

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. W. Ertel

**WIEDERHERSTELLUNG DER GELENKFLÄCHE DURCH
DEGRADIERBARE OSTEOCHONDRALE IMPLANTATE –
ENTWICKLUNG EINES NEUEN MODELLS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Markus Benjamin Mensing
aus Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. C. Müller-Mai
Korreferent: Prof. Dr. med. H.-G. Breyer

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 23.6.2006

Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone Morphogenetic Protein
d	Tage (days)
ECM	extrazelluläre Matrix (extra cellular matrix)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
GAG	Glykosaminoglykane
h	Stunden (hours)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMDS	Hexamethyldisilazan
IGF	Insulin like Growth factor
KPZ	Kalziumphosphatzement
KM	Knochenmark
MMA	Methylmetacrylat
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
PAS	Perjodsäure-Schiff Reagenz
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDS	Polydioxanon
PGA	Polyglykolat (Polyglycolic acid)
PGLA	Polylaktatcoglykolat (Poly[lactid-co-glycolic] acid)
P(L)LA	Poly(L)laktat (Poly[L]lactic acid)
PMMA	Poly-Methylmetacrylat
PO	Propylenoxyd
SBF	Simulated Body Fluid
REM	Rasterelektronenmikroskop
TCP	Trikalziumphosphat (Tricalcium-phosphate)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF	Transforming Growth Factor

1	Einleitung & Fragestellung	9
2	Material & Methoden.....	14
2.1	Verwendete Biomaterialien	14
2.1.1	Polymervlies	14
2.1.2	Fibrin.....	14
2.1.3	Trägermaterialien.....	14
2.1.3.1	Kalziumkarbonate	14
2.1.3.2	Zemente als abbindende Materialien	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Knorpelpräparation / Chondrozytenisolation	16
2.2.2	Monolayerkultur	17
2.2.3	Passage.....	17
2.2.4	Herstellung der Biphasen (Kalziumkarbonate)	18
2.2.4.1	Aragonit (Biocoral®)	18
2.2.4.2	Kalzit.....	18
2.2.5	Herstellung der Biphasen (abbindende Materialien).....	18
2.2.6	Vorbereitung des Perfusionssystems	19
2.2.7	Kultivierung der Biphasen.....	19
2.2.8	Histologie	19
2.2.8.1	Lichtmikroskopie	19
2.2.8.1.1	Anfertigung der Sägeschnitte.....	19
2.2.8.1.2	Methylmetacrylat (MMA)-Einbettung.....	20
2.2.8.1.3	Färbungen	20
2.2.8.1.3.1	Färbung nach Giemsa (Übersichtsfärbung).....	20
2.2.8.1.3.2	Färbung nach Alzianblau / PAS	20
2.2.8.1.3.3	Färbung nach v. Kossa / Paragon	20
2.2.8.2	Elektronenmikroskopie	21
2.2.8.2.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	21
2.2.8.2.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	21

2.2.9	Kristallographische Röntgenanalyse.....	21
2.2.10	pH-Bestimmung Mediumablauf KPZ I vs. KPZ II	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Herstellung der Biomaterialträger	23
3.1.1	Variation der Abbindezeiten.....	24
3.1.2	Interface: Technik & Stabilität	25
3.1.2.1	Kalziumkarbonate	25
3.1.2.2	Abbindende Materialien	26
3.2	Zellisolation.....	27
3.3	Monolayerkultur – Zellvermehrung	27
3.4	Makroskopische Implantatbetrachtung	28
3.4.1	Kalziumkarbonate	29
3.4.2	Abbindende Materialien	29
3.4.2.1	Kalziumphosphat I	30
3.4.2.2	Kalziumphosphat II	31
3.4.2.3	Kalziumsulfat / TCP	31
3.5	Lichtmikroskopische Untersuchung.....	32
3.5.1	Knorpelphase.....	32
3.5.1.1	Degradation der Polymervliese.....	32
3.5.1.2	Zell-/ Matrixmorphologie	32
3.5.2	Interface.....	33
3.5.2.1	Aragonit	34
3.5.2.2	Kalzit.....	34
3.5.2.3	Kalziumphosphatzement I	35
3.5.2.4	Kalziumphosphatzement II	35
3.5.2.5	Kalziumsulfat / TCP	36
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie	36

3.7	Rasterelektronenmikroskopie	36
3.8	Weitere Ergebnisse	37
3.8.1	Mediumzufuhr in Experiment I	37
3.8.2	Kristallographische Röntgenanalyse.....	37
3.8.3	Wasserstoffionenkonzentration der verbrauchten Medien: Vergleich der beiden Kalziumphosphatzemente.....	37
4	Diskussion.....	39
4.1	Gelenkdestruktion	39
4.2	Therapieansätze.....	41
4.2.1	Rekonstruktion durch Transplantation/Implantation.....	42
4.2.1.1	Allogene / Autogene Transplantation.....	42
4.2.1.2	Perichondrium - Periost - Synovis.....	44
4.2.1.3	Chondrozytentransplantation.....	45
4.2.1.4	Mesenchymale Stammzellen.....	46
4.2.2	Biomaterialien - Biologische und synthetische Matrices	48
4.2.2.1	Biomaterialien zur Knochenregeneration.....	50
4.2.2.2	Biomaterialien zur Knorpelregeneration.....	52
4.3	Entwicklung der Methodik	54
4.3.1	Implantatherstellung (Gerüst für die Gewebezüchtung).....	55
4.3.1.1	Materialien	56
4.3.1.1.1	Knochenphase.....	56
4.3.1.1.1.1	Kalziumkarbonate.....	57
4.3.1.1.1.2	Kalziumsulfat / TCP	58
4.3.1.1.1.3	Kalziumphosphatzemente	58
4.3.1.1.2	Knorpelphase.....	60
4.3.1.1.3	Interface-Stabilisierung	62
4.3.1.1.4	Randzone	65
4.3.2	Chondrozyten – Kultivierung.....	65

4.3.2.1	Isolation	66
4.3.2.2	Vervielfältigung und Dedifferenzierung	67
4.3.2.3	Dreidimensionale Orientierung und Redifferenzierung	68
4.3.2.4	Perfusionskultur	69
4.3.2.5	Physiochemische, pharmakologische und biomechanische Stimulation	70
4.4	Implantat-Eigenschaften und Gewebeerscheinung.....	71
4.4.1	Knochenphase (Biomaterialträger)	71
4.4.2	Knorpelphase.....	73
5	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
6	Anhang	79
6.1	Abbildungen.....	79
6.2	Tabellen	105
6.3	Danksagung	114
6.4	Lebenslauf.....	116
6.5	Literatur	118



5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Rekonstruktion von osteochondralen, d. h. Knorpel und Knochen umfassenden Defekten, wurden verschiedene Techniken zur Herstellung biphasischer Implantate aus biodegradablen Materialien entwickelt und untersucht. Die Implantate wurden mit vitalen, zuvor isolierten und in Monolayerkultur vervielfältigten Chondrozyten versehen und *in vitro* unter Perfusion für bis zu 84 Tage kultiviert. Eine Auswertung erfolgte unter makroskopischen, licht-, transmissions- und rasterelektronenmikroskopischen Gesichtspunkten.

Für die Knorpelphase wurden Polymervliese aus 90% Glykolat und 10% Laktat, deren Fasern punktuell mit Polydioxanon-Klebestellen verbunden sind, in Kombination mit Chondrozyten (dreidimensional in Fibrin orientiert) verwendet. Bovine Zellen wurden aus frischem Gelenknorpel durch enzymatischen Verdau der Matrix isoliert und in Multilayertechnik vervielfältigt. Für die Knochenphasen der verschiedenen Implantate dienten neben porösem Aragonit und solidem Kalzit (Kalziumkarbonate) zwei Kalziumphosphatzemente (KPZ I: Biobon[®]; KPZ II: Norian SRS[®]) und ein Gemisch aus Kalziumsulfat und Trikalziumphosphat (abbindende Materialien). Durch die abbindenden Eigenschaften konnten bei der Herstellung Anteile der Polymervliesfasern (vor der Bestückung mit Zellen) in die entsprechenden Knochenersatzstoffe inkorporiert werden, so dass Komposite mit entsprechender Stabilitätserhöhung des Interfaces zwischen Knorpel- und Knochenphase entstanden. Bei den nicht abbindenden Kalziumkarbonaten führte die Porosität des Aragonits zu einer Penetration der Fibrinogen-Zellsuspension und damit zu einer über 670fachen Vergrößerung der Kontaktfläche im Vergleich zur glatten Oberfläche des Kalzits. Eine entsprechende Stabilitätserhöhung des Interfaces war die Folge. Die hergestellten Implantate wurden nach dem Versehen mit Zellen unter Perfusionsbedingungen bis zu 84 Tage kultiviert. Nach der makroskopischen Betrachtung erfolgte die Aufbereitung der Präparate für die mikroskopischen Untersuchungen.

In der makroskopischen Betrachtung konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Herstellungsarten und Knochenersatzmaterialien bezüglich der Knorpelphase festgestellt werden. Allerdings schien eine Abhängigkeit von der Kulturdauer, als auch von der verwendeten Fibrincharge, die unterschiedli-

che Degradationszeiten aufwies, zu bestehen. Mit ansteigender Kulturzeit erschien die Knorpelphase zunehmend milchig-homogen, die Oberfläche überwiegend eben und besaß einen spiegelnd glatten Charakter. Im Vergleich zu nativem Knorpelgewebe erschien das kultivierte Gewebe nach 70 d palpatorisch ebenfalls druckelastisch, jedoch deutlich weicher. Erhebliche Unterschiede konnten allerdings bei der Knochenphase- und Interfacebetrachtung beobachtet werden: Bei den Kalziumkarbonaten konnte bei der manuellen Prüfung keine nennenswerte Veränderung von Erscheinungsbild und Konsistenz der Biomaterialträger festgestellt werden. Das Trägermaterial aus Kalziumsulfat / TCP war bereits nach einer Kulturzeit von 7 Tagen vollständig erweicht und besaß dann eine pastenartige Konsistenz, die eine stabile Verankerung im subchondralen Knochen (spätere Anwendung) unmöglich erscheinen ließ. Während sich bereits nach 2 Wochen die Polymervliese von dem KPZ I mit geringen Anteilen des Trägermaterials durch Auslaugung ablösten, konnte dieses Phänomen beim KPZ II, der einen deutlich homogeneren und belastungsstabileren Eindruck bei der manuellen Prüfung machte, nicht beobachtet werden.

In den mikroskopischen Auswertungen konnten bezüglich der Knorpelphase keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Trägermaterialien festgestellt werden. Die Degradation von Fibrin und Polymervliesfasern verlief bei allen Präparaten der gleichen Fibrincharge gleichmäßig, während eine zunehmend metachromatisch anfärbbare Matrix in Form von Zellhöfen, die mit zunehmender Kulturzeit konfluieren, nachweisbar war. Auch in unmittelbarer Nähe zu den verschiedenen Knochenersatzstoffen konnten matrixproduzierende vitale Zellen beobachtet werden. Trotz der zunehmenden Degradation von Fibrin und Polymervlies kam es zu keiner vollständigen Insuffizienz des Interfaces. Allerdings fanden sich bei einigen Präparaten des nicht porösen Kalzits leichte Ablösungserscheinungen im Interfacerandbereich. Bei dem KPZ I war das Material im Bereich der Polymervliesfasern aufgelockert, ein fester Kontakt zwischen Fasern und Material war im Vergleich zum KPZ II bereits nach 2 Wochen nicht mehr vorhanden. Es kam zu einer Spaltbildung innerhalb des Materials unmittelbar unterhalb des Interfaces, während sich die Polymervliesfasern der aus dem KPZ II angefertigten Implantate auch noch nach 84 Tagen Perfusionskultur fest im Material verankert zeigten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass sowohl die Herstellung von vitalen degradierbaren Implantaten als auch deren Züchtung *in vitro* möglich sind, so dass mit ihnen eine Wiederherstellung der Gelenkfläche erfolgen könnte. Die Kombination aus KPZ II als Trägermaterial und in Fibrin dreidimensional orientierten Chondrozyten in Polymervliesen, deren Fasern durch die abbindenden Eigenschaften des KPZ II auch über 84 Tage Kulturzeit fest verankert bleiben, scheint bezüglich einer späteren klinischen Anwendung am ehesten in Frage zu kommen.