

Screening von modifizierten Polyethylenoberflächen für das Tissue-Engineering von Chondrozyten

Screening of Modified Polyethylene Surfaces for Tissue Engineering of Chondrocytes

Autoren

E. Röpke¹, I. Schön¹, J. Vogel², J. Jamali¹, M. Bloching¹, A. Berghaus³

Institute

¹ Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (komm. Direktor: PD Dr. med. M. Bloching)

² Institut für Bioengineering, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

³ Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. Berghaus)

Schlüsselwörter

- Tissue-Engineering
- Plasmabehandlung
- Kollagen
- MEDPOR®
- Polyethylen

Key words

- tissue engineering
- plasma treatment
- collagen
- MEDPOR®
- polyethylene

Zusammenfassung

Hintergrund: In der rekonstruktiven Chirurgie besteht hoher Bedarf an Knorpelersatzmaterialien. Dazu steht autologes Gewebe nur begrenzt zur Verfügung. Andererseits kann die Verwendung von Implantaten zu Entzündungsreaktionen führen. Durch Maskierung mit autologen Zellen sollte die Biokompatibilität von porösem Polyethylen verbessert werden. Die Funktionalisierung der Oberfläche erfolgte mit Kollagen, um den Kontakt zwischen Polyethylen und der Zellschicht zu intensivieren.

Methoden: Die in unterschiedlicher Weise funktionalisierten Polyethylenoberflächen wurden charakterisiert und in Zellkulturexperimenten

mit primären humanen Chondrozyten auf ihre Gewebeverträglichkeit untersucht.

Ergebnisse: Durch ein In-vitro-Screening konnten verschiedene modifizierte Polyethylenoberflächen auf ihre Eignung als Knorpelersatzmaterial getestet werden. Die Kollagenbeschichtung von modifizierten Polyethylenoberflächen führte zu einer Verbesserung der Überlebensraten von primären Chondrozyten, unabhängig von der Art der Bindung des Kollagens an die Polyethylenoberfläche.

Schlussfolgerungen: Chondrozyten können auf Polyethylenoberflächen kultiviert werden. Die Ergebnisse müssen tierexperimentell überprüft werden.

Einleitung

Für die plastisch-rekonstruktive Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich besteht ein hoher Bedarf an Ersatzmaterialien für Knorpel und Knochen.

Auf der Suche nach dem idealen Ersatzgewebe ist es in den letzten Jahren gelungen, durch die Methoden des Tissue-Engineering autologes Ersatzgewebe in vitro zu züchten [1–3]. Für das Tissue-Engineering von Knorpelzellen werden kleine Gewebeprobe entnommen, die Zellen isoliert und in Monolayerkultur vermehrt. Dabei dedifferenzieren die Zellen und verlieren ihre knorpeltypisch morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften, vermutlich durch die fehlende Ausbildung einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix [4]. Werden die Zellen in eine geeignete dreidimensionale Trägerstruktur eingebracht, welche als formgebende Matrix fungiert, erhalten sie ihre phänotypischen Merkmale zurück.

In der Literatur werden verschiedene resorbierbare Trägermaterialien beschrieben wie Polylactidsäure, Polyglycolsäure oder PGLA, einem

Copolymer aus Milchsäure und Hydroxyessigsäure [5–7]. Die auf resorbierbaren Trägermaterialien gezüchteten autologen Knorpeltransplantate lassen jedoch keine langfristige Formstabilität erwarten, weil die generierte Knorpelmatrix bisher nicht über die Festigkeit des natürlichen Gewebes verfügt [8]. Das optimale Gerüstmaterial, das in gleichem Maße abgebaut wird, wie sich aus den eingebrachten Zellen eine stabile neue Knorpelmatrix entwickelt, ist noch nicht gefunden. Der Durchbruch im klinischen Alltag ist bislang ausgeblieben [9–10].

Um die mangelnde Festigkeit des in vitro kultivierten Gewebes auszugleichen, stellt die Verwendung eines biokompatiblen, nichtresorbierbaren Trägermaterials eine Alternative dar. Dafür bietet sich als synthetische Matrix Polyethylen (PE) an, welches in der Klinik bereits seit Jahrzehnten angewandt wird. In der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie hat sich besonders poröses Polyethylen bewährt [11–12]. Heute steht poröses Polyethylen, industriell hergestellt von der Firma Porex Surgical Inc., als MEDPOR® zur Verfügung. In vielen Studien wurden die gute Gewe-

eingereicht 30. Juni 2005
akzeptiert 13. April 2006

Bibliografie

DOI 10.1055/s-2006-945025
Laryngo-Rhino-Otol 2007; 86;
37–43 © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0340-2541

Korrespondenzadresse

Dr. med. E. Röpke
Klinik und Poliklinik für Hals-,
Nasen-, Ohrenheilkunde,
Kopf- und Halschirurgie,
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Magdeburger Straße 12
06097 Halle/Saale
ernst.roepke@medizin.
uni-halle.de

beverträglichkeit und die sehr guten Eigenschaften des Materials für den klinischen Einsatz belegt [12–16]. Dennoch wurde auch von Komplikationen berichtet, wie Entzündungen, Implantatwanderungen oder durch Abrieb bedingte Fremdkörperreaktionen [17–22].

Um die Integration dieses Implantat-Materials in das knorpelige Umgebungsgewebe zu verbessern, sollten in diesem Vorhaben autologe Chondrozyten auf der Oberfläche angesiedelt werden mit dem Ziel, die Materialeigenschaften des Kunststoffes an die natürlichen Gegebenheiten anzupassen. Außerdem bringt das nicht-resorbierbare, biokompatible Implantat eine langfristige Formstabilität.

Für eine stabile Verbindung zwischen den autologen Zellen und der Kunststoffoberfläche muss die PE-Oberfläche modifiziert werden. Dafür bietet sich Kollagen an, das als Molekül der Extrazellulärmatrix der natürlichen Umgebung der Zellen entspricht. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse einer In-vitro-Studie zur Eignung modifizierter PE-Oberflächen als nicht resorbierbares Trägermaterial für die Kultur von Chondrozyten vorgestellt.

Material und Methoden

Als synthetisches Trägermaterial verwendeten wir zwei verschiedene Proben von linearem Polyethylen hoher Dichte: das kommerzielle Produkt MEDPOR® (Porex Surgical Inc.), mit durchgehend poröser Struktur (Porendurchmesser ca. 200 µm, **Abb. 1**) und für analytische Zwecke ein Polyethylen mit planer Oberfläche. Das für die analytischen Untersuchungen verwendete PE enthielt keine Additive, hatte eine dem MEDPOR® vergleichbare molekulare Struktur und Molmasse und wurde hydraulisch zu Platten verpresst.

Modifizierung der Polyethylenoberflächen

Die Modifizierung der Kunststoffoberflächen vor Besiedlung mit autologen Zellen erfolgte durch Beschichtung mit Kollagen. Um das Kollagenmolekül auch kovalent an die inerte PE-Oberfläche zu binden, wurde die Oberfläche mit verschiedenen plasmachemischen Behandlungsparametern und nachfolgender Pfropfpolymerisation funktionalisiert (siehe **Tab. 1**) [23].

An die so entstandenen Carboxylgruppen sollte Kollagen durch Umsetzung mit einem wasserlöslichen Carbodiimid an der Oberfläche des PE kovalent und damit stabil binden (**Abb. 2**).

Die gebundenen Proteine wurden durch die Bindung von spezifischen Antikörpern für Kollagen I oder II (ROCKLAND-Inc.) bestimmt. Der Nachweis des Primärantikörpers erfolgte durch einen mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelten zweiten Antikörper (ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay). Nach Inkubation mit p-Nitrophenylphosphat wurde die Extinktion bei 405 nm spektrophotometrisch bestimmt [24].

Zur Charakterisierung der veränderten Oberflächeneigenschaften wurde die Oberflächenspannung nach der Sessil-drop-Methode [25] bestimmt.

Isolierung und Kultivierung von Chondrozyten

Nach therapeutischen Eingriffen am Nasenseptum wurde nicht zur Reimplantation vorgesehener humaner Septumknorpel unter sterilen Bedingungen von Perichondrium befreit und zerkleinert. Nach einem enzymatischen Aufschluss mit Hyaluronidase, Trypsin und Kollagenase wurden die so vereinzelt Chondrozyten in Monolayerkultur über maximal drei Passagen vermehrt [26].

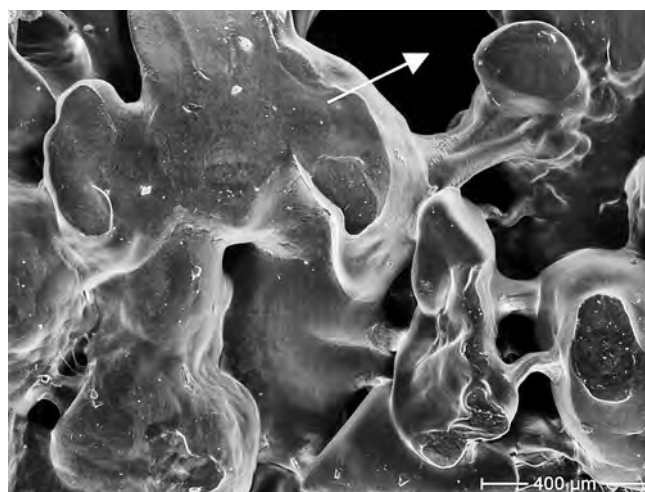


Abb. 1 Elektronenmikroskopische (ESEM) Aufnahme von MEDPOR®; Pfeil markiert Pore.

Tab. 1 Oberflächenmodifizierung von Polyethylen

Modifizierung	Bedingungen
Sauerstoffplasma	50 cm ³ /min MW* 300 W, 30 s O ₂ 60 s
Argonplasma	50 cm ³ /min MW 300 W, 60 s O ₂ 60 s
Pfropfpolymerisation	HF** 30 W, 60 s 1,2 g Acrylsäure p ~ 2–6 × 10 ⁻² mbar

* MW-Mikrowelle; ** HF-Hochfrequenz.

Überprüfung der Biokompatibilität der Polyethylenmodifizierungen

Zur Bestimmung der Zellverträglichkeit wurden jeweils 50 000 Zellen auf die unterschiedlich modifizierten Proben mit einem Durchmesser von 10 mm aufgetragen. Nach 1 Stunde wurden die besiedelten Proben in ein frisches Well überführt und die adhärennten Zellen durch Inkubation mit Thiazolyl Blau (MTT-Reagenz), einem Substrat des mitochondrialen Enzyms Succinatdehydrogenase, ermittelt [39]. In einem weiteren Ansatz wurde die Vitalität der Zellen nach 5-tägiger In-vitro-Kultur auf der PE-Oberfläche durch Umsatz mit dem MTT-Reagenz bestimmt. Die Auswertung erfolgte in Relation zu 50 000 Zellen, die direkt in ein Well ausgesät wurden und als Kontrolle dienten (100%).

Langzeit-Kultur in vitro

Für die Langzeitversuche wurden modifizierte MEDPOR®-Proben mit 10⁶ Zellen besiedelt und über Zeiträume bis zu 1 Jahr kultiviert.

Parallel führten wir Versuche durch, die die stationäre In-vitro-Kultur der Zellen mit der Kultivierung in einer Durchflusskammer nach Minuth [27] verglichen. Dazu wurden Proben mit einem Durchmesser von 14 mm mit je 10⁶ Zellen besiedelt, 1 Woche in einer 24-well-Platte und anschließend für weitere 3 Wochen in einer Durchflusskammer nach Minuth kultiviert.

Um das Anhaften der Zellen auf dem porösen Material zu verbessern und damit mehr Zellen auf den Proben anzusiedeln,

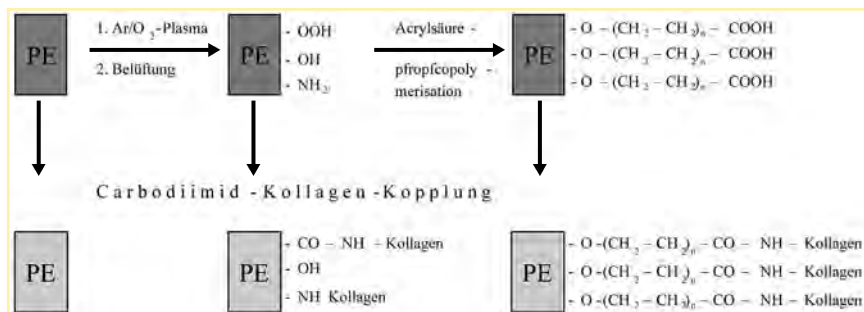


Abb. 2 Schematische Darstellung der Polyethylenmodifizierung.

wurden in einzelnen Versuchen die Zellen vor Aussaat auf den PE-Proben in Tissucoll Gewebekleber schonend dispergiert.

Histologische Aufarbeitung der Proben

Die in-vitro-kultivierten Proben wurden nach Fixierung in 2%igem Paraformaldehyd in Technovit eingebettet, 4 µm-Schnittpräparate hergestellt und die Zell- bzw. Gewebestrukturen in einer HE-Übersichtsfärbung bzw. Färbungen nach Giemsa und Goldner dargestellt [28]. Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen I und knorpelspezifischem Kollagen II erfolgte mit monoklonalen Antikörpern (Chemicon bzw. Calbiochem) und dem mit alkalischer Phosphatase bzw. Meerrettich-Peroxydase gekoppelten Zweitantikörpersystem (DAKO). Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer. Die Schnitte wurden sowohl licht- als auch fluoreszenzmikroskopisch bewertet.

Die Untersuchungen mit dem Environmental Scanning Elektronenmikroskop (ESEM) erfolgten an unfixierten Proben.

Ergebnisse

Charakterisierung der Polyethylen-Oberflächen

Die analytischen Messungen wurden an glatten PE-Proben durchgeführt, um oberflächenbedingte Effekte auszuschließen. In **Abb. 3** sind die Ergebnisse der Oberflächenspannungsmessung dargestellt. Durch die Einführung polarer Gruppen infolge der Modifizierungen der Oberfläche (s. **Abb. 2**) verbesserte sich erwartungsgemäß die Benetzbarkeit und war durch nachfolgende Pfropfpolymerisation von Acrylsäure noch zu steigern. Die Art der Plasmabehandlung spielte dabei eine untergeordnete Rolle. Die nachfolgende Kopplung von Kollagen reduzierte die Oberflächenspannung auf nahezu identische Werte unabhängig von der Art der Plasmabehandlung.

Die an die PE-Oberflächen gebundenen Kollagenmengen konnten mittels ELISA semiquantitativ bestimmt werden (**Abb. 4**). Neben den plasmabehandelten Proben wurde auch unmodifiziertes PE mit Kollagen beschichtet. Dabei zeigte sich, dass weder die Plasmabehandlung noch die nachfolgende stärkere Polarisierung der Oberfläche durch die Pfropfpolymerisation mit Acrylsäure zu einer Erhöhung der gebundenen Kollagenmenge führte. Nach der Plasmabehandlung reduzierte sich die Kollagenmenge um ca. 20%. Die Acrylsäurepfropfpolymerisation führte zur weiteren Reduzierung der gebundenen Kollagenmenge (30% nach Argonplasma-Acrylsäurepfropfpolymerisation, 50% nach Sauerstoffplasma-Acrylsäurepfropfpolymerisation, siehe **Abb. 4**) bezogen auf das an unmodifiziertem PE gebundene Kollagen. Der Unterschied zwischen der Plasmabehandlung mit Argon oder Sauerstoff war nicht signifikant. Die nachfolgende Pfropfpolymerisation führte unerwarteterweise

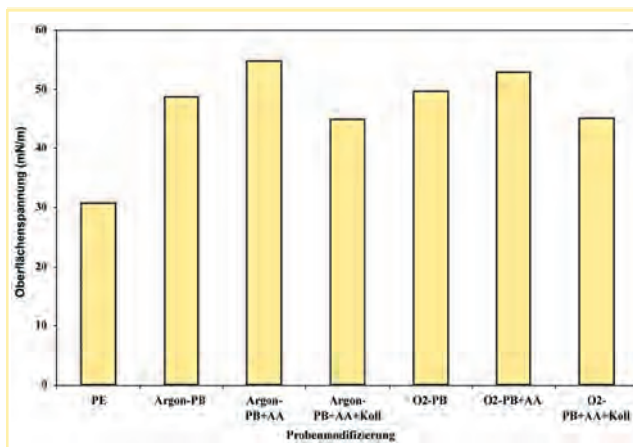


Abb. 3 Oberflächenspannung der PE-Oberflächen in Abhängigkeit von der Modifizierung (PB: Plasmabehandlung, AA: Acrylsäurepfropfpolymerisation, Koll: Kollagen I).

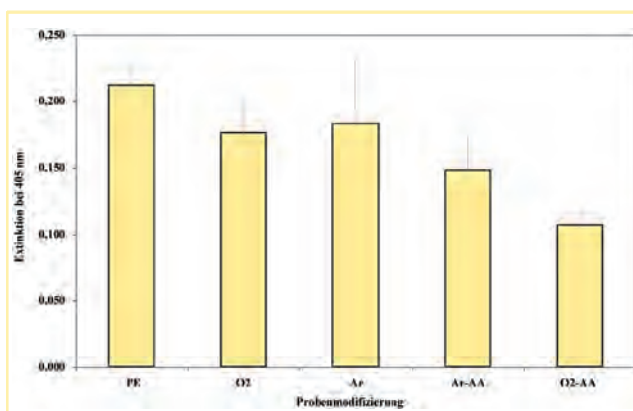


Abb. 4 Semiquantitative Bestimmung des gebundenen Kollagen I an modifiziertem glattem Polyethylen (Nachweis des Kollagens mit einem AP [alkalische Phosphatase] gekoppelten Zweitantikörper, Extinktion des AP-Substrats gemessen bei 405 nm; PE: unmodifiziertes Polyethylen, O₂: PE nach Sauerstoff-Plasma, Ar: PE nach Argon-Plasma, Ar-AA: Ar-Plasma mit Acrylsäurepfropfpolymerisation, O₂-AA: Sauerstoffplasma mit Acrylsäurepfropfpolymerisation; n = 5. Jedes Einzelexperiment wurde mit 4 Parallelbestimmungen durchgeführt, angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler).

in beiden Fällen zu einer Reduzierung der gebundenen Kollagenmengen. Das auf der Oberfläche immobilisierte Kollagen wurde zusätzlich immunhistochemisch nachgewiesen (**Abb. 5**). Dabei wurde nach lichtmikroskopischer Beurteilung mehr Kollagen auf den plasmabehandelten Oberflächen nachgewiesen, ten-

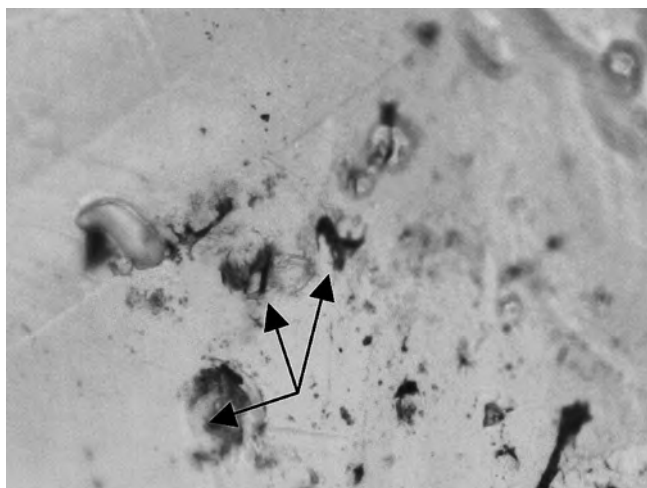


Abb. 5 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen (Pfeile) auf der PE-Oberfläche (durchlichtmikroskopische Aufnahme $\times 200$).

denziell insbesondere auf den Proben nach Sauerstoffplasmabehandlung.

Die Ermittlung der adhärennten Zellen nach einstündiger Inkubation auf den modifizierten, Kollagen beschichteten Oberflächen zeigte, dass durch die verschiedenen Oberflächenbehandlungen die Zahl der anhaftenden Zellen nicht zu steigern war. Das beste Ergebnis lieferte die unmodifizierte PE-Oberfläche mit 95% adhärennten Zellen bezogen auf die Kontrolle. Nach den unterschiedlichen Modifizierungen sank die Menge der adhärennten Zellen um durchschnittlich 15–20% bezogen auf die Kontrolle. Im Gegensatz dazu ergab die Bestimmung der vitalen Zellen nach 5 Tagen eine Steigerung der Überlebensrate von Chondrozyten auf dem mit Kollagen beschichtetem PE um 10% bezogen auf die Menge der vitalen Zellen auf unmodifizierten PE (Abb. 6). Jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen vorbehandelten Oberflächen gefunden.

Aus den analytischen Daten ergab sich die folgende Auswahl von Proben für die In-vitro-Langzeit-Studie:

1. unmodifiziertes MEDPOR® als Kontrolle
2. unmodifiziertes MEDPOR®, beschichtet mit Kollagen II
3. Sauerstoffplasma behandeltes MEDPOR®, beschichtet mit Kollagen II.

Der Einsatz von Kollagen II zur Beschichtung der Proben erfolgte vor dem Hintergrund, dass nativer Knorpel Kollagen II synthetisiert und die phänotypische Stabilität der Zellen durch Signale aus der Umgebung positiv beeinflusst werden können [29].

Die Beschichtung der PE-Proben mit Kollagen II durch Vernetzung mit wasserlöslichem Carbodiimid sollte zu einer besseren Adhärenz der Zellen auf der Kunststoffoberfläche führen. Die Vernetzung reduziert den enzymatischen Abbau der Kollagenschicht [30] und Kollagen II begünstigt den Aufbau einer Knorpelmatrix [31].

Obwohl sich aus den bisherigen Daten kein Vorteil für eine Funktionalisierung der PE-Oberflächen ablesen ließ, wurde exemplarisch auch in weiterführenden Experimenten eine funktionalisierte Oberfläche mitgeführt, um damit einen möglichen Einfluss der kovalenten Kollagenfixierung zu untersuchen. Dazu verwendeten wir Proben nach Sauerstoffplasma-Behandlung.

Abb. 7 zeigt die mit Chondrozyten besiedelten Proben nach zweimonatiger In-vitro-Kultur. Auf allen dargestellten Proben sind Zellen zu erkennen, mit der für Chondrozyten typischen

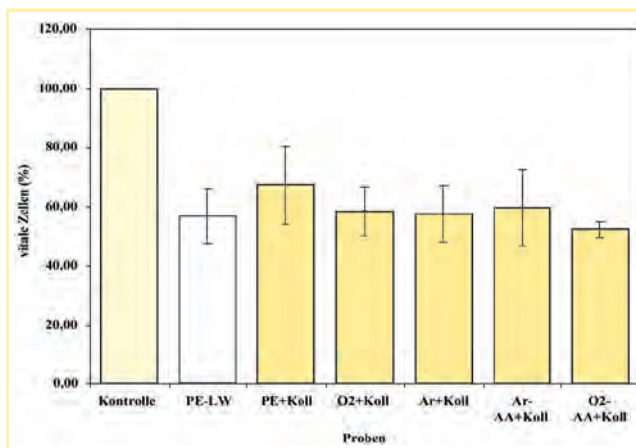


Abb. 6 Überlebensrate der Zellen nach 5-tägiger Inkubation auf glattem Polyethylen (PE) in Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation. PE-LW: unmodifiziert; PE+Koll: PE beschichtet mit Kollagen I; PE nach Plasmabehandlung und Kollagenbeschichtung; (O₂: Sauerstoff-Plasma, Ar: Argon-Plasma, Ar-AA: Argon-Plasma mit Acrylsäure-Pfropfpolymerisation, O₂-AA: Sauerstoff-Plasma mit Acrylsäure-Pfropfpolymerisation); n = 3. Jedes Einzelexperiment wurde mit 4 Parallelbestimmungen durchgeführt, angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler.

runden Gestalt im Unterschied zu der abgeflachten fibroblastischen Form in der Monolayerkultur. Die Zellen bilden ein lockeres Netzwerk. Eine quantitative Beurteilung erlaubt die Auswertung dieser Bilder nicht. Da die Proliferation der Chondrozyten in dreidimensionaler Umgebung zurückgedrängt ist, ist es wichtig, primär genügend Zellen auf bzw. in das Material einzubringen.

Bedingt durch die poröse Struktur fällt ein Teil der Zellen bei der Beimpfung der Proben durch die Poren. Um diesen Nachteil auszugleichen, wurden Zellen in Tissucoll-Gewebekleber dispergiert und anschließend auf die Proben gebracht. Zwar war es gelungen die Zelldichte auf den Proben zu erhöhen, doch der gewünschte Kontakt zwischen MEDPOR® und Zellen ließ sich so nicht herstellen. Darüber hinaus schien ein Teil der Zellen abgestorben zu sein.

Die Versuche in der Perfusionskammer haben gezeigt, dass der Matrixaufbau beschleunigt werden kann. Nach dreiwöchiger Kultur in der Durchflussskammer wurde ein höherer Anteil vitaler Zellen auf den kultivierten Proben gefunden. Der Zellverband wirkte kompakter. Durch den Umsatz mit MTT-Reagenz wurde versucht, die gebildete Zellmatrix zu quantifizieren. Die Zahl der vitalen Zellen war unter stationären Kulturbedingungen deutlich reduziert. Der Anteil lag bei 61% im Vergleich zu den in der Durchflussskammer kultivierten Zellen.

Die Abb. 8 zeigen den immunhistochemischen Nachweis des knorpelspezifischen Kollagen II im Verlauf der Langzeituntersuchungen. Nach 14-tägiger In-vitro-Kultur in dreidimensionaler Umgebung auf MEDPOR® haben die Zellen noch weitestgehend eine fibroblastische Form, exprimieren aber deutlich Kollagen II (Abb. 8a). Nach 3 Monaten sind die Zellen zu ihrer chondroiden, runden Struktur zurückgekehrt (Abb. 8b). Abb. 8c zeigt die in das MEDPOR® eingewachsene Zellschicht nach einer Kultivierungszeit von 12 Monaten. Um das MEDPOR® ist eine deutliche Knorpelschicht gewachsen. Auf den mit Kollagen II beschichteten Proben wurden mehr Zellen gefunden als auf den unbeschichteten Proben. Die sauerstoffplasmabehandelten, mit Kollagen II beschichteten Proben zeigten keine weiteren Verbesserungen.

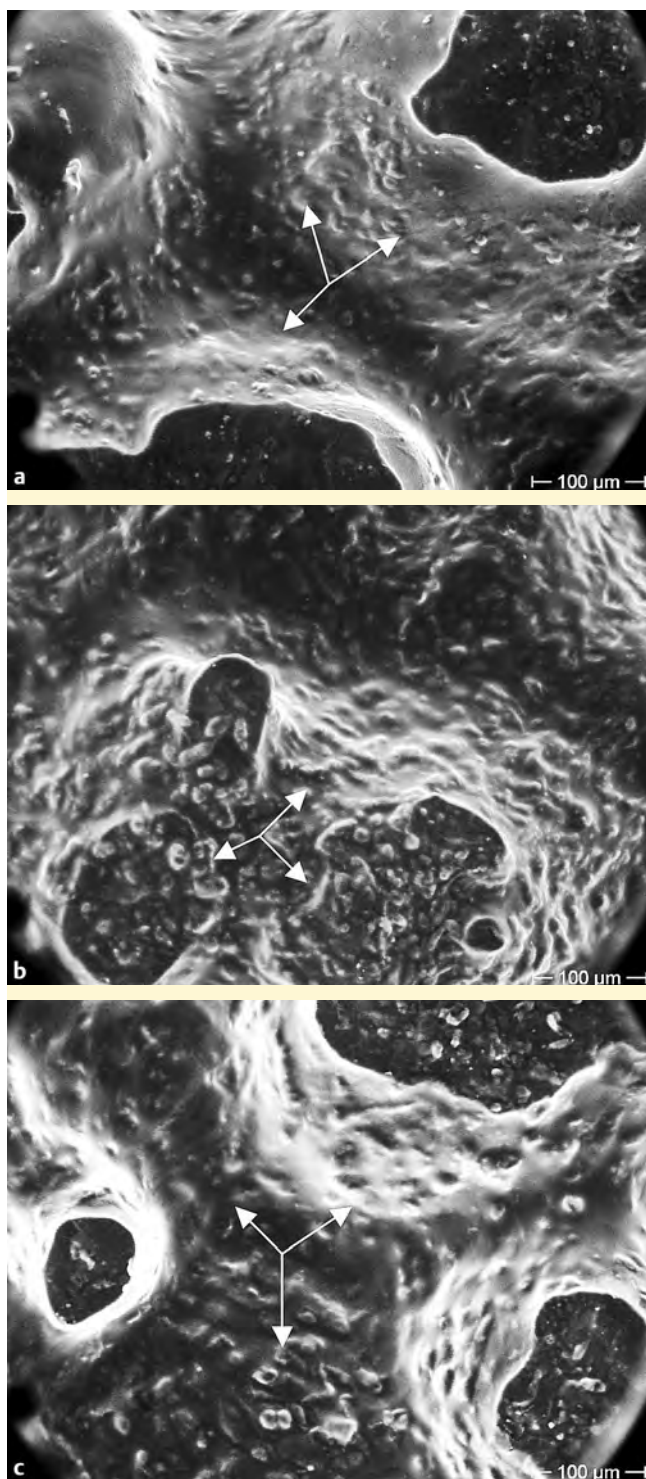


Abb. 7 a ESEM-Aufnahme von Chondrozyten (Pfeile) nach 2-monatiger In-vitro-Kultur auf unmodifizierten MEDPOR®. b ESEM-Aufnahme von Chondrozyten nach 2-monatiger In-vitro-Kultur auf MEDPOR® mit Kollagen II beschichtet. c ESEM-Aufnahme von Chondrozyten nach 2-monatiger In-vitro-Kultur auf MEDPOR® mit Sauerstoffplasmabehandlung und Beschichtung mit Kollagen II.

Diskussion

Ziel dieser Studie war es, einerseits die Festigkeit des generierten Knorpelgewebes durch Verwendung eines stabilen, nichtresorbierbaren Trägermaterials zu verbessern, andererseits das Risiko von Abstoßungsreaktionen durch Maskierung der Implantate mit körpereigenen Zellen zu minimieren. Als nichtresorbierbares Trägermaterial verwendeten wir Polyethylen, welches bereits seit Jahrzehnten in der Klinik eingesetzt wird. Das kommerzielle Produkt MEDPOR® ist auf Grund seiner porösen Struktur für die Ansiedlung von Zellen geeignet. Um eine feste Kopplung der gezüchteten Zellen an das PE zu erreichen, wurde Kollagen auf der PE-Oberfläche immobilisiert.

Die durch Plasmabehandlung hervorgerufenen Funktionalisierungen des PE wurden von Dayss et al. [23] durch ESCA-Messungen (Elektronen-Spektroskopie für chemische Analysen) und Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) nachgewiesen. Sowohl die Sauerstoff- als auch die Argon-Plasmabehandlung führen zu einer Polarisierung der PE-Oberfläche. Das Vorhandensein polarerer funktioneller Gruppen wurde auch in unseren Untersuchungen durch die für die Oberflächenspannung ermittelten Daten belegt (siehe [Abb. 3](#)). Als Richtwerte für die Oberflächenspannung von Materialien auf denen Zellen adhären sollen, wurden 35–48 mN/m diskutiert [39]. Die von uns bestimmten Werte lagen in diesem Bereich. Allerdings wird auch kritisch diskutiert, inwieweit die Oberflächenspannung mit dem Zellverhalten korreliert [40]. Vorhandene funktionelle Gruppen können die Anlagerung von Serumproteinen und anderen Faktoren aus dem Zellkulturmedium und damit die Adhärenz von Zellen beeinflussen, erlauben aber auch die kovalente Bindung von Extrazellulärmatrix-Molekülen wie Kollagen an die Oberfläche.

In unseren Untersuchungen ließ sich auf der Oberfläche befindliches Kollagen sowohl im ELISA ([Abb. 4](#)) als auch immunhistochemisch ([Abb. 5](#)) nachweisen. Die im ELISA ermittelten Daten zeigten, dass sich scheinbar durch Vernetzung der Kollagenmoleküle mittels Carbodiimid mehr Kollagen auf die Oberfläche bringen ließ (Säule PE in [Abb. 4](#)) als durch kovalente Bindung nach vorausgehender Funktionalisierung. Bei den funktionalisierten Proben war eine relativ große Streubreite der Daten auffällig. Diese lässt sich einerseits durch die inhomogene Beschichtung mit Kollagen erklären, die in [Abb. 5](#) deutlich wird. Andererseits könnte die Immobilisierung des Kollagens zu einer Blockierung der Antigenbindungsstellen geführt haben. Die gefundenen Werte lassen keine Rückschlüsse auf die Art der Bindung zu.

Um das Adhärenzverhalten und die Vitalität der Chondrozyten zu charakterisieren wurde der MTT-Test gewählt [41], ein Verfahren zur Analyse zytotoxischer Effekte und Ermittlung adhärenter Zellen. Nach einstündiger Inkubation wurde das beste Ergebnis auf unmodifizierter PE-Oberfläche ermittelt (95% im Vergleich zur Kontrolle), nach 5 Tagen war die Überlebensrate auf kollagenbeschichteten Proben ohne Plasmabehandlung am besten, betrug allerdings nur noch 67% bezogen auf die Kontrolle. Auch bei Verwendung anderer Assaysysteme (Bestimmung des Glykosaminoglykan-Gehaltes, Ermittlung der DNA-Syntheserate) wäre die bereits erwähnte materialbedingte Schwankungsbreite der Resultate nicht zu verbessern gewesen. Aus diesem Grund wurde auf den Einsatz weiterer biochemischer und insbesondere molekularbiologischer Verfahren zur Charakterisierung der Zellen auf den modifizierten Oberflächen verzichtet.

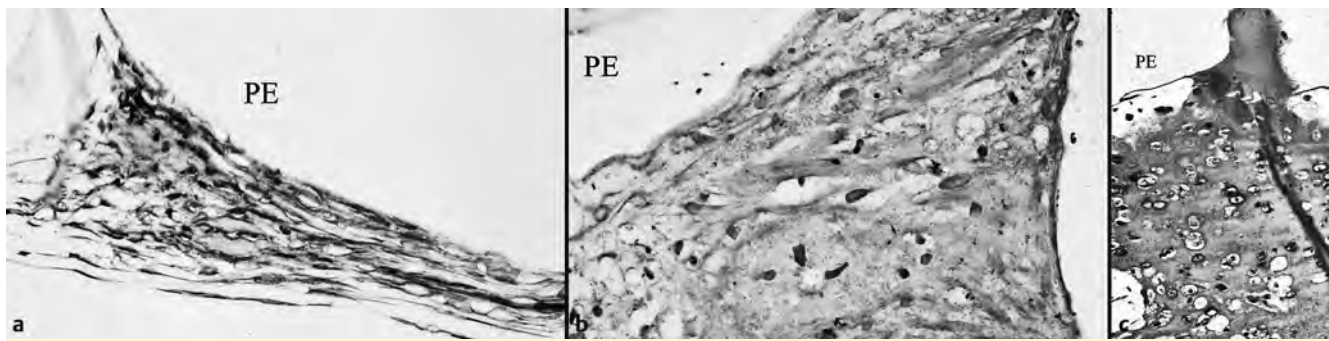


Abb. 8 a Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen II nach 14-tägiger In-vitro-Kultur auf MEDPOR® mit kräftiger Anfärbung von Kollagen II (Vergrößerung: 400 ×). b Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen II nach 3-monatiger In-vitro-Kultur auf MEDPOR®. Chondroide Strukturen sind sichtbar (Vergrößerung: 400 ×). c Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen II nach 12-monatiger In-vitro-Kultur auf MEDPOR®. Gut sichtbar ist eine in den Kunststoff eingewachsene Knorpelschicht (Vergrößerung: 400 ×).

Bosetti [32] und Reno [33–34] beschrieben, dass die durch Plasmabehandlung hervorgerufene Oxidation des PE eine veränderte Proteinadsorption zur Folge hatte. Die von uns gemessene geringere Anzahl vitaler Zellen auf den plasmabehandelten Proben (Abb. 6) könnte möglicherweise auch auf eine Umorganisation der Extrazellulärmatrix zurückzuführen sein. Bosetti fand nach 8-tägiger In-vitro-Kultur von Osteoblasten auf oxydierten PE-Proben eine Reduktion der Proliferation und begründet dies mit einer Inhibition der Expression von MMP 2 (Matrixmetalloproteinase), die eine Änderung der Zellfunktionen nach sich ziehen kann. Inwieweit solche Veränderungen bei den hier dargestellten Ergebnissen eine Rolle spielen, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

In der Literatur wird zur Beschichtung von Biomaterialien überwiegend Kollagen I beschrieben [8–10] bzw. ist der verwendete Kollagentyp nicht spezifiziert [35]. Chondrozyten synthetisieren in natürlicher Umgebung Kollagen II. In Monolayer-Kultur stellen sie im Rahmen ihrer Dedifferenzierung die Kollagen-II-Synthese ein und synthetisieren das für Fibroblasten typische Kollagen I. Dieser Vorgang ist reversibel und neben der dreidimensionalen Umgebung auch von Signalen abhängig, die von der Oberfläche ausgehen, auf der die Zellen wachsen [31, 36, 37]. Nehrer et al. [31] zeigten, dass sowohl der zur Herstellung einer Chondrozytenmatrix verwendete Kollagentyp als auch die Porengröße die Ausbildung einer Knorpelstruktur beeinflussen. Die in einer Kollagen-II-Matrix kultivierten Chondrozyten konnten ihren Phänotyp in größerem Maße erhalten als die in Kollagen-I-Matrizes kultivierten Knorpelzellen und zeigten eine bessere mechanische Stabilität. Eine geringere Porengröße der verwendeten Kollagen-Matrix verbesserte den Phänotyp in Richtung Knorpelzelle. Eine unzureichende homogene Verteilung der Zellen auf der Matrix wird auf die Porengröße zurückgeführt.

Auch in unseren Untersuchungen gelang nicht immer eine gleichmäßige Zellbesiedlung des PE. Durch die Porosität des MEDPOR® kommt ein Teil der Zellen nicht in den für die Adhäsion notwendigen Kontakt mit der Oberfläche des Materials. Zur Maskierung des Fremdmaterials ist nach Ansicht der Autoren nur das Aufbringen einer dünnen Zellschicht notwendig. Die Experimente in der Durchflusskammer und auch stationäre in vitro Kulturen über längere Zeiträume haben gezeigt, dass die Versorgung der Zellen im Inneren des Zellverbandes nicht mehr gewährleistet ist und es zum Absterben der Zellen kommt. Um die Zellen in ihrer Position zu fixieren, wurde Gewebekleber verwendet. Auf Grund der hohen Viskosität des Fibrins werden die

Zellen in der gewünschten Position gehalten. Ein direkter Kontakt zwischen dem synthetischen Material und den Chondrozyten wird allerdings erschwert.

Schlussfolgerungen

Chondrozyten lassen sich auf der Oberfläche von Polyethylen kultivieren. Durch Plasmabehandlung ist eine Funktionalisierung der Polyethylenoberfläche möglich. Die in vitro durchgeführten Experimente zeigten jedoch keinen wesentlichen Effekt der Plasmabehandlung im Hinblick auf die gebundene Kollagenmenge. Nach der histologischen Auswertung der In-vitro-Kulturen scheint das Vorhandensein von Kollagen auf der Polyethylenoberfläche den Zell-Kunststoffkontakt zu verbessern und die Rückkehr der Chondrozyten zu ihrer nativen Morphologie zu beschleunigen. Die Eignung eines Implantatmaterials lässt sich endgültig erst nach einer Erprobung in vivo beurteilen. Aus diesem Grund werden die hier ausgewählten, in unterschiedlicher Weise modifizierten Proben in einer tierexperimentellen Studie weiter untersucht.

Danksagung

Die ESEM-Aufnahmen wurden dankenswerter Weise von Herrn Dr. Heyroth, Interdisziplinäres Zentrum der MLU, durchgeführt. Die Autoren bedanken sich bei Frau Ottilie Pietz und Frau Elke Wolfsteller für ihre labortechnische Unterstützung. Diese Studie wurde im Rahmen des durch das Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt geförderten Projektes FKZ 3308A/0080B erarbeitet.

Abstract

Screening of Modified Polyethylene Surfaces for Tissue Engineering of Chondrocytes

Background: Reconstructive surgery needs high requirements of substitutes for cartilages. The availability of autologous material is limited. The use of implants can cause inflammatory reactions. Therefore the biocompatibility of porous polyethylene should be improved by masking the synthetic surface with autologous cells. The polyethylene surface was functionalized by col-

lagen, in order to enhance the contact between polyethylene and the surrounding cells.

Methods: The modified surfaces were characterized and tested by an in vitro screening with primary human chondrocytes.

Results: The modification of polyethylene surfaces by collagen coating increased the life time of chondrocytes growing at this surface. The effect was independent of the former functionalization.

Conclusions: It is possible to cultivate chondrocytes on polyethylene surfaces. The results have to be proven in a long-term animal experimental study.

Literatur

- Sittinger M, Bräunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujia J. Untersuchungen zum Vermehrungspotential von Nasenseptum-Chondrozyten für die In-vitro-Züchtung von Knorpeltransplantaten. *Laryngo-Rhino-Otol* 1997; 76: 96–100
- Bujia J, Rotter N, Minuth W, Burmester G, Hammer C, Sittinger M. Züchtung menschlichen Knorpelgewebes in einer dreidimensionalen Perfusionsskulturrkammer: Charakterisierung der Kollagensynthese. *Laryngo-Rhino-Otol* 1995; 74: 559–563
- Haisch A, Schultz O, Perka C, Jahnke V, Burmester G, Sittinger M. Tissue-engineering humanen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung biokompatibler resorbierbarer Fibringel und Polymerfließstrukturen. *HNO* 1996; 44: 624–629
- Von der Mark K. Differentiation modulation and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatol* 1986; 10: 272–315
- Bujia J, Reitzel T, Sittinger M. In-vitro-Züchtung von Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Einfluß von L(+)-Laktat und Glykoolat auf kultivierte humane Chondrozyten. *Laryngo-Rhino-Otol* 1995; 74: 183–187
- Perka C, Schultz O, Sittinger M, Zippel H. Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. *Der Orthopäde* 2000; 29: 112–119
- Claes L, Ignatius A. Entwicklung neuer biodegradabler Implantate. *Chirurg* 2002; 73: 990–996
- Alini M, Li W, Markovic P, Aebi M, Spiro R, Roughley PJ. The potential and limitations of a cell-seeded Collagen/Hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix. *Spine* 2003; 28: 446–453
- Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffold and Biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol* 2003; 28: 165–172
- Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology* 2003; 22: 81–91
- Berghaus A. Porous polyethylene in reconstructive head and neck surgery. *Arch Otolaryngol* 1985; 111: 154–160
- Berghaus A. Alloplastische Implantate in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie. *Arch Otorhinolaryngol* 1992; Suppl I: 52–95
- Patel PJ, Rees HC, Olver JM. Fibrovascularisation of Porous Polyethylene Orbital Floor Implants in Humans. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 400–403
- Romo T, Choe K, Sclafani A. Cleft Lip Nasal Reconstruction Using Porous High-Density Polyethylene. *Arch of Facial Plastic Surgery* 2003; 5: 175–179
- Zhang D, Hu B, Shu C. Surgical reconstruction of the abnormalities of earlap, canal and middle ear at one time. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2003; 17: 27–29
- Praveen J, Patel MA, Rees HC, Olver JM. Fibrovascularization of Porous Polyethylene Orbital Floor Implants in Humans. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 400–403
- Carboni A, Gasparini G, Perugini M, Renzi G, Matteini C, Becelli R. Evaluation of homologous bone graft versus biomaterials in the aesthetic restoration of the middle third of the face. *Minerva Chir* 2002; 57: 283–287
- Ozturk S, Sengezer M, Coskun U, Zor F. An unusual complication of a Medpor implant in nasal reconstruction – case report. *Aesthetic Plast Surg* 2002; 26: 419–22
- Yaremchuk MJ. Facial skeletal reconstruction using porous polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 1818–27
- Sosna A, Radonsky T, Pokorny D, Veigl D, Horak Z, Jahoda D. Polyethylene disease. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2003; 70: 6–16
- Blaydon SM, Shepler TR, Neuhaus RW, White WL, Shore JW. The porous polyethylene (Medpor) spherical orbital implant: a retrospective study of 136 cases. *Ophthal Plast Reconstr. Surg* 2003; 19: 364–371
- Schwenzer K, Codoni S, Stübinger S, Jundt G, Zeihofer HF. Komplikationen und orofaziale Rehabilitation nach Insertion alloplastischer Kieferwinkel-Augmentate – ein Fallbericht. *J DGPW* 2004; 30: 19–23
- Dayss E, Leps G, Meinhardt J, Wutzler A. Biokompatible Polymerschichten. In: Leps G, Kausche H (Hrsg). *40 Jahre Werkstofftechnik Merseburg*. Merseburg, 1999: 84–93
- Harlow E, Lane D. *Antibodies A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour laboratory, 1988
- Plein P. *Plasmapolymerisation*. Köln: Verlag TÜV Rheinland, 1989
- Freshney RI. *Tierische Zellkulturen*. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1990
- Minuth WW, Schumacher K, Strehl R, Kloth S. Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long-term biomaterial testing and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym* 2000; 11: 495–522
- Romeis B. *Mikroskopische Technik*. München-Wien-Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1989
- Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Microenvironment and phenotypic stability specific tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. *Exp Cell Res* 2003; 287: 16–27
- Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruzsacak Z, Mehrl R, Mueller R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* 2004; 25: 2831–2841
- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Matrix collagen type and pore size influence behavior of seeded canine Chondrocytes. *Biomaterials* 1997; 18: 769–776
- Bosetti M, Reno F, Bracco P, Costa L, Cannas M. Ultra-high molecular weight polyethylene oxidation reduces metalloproteinase 2 secretion in human osteoblast-like cells in vitro: A mechanism of modulation of extracellular matrix. *J Biomed Mater Res* 2003; 64: 698–705
- Reno F, Lombardi F, Cannas M. UHMWPE oxidation increases granulocytes activation: a role in tissue response after prosthesis implant. *Biomaterials* 2003; 24: 2895–2900
- Reno F, Bracco P, Lombardi F, Boccafosci F, Costa L, Cannas M. The induction of MMP-9 release from granulocytes by Vitamin E in UHMWPE. *Biomaterials* 2004; 25: 995–1001
- Langner R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428: 487–492
- Shakibaei M, De Souza P, Merker HJ. Integrin Expression and Collagen Type II implicated in maintenance of Chondrocyte Shape in monolayer culture: an immunological study. *Cell Biol Int* 1997; 21: 115–125
- Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu H-P, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocytes-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res* 2003; 21: 272–281
- Strehl R, Tallheden T, Sjögren-Jansson E, Minuth WW, Lindahl A. Long-term maintenance of human articular cartilage in culture for biomaterial testing. *Biomaterials* 2005; 26: 4540–4549
- Ikada Y. Surface Modification of Biomedical Polymers. *Macromol Symp* 1996; 101: 455–462
- Ratner BD, Hoffman A, Schoen F, Lemons J. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004: 373
- Miller RR, McDevitt CA. A quantitative microwell assay for chondrocyte cell adhesion. *Anal Biochem* 1991; 192: 380–383