebes wiederherzustellen [1, 2]. Resorbierbare Polymergerüste besitzen eine temporär ausreichende mechanische Stabilität zur dreidimensionalen Kultivierung von Chondrozyten *in vitro*. Nach einer Kulturdauer von 2 Wochen steht ein knorpelähnliches Gewebe mit charakteristischer Form für nachfolgende Transplantationen zur Verfügung [22]. Dieses Verfahren ist erfolgreich durch *In vitro*-Züchtung von Knorpel zur Reparatur von Gelenkdefekten beim Kaninchen angewendet und in einem kurzen Nachbeobachtungszeitraum kontrolliert worden. Langfristige Kontrollen nach chirurgischen Eingriffen sind allerdings notwendig, um Langzeitergebnisse, und dabei insbesondere degenerative Veränderungen, zu erfassen.

Die Tatsache einer inhomogenen Zellverteilung in dem Fasergerüst sowie der mangelnden Zelladhäsion an den Faserstrukturen wurde bereits als Problem der Chondrozytentransplantation mittels Polymergerüsten genannt [4]. In der vorliegenden Untersuchung, in welcher Chondrozyten in Fibrinogen suspendiert und nachfolgend die Zell-Fibrinogen-Suspension in PGLA-Vliesen polymerisiert wurde, konnte dieses Problem gelöst werden. Die Vernetzung der Zellen mit den biokompatiblen resorbierbaren Polymervliesen durch Fibrin verbesserte die Anpassungsfähigkeit und Formbarkeit der Transplantate. Im Gegensatz zu anderen Techniken der Chondrozytentransplantation ohne ein Zell-Träger-System ist diese Methode für die Wiederherstellung der Oberfläche großer und unregelmäßiger Knorpeldefekte vorteilhaft. In Bezug auf die Transplantatfixation war dieses Verfahren einfach und sicher handhabbar. Im Unterschied zu anderen Autoren, die über eine Desintegration des Transplantates berichteten, wurde trotz unmittelbarer postoperativer mechanischer Belastung kein Transplantatversagen beobachtet [12].

Die Degradation des PGLA-Vlieses erfolgte langsam, so dass infolge der Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine eine stabile Transplantatintegration gewährleistet wurde. Reste des Fasergerüsts waren in allen Fällen 4 Wochen nach Implantation noch sichtbar, nach 12 Wochen waren diese jedoch vollständig resorbiert. Als Ergebnis der Degradation der Polymere wurde eine leicht-entzündliche Reaktion mit Akkumulation mononukleärer Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Transplantats nach 4 Wochen nachgewiesen. Allerdings konnte ein Einwandern dieser Zellen in die Defekte nicht beobachtet werden. 12 Wochen nach der Operation waren Entzündungszellen in der Umgebung der Defekte nicht mehr nachweisbar, was auf die vollständige Resorption der Polymere zu diesem Zeitpunkt zurückgeführt werden kann. Weder die Implantation zellfreier Polymervliese noch die Anlage von Leerdefekten generierten die Bildung von hyalinartigem Knorpel. Die Defekte waren mit faserknorpelähnlichem Gewebe ausgekleidet. Dieser Umbau ist das Ergebnis der Migration mesenchymaler Zellen, wobei die Transplantation zellfreier Polymerkonstrukte bzw. die Anlage von Leerdefekten somit zur Organisation von funktionell minderwertigem Ersatzgewebe führte. Der gebildete Faserknorpel ist weniger belastbar und einer fortschreitenden Degeneration ausgesetzt [14]. Beide Gruppen zeigten vergleichbare Ergebnisse in den semi-quantitativen Analysen, wobei nach Transplantation von Polymeren eine homogenere strukturelle Auskleidung der Defekte beobachtet werden konnte. Dabei dient das Polymergerüst anscheinend als Leitstruktur für mesenchymale Zellen, die in den Defekt einwandern und eine spezifische Matrix aufbauen [6].

Die Ergebnisse unserer Untersuchung nach 4 Wochen unterscheiden sich von den Ergebnissen, welche von Freed et al. [4] berichtet wurden. Diese konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen Zell-Polymer-Transplantaten und zellfreien Polymer-Transplantaten 4 Wochen postoperativ bei Verwendung von PGLA-Polymeren nachweisen. Die Ursache könnte in der unterschiedlichen Polymerstruktur und in der oben genannten Modifikation der Zellimmobilisierung durch die Quervernetzung mittels Fibrin zu suchen sein.

Ein anderes Problem, welches in der vorliegenden Studie aufgeworfen wurde, war die Verwendung kryokonservierter Chondrozyten zur Herstellung von Transplantaten mittels Tissue

engineering. Die semiquantitative Beurteilung der histologischen Befunde nach dem Score von Pineda et al. [11] ergab schlechtere Ergebnisse bei Verwendung von Transplantaten mit kryokonservierten Chondrozyten. Diese zeigten eine weniger charakteristische Zellmorphologie 4 Wochen sowie eine schlechtere Defektintegration 12 Wochen postoperativ. Die Defektheilung durch hyalinartigen Knorpel wurde nur dann in 100% der Fälle 12 Wochen postoperativ beobachtet, wenn native Chondrozyten verwendet wurden. Ursachen für diese Beobachtungen könnten eine höhere Inzidenz infolge der Kryokonservierung irreversibel geschädigter Chondrozyten sein, welche zum Zeitpunkt der Transplantation noch Vitalität zeigten. Obwohl dieses nicht lineare Beurteilungssystem keine sichere statistische Prüfung der Ergebnisse zulässt, scheint die Transplantation nativer Chondrozyten der Transplantation kryokonservierter Chondrozyten überlegen zu sein. Langzeituntersuchungen sind allerdings notwendig, um zu prüfen, ob die Ergebnisse biologisch relevante Unterschiede reflektieren. Dennoch wurde in der Mehrzahl der Fälle nach Transplantation kryokonservierter Chondrozyten eine Defektheilung durch hyalinartigen Knorpel erreicht.

Die Herstellung von Polymeren, welche an die gewebespezifischen Anforderungen angepasst werden können, bietet neue Perspektiven in der Geweberegeneration und -reparatur. Die Flexibilität der Formgebung degradierbarer Bioerüste gestattet die Modifizierung durch bestimmte extrazelluläre Matrixkomponenten (z. B. Hyaluronsäure), um ein geeignetes supportives Mikromilieu sowohl für eingebettete Zellen als auch für Zellen der Nachbargewebe zu schaffen. Bioaktive Moleküle, wie z. B. Zytokine, Proteaseinhibitoren und Wachstumsfaktoren, welche entweder aus dem strukturellen Polymergerüst oder durch genetische Modifikation der Zellen freigesetzt werden, können den Prozess der Matrixdegradation und damit das Fortschreiten arthrotischer Veränderungen maßgebend beeinflussen. Des Weiteren öffnet die Entwicklung von Transplantatkonstrukten bestehend aus einer Knochen- und Knorpelkomponente neue Möglichkeiten in der Rekonstruktion tiefer Knorpeldefekte. Zukünftige Methoden des Tissue engineering werden die kontrollierte Nutzung mechanischer Stimuli während der *In vitro*-Transplantatpräparation weiter in den Blickpunkt rücken, um die biomechanische Stabilität zu verbessern.

## Zusammenfassung

■ **Studienziel.** Ziel dieser Untersuchung war die Rekonstruktion tiefer Knorpeldefekte des Kniegelenks in einem Kaninchen-Tiermodell.

■ **Methode.** In Polymervlies-Konstrukte wurden allogene Chondrozyten integriert, die entweder nativ oder nach temporärer Kryokonservierung in Monolayer-Kultur expandiert worden waren. Diese wurden in osteochondrale Defekte implantiert und mit zellfreien Polymerkonstrukten sowie Leerdefekten verglichen. Die Defekte wurden 4 und 12 Wochen nach Transplantation makroskopisch und histologisch beurteilt. Die Einschätzung der Transplantatintegration erfolgte durch einen semiquantitativen Score nach Pineda und Wakitani.

■ **Ergebnisse.** Eine vollständige Transplantatintegration in den Defekt unter Nachweis von neu gebildetem hyalinartigem Knorpel wurde nach 4 Wochen in 71% und nach 12 Wochen in 100% der Fälle beobachtet, bei denen native Chondrozyten zur Transplantation verwendet wurden. Demgegenüber wurde hyalinartiger Knorpel bei Verwendung kryokonservierter Chondrozyten nach 4 Wochen ebenfalls in 71% der Fälle, nach 12 Wochen hingegen nur in 85% der Fälle nachgewiesen. Eine Neubildung von Knochen in der subchondralen Grenzschicht wurde nicht beobachtet. In den Kontrollgruppen wurde lediglich faserknorpeliges Ersatzgewebe gebildet.

■ **Schlussfolgerung.** Die Transplantation von Chondrozyten in einem Polymervlies-Konstrukt erweist sich als ein alternatives Verfahren zur Reparatur von Gelenkknorpeldefekten. Dieses Verfahren bietet außerdem perspektivisch die Möglichkeit, die Eigenschaften und die Architektur des neu gebildeten Knorpels durch Verwendung von Wachstumsfaktoren, wie z. B. TGF- $\beta$  und BMPs, zu optimieren. Die Verwendung nativer Chondrozyten ist aufgrund des höheren regenerativen Potentials einer vorangehenden Kryokonservierung der Zellen vorzuziehen.

## Literatur

1. Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215-224
2. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen Solal L (1994) Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 212:97-104
3. Bujia J, Kremer D, Sudhoff H (1995) Determination of viability of cryopreserved cartilage grafts. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252:30-34
4. Freed LE, Grande DA, Lingbin Z (1994) Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 28:891-899
5. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Langer R (1993) Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem* 51:257-264
6. Hunziker EB, Rosenberg L (1994) Induction of repair in partial thickness articular cartilage lesions by timed release of TGF- $\beta$ . *Trans Orthop Res Soc* 19:236
7. Malinin TI, Mnaymneh W, Lo HK, Hinkle DK (1994) Cryopreservation of articular cartilage. Ultrastructural observations and long-term results of experimental distal femoral transplantation. *Clin Orthop* 303:18-32
8. Mankin HJ, Fogelson FS, Thrasher AZ, Jaffer F (1976) Massive resection and allograft transplantation in the treatment of malignant bone tumors. *N Engl J Med* 294:1247-1255
9. Minuth WW, Kloth S, Aigner J, Sittinger M, Röckl W (1996) Approach to an organo-typical environment for cultured cells and tissues. *Biotechniques* 20:498-501
10. Ohlendorf C, Tomford WW, Mankin HJ (1996) Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res* 14:413-416
11. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992) A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat Basel* 143:335-340
12. Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F (1998) Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 6:50-65
13. Schachar N, Nagao M, Matsuyama T, McAllister D, Ishii S (1989) Cryopreserved articular chondrocytes grow in culture, maintain cartilage phenotype, and synthesize matrix components. *J Orthop Res* 7:344-351
14. 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* 75A:532-553
15. Sittinger M, Bujia J, Hammer C, Minuth WW, Burmester GR (1994) Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 15:451-456
16. Sittinger M, Reitzel D, Dauner M (1996) Resorbable polyesters in cartilage engineering: Affinity and biocompatibility of polymer fibre structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 33:57-63
17. Sittinger M, Schultz O, Keyszer G, Minuth WW, Burmester GR (1997) Artificial tissues in perfusion culture. *Int J Artif Organs* 20:57-62
18. Tavakol K, Miller RG, Bazett Jones DP (1993) Ultrastructural changes of articular cartilage chondrocytes associated with freeze-thawing. *J Orthop Res* 11:1-9
19. Thomas VJ, Jimenez SA, Brighton CT, Brown N (1984) Sequential changes in the mechanical properties of viable articular cartilage stored in vitro. *J Orthop Res* 2:55-60
20. Vacanti CA, Cao YL, Upton J, Vacanti JP (1994) Neo-cartilage generated from chondrocytes isolated from 100-year-old human cartilage. *Transplant Proc* 26:3434-3435
21. 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
22. 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
23. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A (1989) Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg* 71B:74-80