

## 4 Diskussion

### 4.1 Knorpelgewinnung, Zellkultur und Implantation

In der vorliegenden Arbeit wurden Chondrozyten aus dem Femur getöteter Rinder gewonnen. Diese wurden gekühlt transportiert, allerdings unsteril, da die Gelenkkapsel nicht erhalten wurde. Um Sterilität herzustellen wurde die Knorpeloberfläche mit einer Alkohollösung desinfiziert. Die dabei zerstörten Chondrozyten wurden ebenfalls abgeschält und verdaut. Diese Zellen konnten nicht herausgefiltert werden, sie heften sich aber nicht mehr an den Boden der Zellkulturflasche an. Während dieser Arbeit lag der Anteil der abgestorbenen Zellen stets deutlich unter 50% und es mussten keine Zellsuspensionen verworfen werden. Man erkennt aber einen hohen Anteil an abgestorbenen Zellen, nachdem man das Transplantat aus der in vitro Versuchsanordnung in vivo überführt hat. Das liegt zum einen daran, dass das Transplantat nicht mehr kontinuierlich mit Nährmedium versorgt wird und zum anderen in einem Organismus dem Immunsystem ausgesetzt ist.

Um eine Zellteilung und damit Amplifikation der Knorpelzellen zu erreichen, müssen sie zuerst aus ihrem arretierten differenzierten Stadium in ein teilungsfähiges Stadium überführt werden. Die Monolayerkultur ist eine dafür gut geeignete Zellkultur. Erst dieser Stimulus bzw. der Prozess der Dedifferenzierung, den die Knorpelzellen in der Kultur durchlaufen, macht eine erneute Zellteilung, der vorher in ihrer räumlichen Anordnung fixierten postmitotischen Chondrozyten, möglich<sup>92</sup>. Dieser Prozess von der Aktivierung bis zur Zellteilung ist aber nicht vollständig reversibel. Zum Beispiel ist nach Einbringung der Zellen in eine dreidimensionale Matrix die Expression von Kollagen IX nach mehreren Wochen noch irreversibel blockiert<sup>107</sup>. Andererseits hat die Dauer der Monolayerkultur keinen Einfluss auf die Expression von Kollagen Typ II in einer 3-D Struktur<sup>100</sup>. Weiterhin gehen nach dem Umsetzen einer Zellkultur viele Zellen unter und setzen erst nach einer Latenzzeit wieder mit der Proliferation ein und erreichen damit verzögert das Ausgangsniveau der Zellzahl und -dichte. Problematisch bei der Kultur und Herstellung von

Knorpelersatz ist der Umstand, dass im normalen Knorpel die Zellen und ihre Produkte durch eine Barriere geschützt und frei von Blutgefäßen sind. Im vorliegenden Tiermodell wird das Implantat lediglich subkutan verpflanzt. Damit ist ein direkter Kontakt des Organismus zum eingebrachten Material möglich und die für die Chondrozyten notwendige extrazelluläre Matrix unterliegt damit der natürlichen Degradation und dem Abtransport in einem fremden Organismus. Die Reaktion des Organismus war in beiden Versuchsgruppen ähnlich. Bereits nach sieben Tagen erkennt man um alle Transplantate eine Schicht aus Narbengewebe und eingesprossenen Gefäßen. In einem Teil fanden sich auch Entzündungszellen, wie Leukozyten, Makrophagen und wenige Lymphozyten.

Durch das relativ große Volumen der Implantate im Vergleich zu den Nacktmäusen, entstand eine relativ hohe Spannung der Haut, was man anhand von Atrophiezeichen der Haut und der Anhangsorgane im histologischen Bild sehen konnte. Daraus resultierten auch Kräfte und Spannungen auf die Knorpelschicht. Da die Implantate nicht fixiert wurden, kam es zu einer ständigen Reibung der Implantate auf der Muskelfaszie der Mäuse. Der damit entstandene Druck und die Scherkräfte könnten in vielen Fällen zu einer Differenzierung der Chondrozyten zu Fibrozyten geführt haben oder die Redifferenzierung war nur sehr unvollständig. In vielen Präparaten erkennt man einen kontinuierlichen Übergang von differenzierten Chondrozyten mit Metachromasie, in Zellschichten, die nur aus Fibrozyten bestehen.

## **4.2 Das bioresorbierbare Polymervlies als Trägerstruktur**

Im Tissue Engineering finden Polyglykolsäure (PGA) und Polylaktidsäure (PLA) und deren Copolymere als Vlieskonstrukte aller Art eine weite Anwendung<sup>34</sup>. Sie gelten als bioresorbierbar und biokompatibel und sind geeignet, unterschiedliche morphologische und funktionelle Strukturen vorzugeben. Der Vorteil der Polymervliese besteht zudem in der einfachen Handhabung der zu verpflanzenden Zellen. Man erkennt zwar in beiden Versuchsgruppen Zellinseln, die sich nicht an der ursprünglichen Stelle des Zements befinden, wohin sie verpflanzt worden sind, aber es liegt eine Häufung bei den Implantaten ohne Vlies vor. Das lässt schließen, dass

das Vlies eine stabilisierende Wirkung auf die Chondrozyten hat und sie vor mechanischen Einflüssen schützt. Der Vorteil des Vlieses besteht aber hauptsächlich darin, dass es die verpflanzten Zellen in einer 3D Struktur hält und sie somit zu einer Matrixsynthese stimuliert werden<sup>21</sup>. Die Ergebnisse dieser Studie weichen daher von anderen Ergebnissen ab. Die Unterschiede zwischen den Implantaten mit Vlies und der Kontrollgruppe bezüglich Knorpeldicke und Knorpelfläche sind nicht signifikant. Nach 7 Tagen zeigen die Präparate ohne Vlies im Durchschnitt mehr Matrix und Metachromasie, obwohl hier das Gegenteil zu erwarten war. Allerdings zeigt sich eine deutlich größere Knorpeldicke bei den Präparaten mit Vlies. Diese nimmt nach 14 Tagen aber stark ab und im Gegensatz dazu nimmt die Dicke in der Kontrollgruppe zu. Somit lässt sich nicht sagen, dass es durch das Implantieren an sich und durch eine neue Umgebung in der Nacktmaus zu einem erhöhten Absterben von Chondrozyten kommt. Erst nach 84 Tagen zeigt sich in Bezug auf die matrixbildenden Bereiche in beiden Gruppen ein ähnliches Bild. Ebenfalls Unterschiede gibt es in der Oberflächenregularität. Hier wäre zu erwarten gewesen, dass das Vlies die Zellen und die neu synthetisierte Matrix zu Beginn stabilisiert, bevor das Vlies dann selbst abgebaut wird. Jedoch zeigt sich durchgängig in der Kontrollgruppe ohne Vlies, dass die Oberfläche viel glatter und gleichmäßiger ist. Offenbar spielte in diesem Zusammenhang auch das verwendete Fibrin eine große Rolle. Durch den Kleber werden die Zellen ebenfalls in einer räumlichen Anordnung gehalten und so stimuliert, knorpeltypische extrazelluläre Matrix zu bilden. Der Nachteil des Co-Polymers aus PGA und PLA (PGLA) besteht zudem in seiner Zusammensetzung (Abb. 33). Die beim Abbau des Polymers freiwerdende Polyglykolsäure und Laktat erzeugen ein saures Milieu. Die Laktatkonzentration kann dabei auf Werte ansteigen, die weit über der physiologischen Konzentration liegen<sup>92</sup>. In der Perfusionskultur werden diese Abbauprodukte durch einen kontinuierlichen Fluss des Medium abtransportiert, aber nach dem Implantieren ist der Abtransport durch das Fehlen dieses künstlichen Flüssigkeitsstrom nicht mehr so schnell möglich. Das saure Milieu kann außerdem eine Chemotaxis bewirken und die beobachtete Infiltration teilweise erklären. Britt et al.<sup>10</sup> berichten in einem Versuchsaufbau mit autolog gewonnenen Chondrozyten in einem PGLA-Konstrukt in vivo von einer Fremdkörperriesenzellreaktion und von einer Resorption von

implantiertem Knorpel nach vier Wochen in vivo. Sie stellen die Hypothese auf, dass diese Reaktion mit Fremdkörperriesenzellen die Chondrogenese im Bereich der Vliesstrukturen gestört hat. Auch andere Ergebnisse lassen auf ein immunologisches Potenzial des Polymers schließen<sup>68</sup>. Diese Reaktion führt additiv, mit der nicht vollständig ausgebildeten Matrix und der damit erhöhten Vulnerabilität der Chondrozyten, zu einem negativen Effekt des im Aufbau befindlichen Knorpelgewebes. Dieser Befund erklärt auch die häufig beobachtete Proliferation von Fibroblasten und die reduzierte Matrixbildung.

Ein Unterschied dieser Studie im Vergleich zu anderen, die zum Teil bessere Ergebnisse mit PGLA-Vliesen erreichten<sup>81,93</sup>, liegt möglicherweise auch im Design der Biphasen. Da auf einer Seite des Vlieses eine Zementschicht ist, lässt sich das Vlies nur von einer Seite mit Zellen beimpfen. Die Beladung des Vlieses mit der Zellsuspension erfordert, dass die Luft, die sich in dem Vlies befindet, herausgedrückt wird. Dies erweist sich aber häufig als sehr schwierig, da die einzelnen Fasern dicht beieinander liegen und die Gasblasen gefangen halten. Man kann dieses Problem umgehen, indem man wiederholt das Vlies mit der Zellsuspension durchtränkt. Allerdings hat man in diesem Versuch durch den Zement nur eine Seite des Vlieses für die Beladung mit Zellen zur Verfügung. Durch die Schwerkraft ist die Verteilung der Zellen zudem nicht gleichmäßig. Auch sind die Räume im Vlies durch die ungeordnete Ausrichtung der Polymerfasern ungleich groß. Daraus folgt eine von Anfang an unterschiedliche Dichte der Zellen. Bevor das Fibrinogen in der Suspension aktiviert wird, vergeht zudem eine gewisse Zeit, währenddessen die Zellen von der Oberfläche an den Seiten herunterlaufen. Die in vielen Präparaten beobachteten Zellen mit knorpeliger Differenzierung außerhalb des Vlieses bzw. der Knorpelschicht könnten darauf zurückzuführen sein. Allerdings zeigte sich hier ein großer Vorteil des Vlieses. Während man zum einen in den Präparaten ohne Vlies häufiger Zellen außerhalb der Knorpelschicht findet, zeigt sich zum anderen, dass die Oberfläche regelmäßig ein ähnliches Bild zeigt: An den Rändern der Knorpelschicht ist die Höhe viel geringer und bisweilen null, wohingegen zur Mitte hin die Höhe am größten ist. Bei einem möglichen Einsatz im Gelenk wäre dieser Umstand ein entscheidender Nachteil, da gerade die Einheilung

an der Randzone wichtig ist und ein möglichst gleichmäßiger Übergang vom nativen Gelenkknorpel zum artifiziellen Knorpel zu erzielen ist<sup>91</sup>.

Ein Großteil der Studien, die heute zur Thematik Knorpeltransplantation mit Hilfe des Tissue Engineering durchgeführt werden, greift auf dreidimensionale Trägermaterialien zurück. In der vorliegenden Studie wurde versucht, dem anatomischen Knorpel und subchondralen Knochen näher zu kommen, indem man das Trägermaterial mit einem Knochenzement kombinierte. Ein Nachteil der sich daraus ergibt, ist die Ernährung des Transplantates und der enthaltenen Zellen. Die Oberfläche des Regenerates ist ohne eine Zementphase nahezu doppelt so groß. In Kombination mit dem Zement ist außerdem die Diffusionsstrecke von der Oberfläche zu den Chondrozyten, die dem Zement nahe sind, fast verdoppelt. Dieser Umstand könnte durch Minderversorgung zu einem erhöhten Absterben der Chondrozyten nach Transplantation in die Maus führen (Abb. 34). Doch gerade der Umstand, dass die Zellen an der Oberfläche des Zements nur schlecht ernährt werden, kommt dem normalen Gelenkknorpel sehr nah. Dort haben Knorpelzellen an der Oberfläche des Knochens in der Verkalkungszone ebenfalls einen maximalen Abstand zur Nährstoff und Sauerstoff führenden Synovia. Das Polymergerüst in Verbindung mit den Polydioxanon-Klebspunkten stellt aber im Gegensatz zur extrazellulären Matrix, durch die die Diffusion erfolgt, eine zusätzliche Barriere dar.

Eine Alternative zur alleinigen Anwendung von PGLA Polymeren ist eine Kombination aus einem PGLA Polymer und Chondrozyten in Alginat oder Agarose. Schon die Kombination aus dem Polymer und Alginat ohne die Anwesenheit von Chondrozyten scheint die Chondrogenese in vivo zu stimulieren<sup>64</sup>. Die Zellverteilung ist in dieser Kombination wesentlich besser und man findet einen gleichmäßigen Abstand der Chondrozyten im Vlies.

### **4.3 Der verwendete Knochenzement**

Die Anforderungen an den verwendeten Zement waren eine möglichst hohe Bioverträglichkeit, Stabilität und die physikochemische Verbindung zur Verankerung

im subchondralen Knochen. Die letztere und Hauptanforderung an den Zement, nämlich möglichst rasche Degradation und Ersatz durch körpereigenen Knochen, wurde in diesem Tiermodell nicht untersucht. Allerdings erkennt man in beiden experimentellen Gruppen nach 84 Tagen eine Veränderung an der Oberfläche des Zements. Hier sieht man eine Vergrößerung der Oberfläche und Spalten, die mehrere hundert Mikrometer in den Zement hineingehen. In diesen entstandenen Poren sieht man eine große Anzahl an zelligen Infiltraten, die möglicherweise an der Resorption des Zements beteiligt sind (Abb. 21). Die Degradation von Calciumphosphatzementen ist ein sehr langwieriger Prozess. In einer Untersuchung an der medialen Femurkondyle von ausgereiften Ziegen von Welch et al. sind nach zwei Jahren weniger als zwei Drittel eines Hydroxylapatits durch neu gebildeten Knochen ersetzt<sup>104</sup>. Dadurch, dass der verwendete Zement eine gute Stabilität zeigt, bleiben die eingebrachten Vliesfasern auch immer im Zement verhaftet und unterliegen dort einer geringeren Degradation. Das hat den Vorteil, dass die Verbindung zwischen dem Vlies und Zement länger bestehen bleibt, als die eigentliche Abbaugeschwindigkeit des Vlieses vermuten lässt.

Die kurze Verarbeitungszeit und die relativ zähe Konsistenz des verwendeten Zements, lassen bei der Herstellung der Implantate nur ein sehr kleines Zeitfenster vom Anmischen der Komponenten über das Einbringen in die Formen und das abschließende Einpressen des Vlieses zu. Man erkennt sehr häufig im lichtmikroskopischen Bild Bruchstücke des Zements in der Umgebung des Implantats. Das bedeutet, dass keine vollständige Verbindung des gesamten Materials zustande gekommen ist und sich während der Aushärtung Teile von dem Zementblock gelöst haben. Möglich ist auch eine nicht immer konstante Zusammensetzung aus den einzelnen Komponenten, da immer nur ein Teil des Packungsinhaltes der Fertizementmischung verwendet wurde. Hinzu kommt, dass die Herstellung der Implantate manuell erfolgte und somit nicht immer die gleichen Bedingungen, wie bei einer maschinellen Produktion, vorlagen. Ebenfalls waren im mikroskopischen Bild Lufteinschlüsse und eine bisweilen hohe Porosität erkennbar. Dieses Problem ist durch spezielle Mischsysteme umgehbar. Damit werden Instabilität und mögliche Brüche des Zements vermieden, die vor allem bei

Implantation in den Knochen und bei der Prothetik eine herausragende Rolle spielen<sup>88</sup>.

Der Unterschied zwischen den Implantaten mit Vlies und der Kontrollgruppe sind, im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Problemen, erheblich. Gerade der Herstellungsprozess und die daraus resultierenden Unterschiede der Implantate macht die Vergleichbarkeit sehr schwierig. Durch das manuelle Einpressen des elastischen Vlieses in den zähen Zement ergibt sich eine starke Krafteinwirkung auf das Vlies. Die Scherkräfte spielen eine untergeordnete Rolle, da der Druck mit Hilfe einer Unterlage senkrecht einwirkte. Nun ergeben sich daraus zwei Probleme, die im histologischen Bild wiederholt auftreten. Zum ersten verformt man bei diesem Prozess die zuvor glatte Oberfläche des Knochenzements. Zweitens lösen sich beim Einpressen Teile des noch weichen Zements und gelangen als freie Bruchstücke in den Raum zwischen den Vliesfasern (Abb. 30). Die freien Bruchstücke führen zu einer Veränderung, der ansonsten homogenen, Matrix bildenden Knorpelschicht. Im Gelenk würde das eine Einschränkung der biomechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes als Folge haben, da sich die Chondrozyten um ein solches Bruchstück anders ausrichten als in den Bereichen in denen sich keine Bruchstücke finden (Abb. 11). Außerdem fehlt an diesem Punkt extrazelluläre Matrix und die Elastizität geht damit verloren. Die Unregelmäßigkeit der Zementoberfläche hat zur Folge, dass nur in wenigen Fällen der Präparate mit Vlies ein durchgehendes Interface zwischen dem artifiziellen Knorpel und dem Knochenzement zu finden ist. Das bedeutet, dass in den Zonen, wo keine Zellen zu finden sind, nur wenig Kontakt der darüber liegenden Zellen zum Zement zu finden ist. Das beeinflusst wiederum Elastizität und Stabilität der Knorpelschicht. Durch die sehr unregelmäßige Oberfläche erfolgt auch eine unterschiedliche Ausrichtung der Chondrozyten. Gewünscht wäre eine senkrechte Anordnung der Knorpelzellen zur Oberfläche. Jedoch erkennt man häufig in den Präparaten viele ungeordnete Zellen, was zum einen an der ungeordneten Oberfläche, andererseits am fehlenden natürlichen Stimulus auf die Knorpelzellen liegt. Knorpel ist als Bestandteil der Stützgewebe von seiner mechanischen Beanspruchung abhängig. Dies kann man sich zu Nutze machen, wenn man bereits in vitro eine Anpassung des sich entwickelnden Knorpels

an seine Funktion durch mechanische Belastung erreicht<sup>94</sup>. Die für den Gelenkknorpel notwendige Anordnung und Ausrichtung der Kollagenfibrillen kann sich in diesem Modell somit nur punktuell entwickeln<sup>49,90</sup>.

In Abb. 35 erkennt man die für den hyalinen Knorpel wichtige Struktur, die die biomechanischen Voraussetzungen für die hohen Belastungen schafft. Die Anordnung der Fibrillen in der oberflächlichen Zone ist tangential zur Knochenoberfläche. Das ermöglicht maximalen Widerstand gegen Scherkräfte. In der darunter liegenden, mittleren Schicht, ist die extrazelluläre Matrix diagonal angeordnet und bewirkt damit einen Übergang zwischen den Scherkräften in der Oberfläche und den Kompressionskräften in der Knorpelschicht. Weiter darunter erfolgt der Übergang in eine vertikale Ausrichtung (tiefe, radiale Zone), wobei die Kollagenfasern in der so genannten Tidemark verankert sind. Daraus resultieren eine Kraftverteilung und ein Widerstand gegen Kompression. An der Unterseite dieser Schicht findet sich der Übergang von nicht-kalzifizierter in kalzifizierte extrazelluläre Matrix (verkalkter Knorpel), wobei die Tidemark die Grenze markiert. Diese Schicht enthält Kollagen Typ X<sup>54</sup>.

Die Stabilität des Zements ist trotz der vielen Bruchstücke gegeben. Zwar finden sich häufig Risse in dem Material. Diese sind aber meist schon während der Herstellung oder der Fixierung entstanden. Es gibt aber keine Risse, die zu einer Ablösung oder gar Zerstörung der Knorpelschicht führen. Die Gewebeantwort zeigt sich durch eine Umkapselung des Implantats mit Fibrozyten. Eine Immunantwort mit Infiltration von Zellen findet sich nur geringfügig, ebenso wenig Granulationsgewebe. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien<sup>57,70</sup>, allerdings gibt es auch subkutane Implantationen, bei denen sich Granulationsgewebe in der Umgebung von Knochenzementen zeigt<sup>69</sup>.

#### **4.4 Ausblick**

Viele Versuche zur Knorpeltransplantationen mit Hilfe des Tissue Engineerings erzielten viel versprechende Ergebnisse. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte

gezeigt werden, dass sich Knorpelgewebe in vivo gebildet hat. Die schon erwähnte autologe Chondrozytentransplantation (ACT) ist das derzeit am häufigsten genutzte Verfahren beim Menschen<sup>11</sup>. Es erzielt auch nur bei einer engen Indikationsstellung gute Resultate. Es ist ebenfalls das einzige derartige Verfahren, bei dem Verläufe über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnten. In einer Vergleichstudie von Horas et al.<sup>43</sup> zwischen ACT und der osteochondralen Zylindertransplantation (OCT)<sup>39</sup> ergab sich bei beiden Methoden ein gleich gutes klinisches Ergebnis. Die histomorphologische Auswertung der ACT zeigte aber eine Defektfüllung vornehmlich mit Faserknorpel. Im Verfahren nach der OCT waren histologisch keine erkennbaren Unterschiede sichtbar.

Das Problem der meisten Ansätze zur Knorpelregeneration durch eine extrakorporale Zellvermehrung ist eben nicht nur die Sicherstellung der Vitalität der Chondrozyten und eine maximale Synthese extrazellulärer Matrix. In Zukunft müssen Bemühungen dahingehend unternommen werden, auch die komplizierte räumliche Anordnung der Knorpelzellen und ihrer Matrix zu erreichen. Zudem gibt es Unterschiede in der Morphologie von in vitro gezüchtetem Knorpel und Regeneraten, die im Tier zum Einsatz kommen, im Gegensatz zur normalen Histologie im nativen Knorpel<sup>46</sup>. Ziel muss es sein, schon vor der Transplantation eine größtmögliche Annäherung zu erreichen. Insbesondere in punkto Belastbarkeit und Reproduzierbarkeit sind noch große Anstrengungen erforderlich. Der Vorteil, den das Tissue Engineering bieten kann, ist eine Anpassung der Form der Transplantate an anatomische Gegebenheiten. In dieser Beziehung unterliegt das sonst erfolgreiche Verfahren OCT einem großen Nachteil. Da nur kleine Läsionen mit einem Zylinder füllbar sind, bedarf es bei größeren Defekten mehrerer solcher Zylinder (Mosaikplastik), was zu einer Inkongruenz der umgebenden Gelenksoberfläche führt. Zudem treten dabei Instabilitäten auf, da die einzelnen Zylinder keinen durchgehenden Kontakt zueinander haben<sup>20</sup>.

In einem weiterführenden Modell ist die Heilung von tiefen osteochondralen Defekten mit Hilfe der Biphase zu eruieren. Unabhängig davon ist nach weiteren Möglichkeiten zu suchen, ein Regenerat zu entwickeln, das eine schnelle Einheilung im Gelenk

erzielt und die Architektur von hyalinem Knorpel wiederherstellt. Denkbar ist hier der Einsatz von Knochen- und Knorpelvorläuferzellen, die in einem Polymer neuen Knochen bzw. Knorpel bilden können<sup>2,73,76,86</sup>. So ist ein subperiostales Implantat aus einem Polymer in Kombination mit Wachstumsfaktoren und Fibrin in der Lage, mesenchymale Zellen zu rekrutieren und die Knorpel- bzw. Knochenbildung zu induzieren<sup>45</sup>. Wakitani et al.<sup>103</sup> erzielten mit Hilfe von mesenchymalen Zellen eine Defektheilung im Kaninchen mit hyalinartigem Knorpel.