

### **1 Einleitung & Fragestellung**

Die Entwicklung einer Methodik für die Züchtung von vitalen osteochondralen Implantaten zur Wiederherstellung der Gelenkfläche nach Knorpelläsionen setzt eine genaue Kenntnis der biomechanischen und histo-physiologischen Eigenschaften der beteiligten Gewebe voraus.

Hyaliner Gelenkknorpel ist nicht in der Lage sich selbst zu regenerieren. Dies gilt auch für kleinste Verletzungen. Das Gewebe besteht aus Chondrozyten, eingebettet in eine von ihnen produzierte extrazelluläre Matrix aus Proteoglykanen, Kollagenen und weiteren nicht kollagenen Proteinen. Aus der Anordnung der einzelnen Komponenten, die für den spezifischen Wassergehalt (60-80%) sorgen, ergeben sich die charakteristischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels [1]. Nach einer Verletzung dieses unvascularisierten Gewebes unterscheiden sich die Reparationsvorgänge deutlich von denen der vascularisierten Gewebe [2]. Im adulten Knorpelgewebe sind Proliferation, Migration und Umstellung des spezifischen Proteinsynthese-Musters ausdifferenzierter Chondrozyten limitiert. Die nach einer Verletzung von vascularisierten Geweben ablaufenden Phasen der Nekrose, Inflammation und Remodellierung bleiben aus. Da das Knorpelgewebe zum Teil natürliche Inhibitoren gegen Vaskularisierung, Makrophageninvasion als auch gegen die Blutgerinnung [2] aufweist, können Gefäßeinsprossung und Migration von phagozytierenden und pluripotenten Stammzellen, nicht stattfinden. Die Migration von Chondrozyten zum Ort der Verletzung ist durch die sie umgebende dichte Matrix aus Kollagen und Proteoglykanen stark limitiert. Eine Auffüllung eines Matrixdefektes kann also auch durch Umstellung der Proteinsynthese nicht stattfinden. Anders verhält es sich, wenn der subchondrale Knochen in Mitleidenschaft gezogen wurde. Es besteht nun Anschluss an das Gefäßsystem. Das gut vascularisierte Knochengewebe ermöglicht damit eine den vascularisierten Geweben ähnliche Defektheilung. Die Penetration der subchondralen Platte ist also für die Reparationsvorgänge von entscheidender Bedeutung [3]. Des Weiteren haben Faktoren wie Alter, Gewicht, vorbestehende System- und Gelenkerkrankungen, körperliche Belastung und Begleitverletzungen einen entscheidenden Einfluss auf das Heilungsergebnis [2,4].

Verschiedene Therapieansätze werden bei der Behandlung von Knorpeldefekten verfolgt: Durch Umstellungsosteotomien wird die Belastungszone aus dem Bereich des defekten in einen gesunden Bereich der Gelenkfläche verlagert. Eine Besserung der Symptomatik kann bis zu 10 Jahre und mehr andauern und so die Versorgung mit einer Gelenkprothese entsprechend hinauszögern [5,6]. Aufgefaserte Gelenkflächen, deren Abriebprodukte und freie Gelenkkörper, die zu Synovitis und Funktionseinschränkungen führen, können durch ein meist arthroskopisch durchgeführtes Débridement und eine Gelenktoilette (Gelenkspülung) mechanische und inflammatorische Symptome lindern [5,7,8]. Ist der subchondrale Knochen nicht in Mitleidenschaft gezogen, kann durch Eröffnung der subchondralen Platte (Pridie-Bohrung [9], Mikrofrakturierung [3,10]) eine Gefäßeinsprossung erfolgen und so ein den vaskularisierten Geweben ähnlicher Reparationsvorgang ablaufen. Das sich ausbildende Reparationsgewebe besitzt allerdings eine biomechanisch deutlich geringere Qualität im Vergleich zu nativem hyalinen Knorpel [11].

Eine weitere Therapiemöglichkeit besteht in der Rekonstruktion durch Trans- bzw. Implantation. Bei der Transplantation kann sowohl auf autogenes als auch auf allogenes Gewebe zurückgegriffen werden. Es werden sowohl vollständige Gewebe als auch isolierte, z. T. *in vitro* vervielfältigte Zellen verwendet. Neben chondrogenem Gewebe kommt Perichondrium [12-14], Periost [12,15] und Synovialis [16] zum Einsatz. Werden isolierte Chondrozyten verwendet, müssen die Zellen im zu behandelnden Defekt fixiert werden. Dies kann durch das Herstellen einer Barriere zum Gelenk hin, z.B. durch das Übernähen des Defektes mit autogenem Periost geschehen [17]. Die Defektheilung nach Chondrozytentransplantation von osteochondralen Defekten kann in eine Phase der Proliferation (Vervielfältigung der Zellen), der Reifung (Differenzierung der Zellen und Matrixproduktion) und der Transformation (Neuausbildung der subchondralen Platte) eingeteilt werden [18].

Da die Menge von autogenem Knorpelgewebe zur direkten Transplantation respektive zur Isolation von Chondrozyten begrenzt ist, müssen die Zellen bei größeren Defekten vervielfältigt werden. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen dar, die im Verlauf entsprechend zu chondrozytären Zellen ausdifferenzieren können. Solche osteochondralen Vorläuferzellen können z.B. aus Periost und Knochenmark, aber auch aus anderen Gewe-

ben gewonnen und wie Chondrozyten nach der Isolation mit Hilfe der Zellkultur vervielfältigt werden, um eine ausreichende Zahl autogener Zellen zur Verfügung zu stellen [19-21]. Die Mikroumgebung der Zellen hat dabei entscheidenden Einfluss auf die Ausdifferenzierung mit entsprechender Anpassung der Syntheseleistung und des Phänotyps [18,22].

Wird allogenes Material eingesetzt, unterliegt das Heilungsergebnis der Immunantwort des Empfängers. Während die Knorpelmatrix nur eine geringe Immunogenität zu besitzen scheint und durch sie die Oberflächenantigene der Chondrozyten abgeschirmt werden [23], kommt es bei allogener Transplantation von osteochondralen Geweben durch die in der Knochenphase vorhandenen und durch das Gefäßsystem leicht zugänglichen immunogenen Zellen in der Regel zu einer ausgeprägten Immunreaktion [24-26]. Werden isolierte Zellen in eine künstliche, nicht immunogene Matrix eingebettet, so kann eine Immunreaktion auf ein Minimum reduziert werden [18,27,28].

Zunehmend werden degradable Biomaterialien, zum Teil mit chondrozytären Zellen bestückt, eingesetzt. *Prä implantationem* kann eine Kultivierung *in vitro* (*Tissue Engineering*) zur Gewebedifferenzierung erfolgen [29]. Die Zellen können so in einer dreidimensionalen Orientierung eine gewebetypische Matrix ausbilden, während die Matrix des Biomaterials zunehmend degradiert [30]. Die Materialien sollten den biomechanischen Anforderungen des Zielgewebes gerecht werden und gleichzeitig das heranwachsende, noch vulnerable Transplantatgewebe schützen [28]. Es sollten keine toxischen Abbauprodukte entstehen, ein stabiles Interface zum umgebenden Gewebe sollte während der gesamten Degradation gewährleistet sein.

Einsetzbare Biomaterialien lassen sich in organische [31-34] und anorganische [35,36] als auch in biologische und synthetische Materialien unterteilen. Zur Knochenregeneration wird unter anderem demineralisierte Knochenmatrix eingesetzt. Auch wenn eine Osteoinduktivität besteht [37], so ist neben einer potentiellen Immunogenität die strukturelle Druckfestigkeit für den Einsatz im Gelenkbereich zu gering [38]. Ähnlich verhält es sich mit Kollagenpräparationen [31]. Die vielfach untersuchten Hydroxylapatiten gehören zu den Kalziumphosphaten (45% der Knochenmasse) [39,40] und besitzen eine hohe Biokompatibilität. Sie sind durch unter-

schiedliche Degradationsgeschwindigkeiten gekennzeichnet und rufen eine Knochenbindung über eine afibrilläre Zementlinie hervor. Im Vergleich degradieren Kalziumkarbonate in der Kristallform Aragonit bzw. Kalzit deutlich schneller [41], während eine direkte Knochenbindung stattfindet [42,43]. Neben den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Trikalziumphosphaten, die deutlich schneller degradieren (Tabelle 12) als die Hydroxylapatiten und klinisch bereits erfolgreich eingesetzt werden [44,45], nehmen die Kalziumphosphatzemente wegen ihrer abbindenden Eigenschaften, ähnlich wie die Kalziumsulfate, eine Sonderstellung ein. Biogläser bzw. Glaskeramiken stellen wegen der biologisch aktiven Oberfläche, die zu einer Stimulierung des Knochenwachstums und zu einer lastenübertragenden Knochenbindung führt, eine weitere Gruppe von Biomaterialien dar, die im Knochengewebe Einsatz finden [46].

Bei der Wiederherstellung des Gelenkknorpels werden in erster Linie Biomaterialien verwendet, die eine dreidimensionale Orientierung von eingebrachten bzw. einwandernden chondrogenen Zellen zulassen. In erster Linie kommen Gele und poröse Materialien zum Einsatz, die zum Zeitpunkt der Implantation einzeln aber auch in Kombination und zusätzlich mit Zellen bestückt werden können. Da Matrices aus organischen Bestandteilen, wie z.B. aus Kollagenen potentiell immunogen [47,48] sind, werden zunehmend synthetisch hergestellte Polymere eingesetzt. Sie können, je nach Herstellungstechnik frei modellierbar als Vliese [49], als Festkörper [50] aber auch als Gele den anatomischen Gegebenheiten im Gelenkbereich angepasst werden. Die anatomische Rekonstruktion stellt einen entscheidenden Faktor für die Langzeitergebnisse dar. Degenerativen Veränderungen durch Inkongruenz der Gelenkflächen kann so entgegengewirkt werden. Wird eine Besiedlung mit chondrogenen Zellen vor der Implantation durchgeführt, so erlauben organische als auch synthetische Gele eine gleichmäßige Verteilung der Zellen und, wenn immunologisch inert, eine Abschirmung zum Immunsystem des Empfängers. Des Weiteren können sie für eine initiale Fixierung im Defekt sorgen [18]. Zu den untersuchten Gelen gehören Alginate [51], Fibrin [52-55], Hyaluronsäuren [56] und Agarose [57,58].

Ziel dieser Untersuchung ist es, eine Methodik zur Herstellung von biodegradablen Implantaten zu entwickeln, mit denen osteochondrale Defekte behandelt werden können. Das zu entwickelnde Implantat sollte über die Zeit vollständig durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden, um der begrenzten Lebensdauer (Implantatlocke-

rung, Verschleiss des Materials, Entstehung von Abriebprodukten) von bisher klinisch zum Einsatz kommenden prothetischen Materialien [59] entgegenzuwirken. Da das osteochondrale Gewebe mehrschichtig ist, und die einzelnen Schichten unterschiedliche biomechanische und physiologische Eigenschaften (Elastizitätsmodul, Komprimierbarkeit, Nährstoffversorgung der beteiligten Zellen etc.) besitzen, werden diese Ansprüche gleichermaßen an die zu verwendenden degradablen Biomaterialien gestellt. Neben der stabilen Integration in das Zielgewebe ist das Zusammenspiel der eingesetzten Materialien im so genannten Interface (zwischen ihnen) [60] ein wichtiger Aspekt für den späteren Verbleib des Implantates im Implantatbett und im Verlauf möglichst seinen Ersatz durch körpereigenes ortstypisches Gewebe.

Für die Herstellung der degradablen Implantate wurden für die Knochenphase fünf verschiedene Materialien, die bereits als Knochenersatz eingesetzt wurden, mit der etablierten Methode der Knorpelgewebezüchtung in Polymervlies / Gel-Konstrukten mit isolierten und vervielfältigten Chondrozyten [49] verbunden, und als vitale Komposite [61] bis zu 84 Tage (d) unter Perfusionskultur gezüchtet.

Eine Bewertung der Isolation und Vervielfältigung der Zellen (Ausbeute), als auch des Handlings bei der Herstellung der Implantate wurde vorgenommen. Nach der Perfusionskultur (7-84 d) erfolgte eine makro-, mikroskopische, raster- und transmissionselektronenmikroskopische Evaluation. Die unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Materialien, insbesondere des Interfaces zwischen ihnen, wurden untersucht, um eine Aussage über den möglichen Einsatz dieser vitalen Komposite in der Therapie von Knorpel-Knochendefekten zu treffen.