

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mittels des Tissue Engineerings Ohrchondrozyten zu amplifizieren, sie mit formgebenden, bioresorbierbaren Trägermaterialien zu kombinieren und sie daraufhin autolog in ein immunkompetentes Tiermodell zu re-implantieren. Mittels Immunmodulation durch die Applikation von Glukokortikoiden sollte die Abstoßungsreaktion verhindert werden. Die Untersuchungen fanden im Hinblick auf einen zukünftigen klinischen Einsatz dieser Methode in der rekonstruktiven HNO-Chirurgie statt.

In früheren Studien konnten Erfolge mit der Verwendung von Polylaktid-Polyglykolid-Polymeren hinsichtlich der *in vivo* Ausbildung von Knorpelmatrix in niederen Tiermodellen erzielt werden. In der thymusaplastischen Nacktmaus konnte nach 6 und 12 Wochen neu gebildeter Knorpel nachgewiesen werden (54). Studien am Kaninchenmodell mit Prednisolon-Applikationen lieferten wie auch in der vorliegenden Arbeit Kalzifikationen und trabekuläres Knochengewebe (56) in Bereichen der autolog mit Ohrchondrozyten implantierten Ethisorb®-Vliese .

Die neuartigen Kieselgelfasern fanden bis dato in nur wenigen Versuchen Anwendung. Erste Studien mit Mäusen, bei denen dieses Fasermaterial ohne Zellbesiedlung und ohne Immunmodulation implantiert worden war, lieferten Ergebnisse, die Versuche für einen klinischen Einsatz rechtfertigten. Es wurden kaum Entzündungsreaktionen nach Euthanasie der Tiere nach 6 bzw. 12 Wochen beobachtet. Das anorganische Fasermaterial war zudem vollständig resorbiert (Haisch 2003, unveröffentlichte Studie).

6.1 Tissue Engineering und das Immunsystem

Im Rahmen dieser Studie am Tiermodell Schwein war auffällig, dass es bis auf wenige Ausnahmen zu entzündlichen Reaktionen mit Verlust der implantierten Ohrchondrozyten kam. Lediglich bei den immunmodulierten Tieren konnten am Tag 3 und Tag 8 in den faserfreien Transplantaten der Versuchstiergruppe 2 degenerierte Knorpelzellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren insofern überraschend, da in voraus gegangenen *in vitro* Versuchen über mehrere Wochen Chondrozyten histologisch nachweisbar waren. Obwohl Knorpelgewebe als „immunologisch privilegiertes“ Gewebe gilt (140), kommt es gelegentlich selbst bei autologen Knorpeltransplantaten zu Resorptionen und Abstoßungsreaktionen (141); (142). Diese Gefahr kann auch bei dem neugebildeten Knorpel gegeben sein, da wegen der noch unvollständig ausgebildeten extrazellulären Matrix den Zellen des Immunsystems sonst

versteckte antigene Strukturen zugänglich werden (143). Aus diesem Grund wurde beschlossen, der Implantation eine mehrtägige Vorkultivierung im Brutschrank vorzuschalten. Denn nach Zimmermann et al. ist das Maximum an Zelldifferenzierung und Matrixproduktion um den 9. Tag erreicht. GAG-Produktion erreicht ihr Maximum nach Tag 6, Kollagen Typ II ungefähr am Tag 15 (144). Eine 10-tägige Vorkultur fand beispielsweise in Untersuchungen statt, die von Cima und seinen Mitarbeitern durchgeführt worden waren (145).

Es konnte zudem in früheren Arbeiten auch gezeigt werden, dass Nasenseptumknorpel und aurikulärer Knorpel einen bedeutend größeren Resorptionsgrad aufwiesen als Transplantate aus Rippenknorpel (146). Ebenso wird auch die Beteiligung von immunologischen Reaktionen diskutiert, die im Rahmen von bereits vorliegenden Autoimmunerkrankungen entstanden sind (147). Die Daten über die Produktion von Autoantikörpern lassen vermuten, dass auch eine humorale Immunreaktivität gegenüber autologem Knorpelgewebe (unter Ausschluss von Infektionen) für die Zerstörung von Knorpelgewebe verantwortlich ist (148). Es kam zu lokalen Entzündungsreaktionen mit kurz- oder langfristiger Einschmelzung von Knorpelgewebe. Britt et al. konnten bei der mikroskopischen Beobachtung zeigen, dass um und zwischen den Bereichen neugebildeten Knorpels eine starke Ansammlung von Fremdkörperriesenzellen auftrat. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Reaktion der Fremdkörperriesenzellen, die bei der Verwendung von PGA/PLLA (im Kaninchen) auftritt, eine Rolle bei der Hemmung der Chondrogenese spielt (12). Vacanti et al. benutzte ähnliche Polymere, verzeichnete aber nur eine milde Entzündungsreaktion (149). Britt lieferte zwei mögliche Ursachen: Die Verwendung eines immuninkompetenten Empfängertieres oder eine andere Zusammensetzung des Vlieses (12). Eine frühe milde Entzündungsreaktion bei PGLA-Vliesen bemerkten auch Cima et al. (145).

Ein weiteres Ergebnis dieser Studie ist, dass bei den Ethisorb®-Tieren, v.a. bei dem Schwein, dessen Transplantate mit einer Cortisonlösung benetzt worden waren, von Beginn an Verkalkungen und metaplastische Verknöcherungen auftraten, die am letzten Explantationstag jedoch nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtungen über die knorpelgewebeähnliche Strukturen im Kaninchen machten auch Wanjura und Haisch (150); (56). Auch kamen Saim et al. zu dem Schluss, dass mit der Zeit der neu gebildete Knorpel entweder dem Prozess der Resorption oder der Umwandlung in Knochen unterläuft (151).

Auch andere Arbeitsgruppen machten unter ihren Bedingungen ähnliche Erfahrungen wie in dieser Arbeit beschrieben. Obwohl in einem immuninkompetenten Xenotransplantat-Mausmodell mit Hilfe von PGA/PLA sehr gute Ergebnisse in der Ohrknorpelzüchtung erzielt

werden konnten (98), kam es unter gleichen Bedingungen beim Kaninchen zu suboptimalen Ergebnissen (12) und im porcinen autologen Modell sogar zu entzündlichen Reaktionen (11). In einem Hydrogel (Pultronic F-127) konnte hingegen autologer Schweineohrknorpel aus frisch isolierten Zellen generiert werden, ohne jedoch eine Zellamplifizierungsperiode vorgeschaltet zu haben. Es wurde wie auch in der vorliegenden Studie eine Konzentration von 30 Millionen Zellen pro Milliliter verwendet (151).

In der vorliegenden Studie war es zunächst das Ziel, die aurikulären Chondrozyten über zwei Passagen zu vermehren und deren Dedifferenzierung zu tolerieren, um eine ausreichend große Zellzahl zu erhalten, denn die Amplifikation der Zellen ist ein unabdingbares Kriterium für das Tissue Engineering mit dem Ziel des Einsatzes dieser Methode im klinischen Bereich. In Zukunft werden in der Humanmedizin nur kleine Ohrknorpel-Proben zur Verfügung stehen, aus denen eine sehr große Zellzahl erzielt werden muss, um ein geformtes Ohrgebilde zu konstruieren.

Rotter et al. warfen 2001 die Frage auf, ob Gewebe aus mehrfach expandierten Chondrozyten die gleiche Qualität haben würde wie die Gewebe aus Zellen, die gar nicht oder kaum vermehrt wurden (152). Sie schätzten, dass der Zellbedarf für beispielsweise ein menschliches Ohr in der Größenordnung zwischen 1×10^8 bis 5×10^8 liegt.

Bei der Verwendung der bis dato wenig untersuchten Kieselgelfasern als Trägermaterial im Tissue Engineering fiel makroskopisch ab dem 16. Tag bzw. schon ab dem 8. Tag bei den mit Cortison behandelten Tieren die Ausbildung einer Fremdkörperkapsel auf. Auch im histologischen Bild zeigte sich eine kapselartige Fibrose, die Fasermaterial umschließt (Abbildung 47 A, B). Dieses Material scheint also einen größeren Fremdkörperreiz auf das umgebende Gewebe darzustellen als es Ethisorb® tut. Die Frage, warum gerade bei den cortisonbehandelten Tieren eine Kapselbildung auftritt, bleibt unbeantwortet. Es ist lediglich zu vermuten, dass der Fremdkörperreiz durch die Kieselgelfaser viel stärker ist als dass das Cortison eine Fremdkörperreaktion unterdrücken kann. Die Kapsel wiederum macht eine Umspülung mit Gewebsflüssigkeit und somit einen Abtransport der Faserbestandteile unmöglich. Eine noch stärkere Abkapselung mit flüssiger Einschmelzung des Fremdmaterials ist die Folge. Pathophysiologisch werden kleine staubförmige Fremdkörper von Phagozyten aufgenommen und schließlich mit der Lymphe abtransportiert. Bei der Verarbeitung von feindispersen, unlöslichen, chemisch aktiven, anorganischen Fremdkörpern wird von Monozyten, Histiozyten und Fremdkörperriesenzellen in den Phagolysosomen eine Proteine und Polysaccharide enthaltene Trägersubstanz gebildet, welche die anorganischen Stoffe adsorbiert und unschädlich macht. Mitunter werden durch gegebenenfalls umspülende

Gewebsflüssigkeit noch wirksame Bestandteile ausgeschwemmt, die eine eigentümliche Gewebsreaktion auslösen. Die Entzündung hat den Charakter einer chronischen, proliferierenden und sklerosierenden Form und besteht v.a. in einer Bindegewebsvermehrung mit nachfolgender Hyalinisierung und Nekrose der Fasern (113). Auch Cortivo et al. erwähnen, dass sich eine Kapselausbildung ungünstig auf ein Transplantat auswirkt (36). *In vivo* sollten keine Reaktionen des umgebenden Gewebes im Sinne einer Kapselbildung, Einsprossung von Blutgefäßen oder Einwanderung von Entzündungszellen nachweisbar sein (35). Ist dieses der Fall, ist ein Verlust des Transplantats möglich. Ferner sollen die beim Degradationsprozess anfallenden Abbauprodukte keinesfalls die Zellfunktion negativ beeinflussen (36).

6.2 Die Trägermaterialien

6.2.1 Polylaktid-Polyglykolid-Copolymere

In vielen Veröffentlichungen wurde von positiven Resultaten berichtet, die im Rahmen des Tissue Engineerings mit Polylaktid-Polyglykolid-Vliesen erzielt worden sind (9, 46-57). Es gibt jedoch auch Studien, in denen gezeigt wurde, dass PGA/PLA-Vliesmaterial kein zufriedenstellendes Langzeitergebnis hervorbrachte wegen einer inflammatorischen Reaktion gegen das Material. Diese war verantwortlich dafür, dass man einen Formverlust des Implantats hinnehmen musste und dass die Gewebequalität beeinträchtigt wurde (12, 51). Bei der Transplantation von bovinen artikulären Chondrozyten in einer Zelldichte von 50 Millionen pro Milliliter in PGLA-Konstrukten in Nacktmäuse bemerkten Vacanti et al. am ersten Explantationstag (Tag 8) eine milde Entzündungsreaktion, die sich durch das Auftreten von polymorphkernigen Leukozyten und Riesenzellen auszeichnete. Am 18. und 28. Tag verschwand diese wieder (149), was mit der Auflösung des Polymers korrelierte. Knorpeltypische Lakunen waren erst an Tag 81 und Tag 168 als Anzeichen für den entstandenen reifen Knorpel zu entdecken. Kollagen Typ II wurde erst nach dem 49. Explantationstag nachgewiesen (149). Auch im autologen Kaninchenmodell waren negative Effekte dieses Trägermaterials auf die Knorpelformation zu beobachten. Alle dreidimensionalen Implantate waren in Untersuchungen von Sieh et al. stark deformiert unabhängig vom Trägermaterial PGA (Polyglykolsäure), PCL (Polycaprolakton) und P4 HB (Poly-4-Hydroxybutyrat) und zerfielen drei Monate nach Implantation. In histologischen Schnittpräparaten war eine starke Infiltration von lymphohistiozytären Zellen im Ohrkonstrukt zu erkennen, was als Anzeichen für ein entzündliches Geschehen auf einen

Fremdkörper gedeutet wurde (57). Auch andere berichteten vom Formverlust eines PGA-PLLA-Konstrukts in einem immunkompetenten Tiermodell (12, 98).

6.2.2 Fibrinkleber

Fibrinogen in Kombination mit Thrombin findet als Fibrinkleber erfolgreich Verwendung im Bereich des Tissue Engineerings, vor allem in Kombination mit strukturierten, formgebenden Trägermaterialien. Für die ungestörte Wundheilung ist die Verträglichkeit des Fibrinklebers auf zellulärer Ebene von großer Bedeutung. Deshalb wurde mehrfach die Biokompatibilität von Fibrinklebern *in vitro* an Zellkulturen von Weichgeweben untersucht (153, 154). Itay et al. sind der Auffassung, dass durch die Zytotoxizität von Fibrinkleber dieser nur eine begrenzte Fähigkeit besitzt, Knorpelgewebe reparieren zu können (155). Es wurden zytotoxische und proliferationshemmende Eigenschaften bei dem Fibrinkleber Beriplast® beobachtet – im Gegensatz zu den Ergebnissen, die Tissucol™ lieferte (156).

Nach der Meinung von Homminga et al. kann in Substanzen wie Fibrin eine Redifferenzierung der Knorpelzellen in fibroblastoide Zellen auftreten und Fibrin ist allein als Trägermaterial nicht geeignet, die Chondrozyten redifferenzieren zu lassen (62). Mit dieser Studie konnte jedoch das Gegenteil aufgezeigt werden. Vielmehr waren sogar die Ergebnisse ohne eine Faserkomponente sowohl *in vitro* (Tabelle 11) auch als *in vivo* (Abbildung 46, 48) teilweise erfolgreicher, denn es wurden weniger degenerierte Zellen nachgewiesen bzw. kam es überhaupt zu einem Nachweis von Chondrozyten im Vergleich zu den Transplantaten, die Ethisorb® oder die Kieselgelfasern enthielten. Die Tatsache, dass man in der Versuchstiergruppe 1 in den Konstrukten ohne Ethisorb® keine Chondrozyten gefunden hat, mag daran liegen, dass aufgrund der geringen Transplantatgröße einerseits diese entweder nach einem längeren Zeitraum *in vivo* nicht wieder aufgefunden werden konnten oder dass aufgrund der relativ größeren Oberfläche des kleinen Konstrukts diese zu sehr den Entzündungszellen und Makrophagen ausgesetzt waren, dass diese phagozytiert wurden. Auch das Fibrin selbst kann Ursache für eine zelluläre Reaktion auf das Transplantat sein. Fibrin, in Verbindung mit Fibronectin, fungiert als provisorische Matrix für die Invasion von Monozyten, Fibroblasten und endothelialen Zellen. Die Gerinnungskaskade erzeugt bei der normalen Verletzung zahlreiche vasoaktive Substanzen und chemotaktische Faktoren, die die entzündlichen Leukozyten anlocken. Die Fibrin-Abbauprodukte stimulieren die Migration von Monozyten, die sich in Makrophagen umwandeln, die wiederum das Fibrin phagozytieren. Stimulierte Fibroblasten wandern durch die Fibrinnetzstruktur und lagern

Kollagen Typ III ab (157); (158). Jedoch scheint Fibrin in hohen Konzentrationen die normale Zellmigration zu hemmen und die spätere Wundheilung zu hemmen (159).

Homminga et al. bemerkten in Studien, in denen Tissucol™ verwendet wurde, dass die Chondrozyten so lange aktiv waren hinsichtlich Zellvermehrung, Aufrechterhaltung ihres Phänotyps und ihrer Matrixproduktion, solange sie von Fibrinkleber umgeben waren. Jedoch kam es schon ab Tag 7 zur Auflösung und schließlich zum gänzlichen Zerfall des Klebers (62). Dies Phänomen beobachtete man auch in der vorliegenden Studie. Bei in parallel *in vitro* kultivierten Transplantaten von Schwein 2 (Versuchstiergruppe 1) wurden nach 13 Tagen im Zerfall begriffene Transplantate bemerkt. Mikroskopisch waren ins Medium ausgewanderte Zellen zu sehen (ohne Abbildung). Obwohl wir diese Beobachtung weder bei Schwein 1 noch bei Schwein 3 machten, beschlossen wir daraufhin, zusätzlich zu dem im Tissucol™ enthaltenen Fibrinolysehemmer, noch zusätzlich Aprotinin (Trasylol®) dem Medium zuzugeben. Das Aprotinin ist der effektivste exogene Fibrinolysehemmer, der in der Koagulationstherapie und in Fibrinkleberzusammensetzungen Verwendung findet (160). Es hemmt Trypsin, Kallikrein und Plasmin und wird aus der Parotis und der Lunge von Rindern gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass in Fibrinkleber eine Konzentration von mindestens 10 mg/ml die Fibrinolyse vermindern kann (158). Jedoch konnte diese Arbeitsgruppe in Wundheilungsstudien zeigen, dass in der Anwesenheit von Fibrinolysehemmern eine verstärkte Fibrose, eine Narbenbildung, beobachtet werden konnte. Eine signifikante Menge an Fibrin war auch noch nach 14 Tagen nachweisbar (158). In rekonstruktiven Prozessen stellt die Bindegewebsreaktion und somit Vernarbung eine unerwünschte und negative Folge der Fibrinklebung dar (157). Aprotinin hemmt *in vitro* die Fibrinolyse nahezu unbegrenzt. *In vivo* ist mit Aprotinin nur bis maximal 1500 KIE/ml Clot eine Verbesserung der Fibrinolysehemmung zu erzielen, höhere Dosen bleiben ohne Einfluss auf die Stabilität des Fibrinklebers (157). Aufgrund der vorliegenden Studie kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob Aprotinin fibrotische Erscheinungen verstärkt. Es wurden zwar ausgeprägte fibrotische Kapselausbildungen bei den in der Vorkultur mit Aprotinin versorgten Transplantaten der Versuchstiergruppe 2 beobachtet, dieses kann jedoch auch auf die verwendeten Kieselgelfasern zurück zu führen sein.

Bei *in vitro* Untersuchungen von Fibrinkleber-Transplantaten (hyaline Chondrozyten von jungen Pferden) wurde festgestellt, dass autologer Fibrinkleber bessere Ergebnisse hinsichtlich der Knorpelproduktion brachte als bei der Verwendung kommerziell hergestelltem Fibrinkleber. Autologes, per Kryopräzipitation gewonnenes Fibrinogen stimuliert die Chondrozytenproliferation und die Proteoglykanproduktion in einem größeren

Umfang: je 1,4 mal höher am Tag 14 im Gegensatz zu Transplantaten, die mit kommerziellem Fibrinogen hergestellt worden waren. Bei kommerziellem Fibrinogen erscheinen die Chondrozyten in der Tiefe des Konstruktes fibroblastoid, in autologem blieben sie knorpelzelltypisch rund (161). Mittels Kryopräzipitation hergestelltes Fibrinogen enthält viele Plasmaproteine inklusive Gerinnungsfaktoren, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Fibronectin und Carrier- und Bindungsproteinen. Dabei ist der Gehalt an Wachstumsfaktoren altersabhängig und die Fibrinogenzusammensetzung variiert von Spender- zu Spendertier. Kommerzielle Chargen werden hergestellt, in dem das Fibrinogen aus Plasma durch Ethanolpräzipitation und Zentrifugation fraktioniert wird. In lyophilisierter und sterilisierter Form steht das Fibrinogen zur Verfügung. Die genannten Prozesse bewirken, dass die enthaltenen Peptide weiterhin inaktiviert werden. Alternativen zur Herstellung von Fibrinkleber findet man in einigen Veröffentlichungen (162, 163). Für die Versuchstiergruppe 1 verwendeten wir kein autologes, sondern allogenes Fibrinogen (vom Schlachtschwein), jedoch kam es zu technischen Problemen, da das Fibrinogen agglutinierte, kurz nachdem es mit der Zell-Medium-Suspension in Kontakt kam. Diese Tatsache erschwerte den Transplantatbau übermäßig. Daher wurde in der Versuchstiergruppe 2 auf die Verwendung von porcinem Fibrinogen verzichtet und es wurde kommerzielles (humanes) verwendet, da hierbei dieses Phänomen nicht auftrat.

6.2.3 Alginate - ein alternatives Trägermaterial?

Neben zahlreichen anderen Trägermaterialien (s. Kapitel 2.1.3.4) findet auch das Alginate im Tissue Engineering Anwendung. Chondrozyten sind in diesem Gel bis zu einer Kultivierungsdauer von 8 Monaten in der Lage, ihren Phänotyp zu behalten, adulte humane Knorpelzellen bilden eine extrazelluläre Matrix. In der *in vitro* Kultur von Chondrozyten konnte nachgewiesen werden, dass isolierte hyaline Chondrozyten, die in Alginatebeats kultiviert worden waren, auswanderten und ihr chondrogenes Potenzial über 4 Passagen im Monolayer behielten. Dedifferenzierte Zellen aus einer Monolayerkultur nach Passage 5 bis 8 waren nicht in der Lage, in Alginatekulturen zu redifferenzieren. Die Zellen erlitten dem Zelltod oder bleiben fibroblastoid und produzieren keine knorpelspezifischen Marker (164). Vergleichende Untersuchungen mit aurikulären Schweinechondrozyten zeigten, dass die Zellen bis zur 10. Passage in der Lage waren, aus den Alginatebeats auszuwandern (unveröffentlichte Daten).

Homicz et al. fanden heraus, dass Alginate im Vergleich zu PGA-Vliesen höhere

Glykosaminoglykangehalte in neu gezüchtetem humanem Nasenseptumknorpel hervorbrachte (44). In einer Veröffentlichung über eine Studie zum Vergleich von verschiedenen Trägermaterialien für die Züchtung von porcinem Ohrknorpel wurde jedoch berichtet, dass die Verwendung von sowohl Alginatgelen als auch von PGA-Vliesen in einer vorwiegend bindegewebigen Struktur resultierte (umgeben von einer fibrösen Kapsel) mit wenig knorpelähnlichen Strukturen. Die Autoren nehmen an, dass dafür eine entzündliche Reaktion auf diese beiden Trägermaterialien die Ursache ist (51). Die Verwendung von Alginat ist für den Erhalt der Differenzierung der Chondrozyten optimal, jedoch durch fehlende Biodegradierbarkeit und eingeschränkte Biokompatibilität für die Knorpeltransplantation und damit die *in vivo* Anwendung nicht geeignet (31). Andere Autoren vertreten die kontroverse Auffassung, dass die Anregung der Immunaktivität durch das Alginat, die Fähigkeit, neuen Knorpel zu bilden, positiv beeinflusst. Voneinander abweichende Studien ergaben einerseits die Stimulation, andererseits die Suppression von Makrophagen und Lymphozyten durch Alginat. Ursächlich hierfür mögen unterschiedliche Versuchsbedingungen sein (165).

6.3 Die De- und Redifferenzierung der Chondrozyten

Wenn Chondrozyten aus einem differenzierten Knorpelgewebe isoliert werden, sind mitotische Teilungen zunächst aufgrund des hohen Differenzierungsgrades nicht möglich. Ein Beginn der proliferativen Phase tritt erst mit dem Verlust dieser Differenzierung nach einigen Tagen ein (17). Zellproliferation und Zelldifferenzierung sind also zelluläre Zustände, die sich gegenseitig ausschließen (166). Das chondrogene Potenzial geht demnach verloren (167). Dabei gibt es deutliche artspezifische Unterschiede. So fanden van Osch et al. in einer mit Wachstumsfaktoren versehenen Alginat-Zellkultivierung heraus, dass die Redifferenzierung von humanen Nasenseptumknorpelzellen signifikant geringer ausfiel als in einer vergleichbaren Studie mit Kanichenchondrozyten (168). Ebenso spielt das Alter eine entscheidende Rolle. Jedoch konnte eine schnellere Proliferation von Nasenseptumzellen bei jüngeren Patienten nicht beobachtet werden. Leichte Abflachungen von Wachstumskurven weisen vielmehr auf eine Verlangsamung der Zellteilung im zweiten Monat hin (166). Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, die verantwortlich sind für die Dedifferenzierung von Chondrozyten in der Monolayer-Kultur (169): (1.) Verlust der Verbindung zwischen Chondrozyten und Matrix (170-172), (2.) Zellreifung (37, 173), (3.) Altern der Zellen (174, 175), (4.) Kontamination und Überwuchern mit Fibroblasten (176).

Nach verlängerter Monolayerkultur proliferieren dedifferenzierte Chondrozyten, aber scheinen irreversibel ihre chondrogene Potenz zu verlieren (164, 167). Dieses Ergebnis stimmt mit unserer *in vitro* Beobachtung insoweit überein, dass Zellen, die aus der 3. und 4. Passage stammten, ab der ersten Kultivierungswoche lediglich hochgradig degenerierte Chondrozyten im Konstrukt erkennen ließen.

Für die Differenzierung spielen feste Zell-Zell-Kontakte während der ersten Phase der Chondrozytendifferenzierung in der Chondrogenese eine wichtige Rolle (177, 178). Aus diesem Grund wählten wir eine hohe Zelldichte im Transplantat (30 Mio./ml). Andere Arbeitsgruppen verwendeten Zellkonzentrationen zwischen 10 und 50 Mio./ml: 10 Mio./ml (161, 179); 10-20 Mio./ml (12), 20 Mio./ml (180); 30 Mio./ml (151, 152, 181); 35 Mio./ml (44), 50 Mio./ml (11, 53, 57, 149). Auch Wachstumsfaktoren wie FGF-2 und BMP-2 können die (Re-) Differenzierung fördern (167, 177). Sie erhöhen die Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 (182-184). Sox9 begünstigt die Expression von Chondrozytenmarkergenen (184) und wird für die Einleitung der Knorpeldifferenzierung während der Embryogenese benötigt. Sox 9 wird ebenso exprimiert in High-Density-Kulturen (185) und ist möglicherweise auch wichtig für die Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten.

Das Einbringen der Zellen in ein dreidimensionales Gerüst fördert die Redifferenzierung (20-22). Besonders gute Erfolge konnten bei der Verankerung der Zellen auf Filterunterlagen, Vliesen, bioabbaubaren polymeren oder schwammartigen Matrices erzielt werden (23, 24). Jedoch wird auch die Ansicht vertreten, dass die Verhältnisse im dreidimensionalen Vlies nicht viel anders sind als die in der Monolayerkultur. Zellen in Zellkulturflaschen haften an der Bodenfläche, flachen sich ab und breiten sich aus. Die Bedingungen, die sich für eine Zelle im dreidimensionalen Konstrukt bieten, sind allerdings nicht viel anders, da der Zwischenfaserabstand für die im Durchmesser sehr kleinen Zellen (20 µm) sehr groß ist, was ein Anheften der Zellen in mehrere Richtung verhindert (44).

6.4 Die Immunmodulation und ihre Auswirkungen

Glukokortikoide zeigen eine ausgeprägte entzündungshemmende Wirkung, die auf verschiedenen Mechanismen beruht: membranstabilisierender Effekt, Hemmung der Prostaglandinsynthese, Blockade der Arachidonsäurekaskade, Hemmung mesenchymaler Prozesse und eine immunsuppressive Wirkung auf das lymphatische System. Aus diesen verschiedenen Wirkungen resultiert ein antiexsudativer und analgetischer Effekt bei akuten

Entzündungen, eine Hemmung überschießender bindegewebiger Reaktionen und leukozytärer Infiltrationen bei chronischen Entzündungsprozessen sowie ein anti-allergischer Effekt. Als Nebenwirkungen bezeichnet man deren Einfluss auf den Elektrolythaushalt (Calcium- und Kaliumspiegel senkend, Natriumretention), den Glukosestoffwechsel, die Wundheilung (deren Verzögerung) und die Nebennierenrinde-Hypophysenachse (ACTH-Suppression) (135).

Die Gesamtleukozyten blieben meist im Normbereich, lediglich bei dem Kieselgelfaser-Tier Schwein 5 (Cortison systemisch) waren sie leicht erhöht. Eine Neutrophilie war besonders ausgeprägt bei den systemisch mit Cortison behandelten Tieren Schwein 2 (Tag 8 bis Tag 16) bzw. bei Schwein 5 (Implantation bis Tag 16). Etwas geringer fiel sie aus bei Schwein 4, dem Kontrolltier der Versuchstiergruppe 2. Das Phänomen könnte auf die erfolgte Kortikoidapplikation hinweisen oder aber auch Hinweis auf den Stress sein, dem die Tiere in der Narkose ausgesetzt waren. Auch nekrotisierende Gewebsreaktionen oder akute Entzündungsgeschehen können zu einer Neutrophilie im Blut führen. Da bei keinem der Versuchsschweine eine Monozytose, Lymphopenie und/oder Eosinopenie auftrat, besteht kein Hinweis auf eine (nachteilige) Glukokortikoidanwendung. Einen Hinweis, dass kein ausreichend hoher Cortisonspiegel bezüglich einer Immunmodulation erreicht werden konnte, liefern die Gewebe-Parameter, die sonst anders ausgefallen wären. Sowohl die chronische Entzündungsreaktionen als auch die fibrotischen Erscheinungen hätten unter Cortison – Einfluss niedriger ausfallen oder einen abfallenden Kurvenverlauf zeigen müssen. Eine Bestimmung des täglichen Blutcortisolspiegels bei den Schweinen war aufgrund des hohen Stressfaktors für die Tiere nicht möglich.

Abfallende Blutleukozytenzahlen – hier ab Tag 8 bzw. Tag 16 – mit gleichzeitiger Vermehrung der Lymphozyten (ab Tag 16) sprechen für einen guten Heilungsverlauf. Die Elektrolytwerte Natrium, Kalium und Calcium, die bei jedem chirurgischen Eingriff bestimmt worden waren, lagen bei allen Tieren im unteren Normwertbereich oder leicht darunter. Der Parameter Chlorid zeigte Werte, die teils unterhalb, teils oberhalb des Normwertbereiches lagen. Dabei war kein Zusammenhang zwischen einer potenziellen Cortisonapplikation und dem Zeitverlauf herzustellen.

Bei der histologischen Untersuchung der Gewebeproben konnte man insofern einen Einfluss des Glukokortikoids feststellen, dass bei den mit Cortison lokal behandelten Tieren der Versuchstiergruppe 1 (Ethisorb®) sich Verkalkungen und metaplastische Verknöcherungen zeigten, wie auch schon in vorausgegangenen Kaninchenstudien mit der Anwendung der gleichen Konzentration einer Triamcinolon-Lösung gezeigt werden konnte (150). Bei den

faserfreien Konstrukten der Versuchstiergruppe 2 kam es bei den immunmodulierten Schweinen zu dem Nachweis von Chondrozyten, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Proben. Bei histologischer Beurteilung der Entzündungsparameter im Implantationsbett allerdings fielen die Interpretationen recht gegensätzlich aus. So sanken bei dem „Cortison-lokal“-Schwein der Ethisorb®-Gruppe die Eosinophilie-Kurven, während sie in der Parallelgruppe leicht anstiegen, wie auch die Kurven bei dem oral mit Cortison versorgten Schwein. Das entsprechende Ethisorb®-Tier lieferte Kurven, die um Grad 1 schwankten. Demnach konnte im wesentlichen kein entzündungshemmender oder unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufender Effekt nachgewiesen werden. Bedeutend ist aber die positive Auswirkung hinsichtlich des weniger starken Chondrozytenverlustes und der auftretenden Verkalkungen bzw. Verknöcherungserscheinungen bei den Tieren, die immunmoduliert worden waren.

In Zusammenhang mit der Cortisonapplikation ist, wie in dieser Studie erfolgt, die Antibiotikum-Applikation ratsam, da durch den immunsuppressiven Effekt das Tier empfänglicher für Allgemeininfektionen ist. Dabei ist anzumerken, dass Chemotherapeutika und Zytostatika die zelluläre Proliferation von Mesenchymzellen und inflammatorischen Zellen beeinträchtigen. Durch myelotoxische Wirkungen wird eine Leuko- und Thrombozytopenie induziert, die wiederum einen negativen Einfluss auf die Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen hat (116), was in dieser Studie jedoch nicht auftrat.

6.5 Ein Ausblick

Das Tissue Engineerings wird in Zukunft ein großes und wichtiges Arbeitsfeld der Naturwissenschaftler bleiben. Arbeitsgruppen mit ähnlichen Zielen müssen sich gedanklich austauschen, es müssen immer wieder Arbeitsschritte kritisch überdacht und verändert werden, um in der nahen Zukunft dem Patienten ein kosmetisch zufriedenstellendes autologes Knorpeltransplantat bieten zu können.

So konnte man in *in vivo* Untersuchungen zeigen, dass das wichtigste chondrogenetische Potenzial freie (186, 187) und insbesondere vaskularisierte (188, 189) Perichondriumtransplantate besaßen (190, 191). Weitere Untersuchungen ergaben, dass vom Perichondrium ausgehend neues Gewebe mit einer knorpelspezifischen Matrix erzeugt werden kann (192), was ein Ansatz für zukünftige Knorpelzüchtung sein kann. Es ist

erwiesen, dass Perichondrium eine potente Quelle für die Knorpelregeneration darstellt (193, 194). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte diese Beobachtung gemacht werden. Es wurde einem Hausschwein *in vivo* der Ohrknorpel entfernt, Haut inklusive Perichondrium wurde am Tier belassen und chirurgisch wieder verschlossen. Nach einigen Wochen hatte sich eine komplett neue, leicht formveränderte knorpelige Ohrmuschel ausgebildet. Die perichondriumabhängige Knorpelformation *in vitro* ist sicherlich abhängig von unterschiedlichen Faktoren wie Alter des Spendertieres und den Kulturbedingungen (108). Perichondrale Vorläuferzellen differenzierten zu Chondrozyten, weil dem Kulturmedium Wachstumsfaktoren hinzugegeben worden waren (57). Das sich darstellende technische Problem war und ist allerdings die sorgfältige Präparation des Perichondriums unter Ausschluss von Fibroblasten. Deswegen ist eine exakte Entfernung des Perichondriums nötig, um eine Überwucherung der Chondrozytenkultur durch Fibroblasten zu verhindern (44). Darin liegt auch der Nachteil der aurikulären gegenüber der artikulären Chondrozytenkultur: Aurikulärer Knorpel, der Fibroblasten enthält, läuft Gefahr, in der Zellkultur von den Fibroblasten überwuchert zu werden mit der Folge der verminderten Knorpelproduktion. Im Gegensatz dazu enthält Gelenkknorpel nur einen einzigen Zelltyp, die Chondrozyten, so dass dieses Problem hier nicht auftritt (98).

Ein Lösungsansatz ist es, den Knorpelzelltyp während der Chondrozytenamplifizierung zu erhalten oder die Redifferenzierung zu induzieren, nachdem die Chondrozyten ihren Phänotyp verloren haben (44).

Dazu gehört die Optimierung der Einbettung der Zellen im dreidimensionalen Konstrukt. Zunächst kann man wie Mikos et al. das Polylaktid-Polyglykolid-Vlies mit Ethanol durchnässen, bevor man es mit den Zellen besiedelt. Dadurch soll deren Penetration und deren gleichmäßige Verteilung im Konstrukt verbessert werden (195). Zusätzlich ist es sicherlich von Vorteil, möglichst große Zellkonzentrationen in das dreidimensionale Vliesmaterial einzubringen, um jeder einzelnen Zelle die Möglichkeit zu geben, in Kontakt zur Nachbarzelle zu treten. Denn es ist nachgewiesen, dass High density – Kulturen die Differenzierung begünstigen, sobald es zu Zell-Zell-Interaktion kommt (144, 164, 177, 196). Es ist bekannt, dass die Zelldichte sowohl im Monolayer (197) als auch im Vlies (50) ausschlaggebend für das Verhalten der Zellen in Kultur ist. Puelacher et al. unternahmen eine Untersuchung, bei denen sie Schultergelenkknorpelzellen von Kälbern in den Konzentrationen von 2, 10, 20 und 100 Mio. Zellen/ml auf Vliesmaterial brachten und nach 1 Woche Vorkultur in Nacktmäuse subkutan implantierten, wo sie 12 Woche bis zur Explantation verblieben. Das Ergebnis stand in direkter Korrelation zu einer höheren

Ausgangszellzahl (mit Ausnahme von 2 Mio. Zellen/ml). Es war eine größere Dicke und ein gesteigertes Nassgewicht des explantierten Knorpels verbunden mit einem höheren Gehalt an Glykosaminoglykanen nachzuweisen (86). Dabei ist der Erfolg abhängig von der Tierart und von der Knorpelquelle. So lieferten bei bovinen Gelenkchondrozyten Zelldichten zwischen 50 und 100 Millionen Zellen/ml beste Ergebnisse (198).

In der Versuchstiergruppe 2 wurde alle 2 bis 3 Tage nur die Hälfte des Transplantat-Kulturmediums ausgetauscht, um eine Knorpelmatrixproduktion zu begünstigen. Denn Chondrozyten sezernieren Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die ihre eigene Differenzierung wiederum fördern (30, 199-201).

Auch eine Vorkultivierungsphase vor Implantation des Konstrukts ins Tier sollte beibehalten werden, da die Untersuchungen von humanen Ohrchondrozyten in PGA-Vliesen ergaben, dass der Grad an Ausbildung von fibrinösem Gewebe, der Gehalt an Polyglykolsäure und die entzündliche Reaktion direkt umgekehrt mit der Zeit korrelierte, in der die Zellen zunächst *in vitro* gehalten wurden, bevor sie ins Tier implantiert wurden. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass eine kürzere *in vitro* Phase (6 Wochen oder weniger) die Eigenschaften des zu generierenden Gewebes günstig beeinflussen (53).

Die Verwendung anderer Trägersubstanzen muss ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Wie beschrieben wirkt sich die Verwendung von Alginat äußerst günstig auf die Differenzierung der Chondrozyten aus. Um den Nachteil seiner Reaktion *in vivo* auszugleichen, erscheint es daher sinnvoll, das Alginat mit einer biodegradierbaren und biokompatiblen Substanz zu mischen, anschließend die Zellen in einem solchen Mischgel zu kultivieren und unmittelbar vor dem Zeitpunkt der geplanten Implantation das Alginat mittels der Zugabe von Citrat herauszulösen. Untersucht wurde diese Kombination aus Alginat und Fibrin, da letzteres als Gewebekleber den Anforderungen an ein Trägermaterial weitgehend entspricht und ausreichende Erfahrungen über dessen klinischen und experimentellen Einsatz vorliegen (202, 203). Die Verwendung des Hydrogels Pluronic F 127 brachte gute Knorpelergebnisse (204, 205). Dieses Trägermaterial scheint zeitweise (um den 8. Tag nach Implantation) das zu transplantierende Fremdmaterial vor dem Immunsystem zu schützen, was später die produzierte Knorpelmatrix übernimmt (205). Der Nachteil ist die fehlende Formgebung dieses Trägermaterials, daher scheint auch hier die Kombination mit einem geeigneten Gerüstmaterial sinnvoll.

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren ist sicherlich eine guter und praktikabler Ansatz, die in dieser Studie erzielten Ergebnisse zu verbessern. So wurden in einer Monolayerkultur porcine

Ohrchondrozyten in Kulturmedium (Hams F12) ohne Wachstumsfaktoren und in Medium, dem b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) zugesetzt worden war, über 3 Wochen amplifiziert bis eine dicke Zellschicht den Zellkulturflaschenboden bedeckte. Das histologische Bild *in vitro* war das von polygonalen Zellen. Nach autologer Implantations-Injektion entstand porciner Ohrknorpel, wobei der Knorpel aus Zellen, die unter Wachstumsfaktorzusatz standen, qualitativ und quantitativ besser erschien (204). Auch bei Menschen wurde der positive Effekt auf die Bildung von aurikulärem Knorpel beobachtet (79).

Nicht zu letzt müsste man die Auswirkungen von anderen Immunmodulatoren auf den *in vitro* gezüchteten Knorpel und auf den autologen Empfängerorganismus untersuchen.