
4 Diskussion

4.1 Gelenkdestruktion

Gelenkknorpel toleriert eine enorme Menge an physischem, sich wiederholendem Stress. Allerdings ist Gelenkknorpel nicht in der Lage, sich selbst zu regenerieren. Dies gilt auch für kleinste Verletzungen. Die Kenntnis über den strukturellen Aufbau des Knorpelgewebes ist für das Verständnis seiner komplexen Eigenschaften unbedingt erforderlich: Gelenkknorpel besteht aus Chondrozyten, eingebettet in eine von ihnen produzierte extrazelluläre Matrix aus Proteoglykanen, Kollagenen und weiteren nichtkollagenen Proteinen [1]. Aus der entsprechenden Anordnung der einzelnen Komponenten ergeben sich die charakteristischen Eigenschaften dieses Gewebes. Die einzelnen Bestandteile der extrazellulären Matrix sorgen für den spezifischen Wassergehalt (60-80 %) [1], der für die biomechanischen Eigenschaften des Gewebes von Bedeutung ist. Abhängig vom Abstand zur Knorpeloberfläche geht die dreidimensionale Struktur und Anordnung von Matrixbestandteilen mit der sich verändernden Zellverteilung und -morphologie einher. Bei den kollagenen Anteilen in der radiären, tiefen Knorpelschicht handelt es sich um flüssigkeitsgefüllte tubuläre Strukturen. Sie kommunizieren mit den Lumina der schwammartigen tangentialen Zone der Knorpeloberfläche [70].

Die Reaktion auf eine Verletzungen dieses avaskulären Gewebes unterscheidet sich von der des vaskulären [2] und verläuft nicht in den typischen drei Phasen: Nekrose, Inflammation und Remodellierung. Im adulten Knorpelgewebe sind Proliferation, Migration und Umstellung des spezifischen Proteinsynthese-Musters ausdifferenzierter Chondrozyten limitiert. Dies kann auf die sie umgebende dichte Matrix zurückgeführt werden. Natürliche Inhibitoren gegen Vaskularisierung, Makrophageninvasion als auch gegen die Blutgerinnung [2] verhindern das Einwandern von phagozytierenden und pluripotenten Stammzellen. Am Rand der Knorpelläsion entsteht eine Nekrose mit avitalen Zellen bzw. deren Überresten in den anliegenden Chondrozytenlakunen. Während einer kurzen Übergangsphase kann eine mitotische Aktivität und eine verstärkte Matrixsynthese der in der Nähe liegenden Chondrozyten nachgewiesen werden. Diese Aktivität kommt allerdings schnell zum Erliegen. Eine vollständige Heilung findet nicht statt [2,4,71-74]. Die meisten dieser Läsionen blei-

ben in ihrer Ausdehnung konstant [2,75,76], so dass nur selten eine Progredienz zum Vollbild der Arthrose beobachtet wird.

Ist der subchondrale Knochen bei entsprechendem Verletzungsmuster mitbetroffen, so kommt der Defekt in den Einflussbereich der Reparationsvorgänge des Gefäßsystems [2,3,75,77]. Er wird zunächst mit einem Fibrinkoagel gefüllt, in dem Blut- und undifferenzierte mesenchymale Knochenmarkszellen eingebettet liegen. Während in den tieferen Schichten eine Rekonstruktion der subchondralen Platte stattfindet, metaplastisiert das Gewebe im Knorpelniveau zu einem Gewebe hyalinartigen, chondroiden Charakters [78]. Die initiale Synthese von Kollagen Typ II durch rundliche chondrozytäre Zellen wird zunehmend auf Kollagen Typ I umgestellt, der Proteoglykangehalt nimmt deutlich ab. Die für hyalinen Knorpel typische Zusammensetzung und Anordnung der einzelnen Bestandteile bleibt aus, so dass ein biomechanisch minderwertigeres Gewebe entsteht [77,79]. Kollagenfibrillen des Reparaturgewebes werden nicht bzw. nur ungenügend in das sie umgebende native Knorpelgewebe integriert *et vice versa*. Zum Teil findet sich eine komplette Spaltbildung in diesem Bereich [19,78,80]. Im Verlauf kommt es an dieser Grenze zu einer vertikalen Stressbelastung und Mikrobewegungen. Degenerative Veränderungen des Gewebes sind bereits nach 10 Wochen zu beobachten. Nach sechs bis zwölf Monaten handelt es sich bei dem Reparaturgewebe der Zusammensetzung nach am ehesten um Faserknorpel. Es kommt zur Auffaserung der Oberfläche und dem Auftreten von azellulären Bereichen des Gewebes [2,78,79]. Der weitere Verlauf der Läsion scheint von mehreren verschiedenen Faktoren abhängig zu sein: Zum einen scheint eine direkte Abhängigkeit zu Fläche und Tiefe des Defektes zu bestehen. Zum anderen spielen Faktoren wie Alter, Gewicht, körperliche Belastung des Individuums, Begleitverletzungen der Menisken und des Bandapparates, aber auch zeitgleich bestehende System- und Gelenkerkrankungen für die Heilungsergebnisse eine Rolle [2,4,74,81].

Die Osteochondrosis dissecans stellt eine Sonderform der osteochondralen Läsionen dar. Es handelt sich dabei um einen subchondralen Defekt der Apo- bzw. Epiphyse, der in der wiederholten Überbelastung mit resultierender Durchblutungsstörung seine Ätiologie findet. Bei fortgeschrittener Erkrankung können sich die Dissekte voll-

ständig aus dem knöchernen Verbund herauslösen und als Gelenkmaus im Gelenk imponieren. Der Defekt wird dann auch als „Mausbett“ bezeichnet [82,83].

Die zunehmende Zerstörung und Remodellierung der gesamten knorpeligen Gelenkfläche und des subchondralen Knochens zum Teil mit Geröllzysten- und Osteophytenbildung wird als Osteoarthrose bezeichnet. Neben den Veränderungen im synovialen Gelenk muss für eine Diagnose allerdings zusätzlich eine Symptomatik vorliegen. Sie kann Gelenkschmerz, Bewegungseinschränkungen, Krepitus bei der Bewegung, Gelenkergüsse und Deformation des Gelenkes beinhalten [73].

4.2 Therapieansätze

Die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten in der Behandlung von Knorpeldefekten können in 3 Kategorien eingeteilt werden.

1. Verbesserung der Gelenkfunktion mit Hilfe des vorhandenen Gewebes
2. lokale Induktion von Knorpelneubildung
3. Transplantation / Implantation

Degenerativ oder traumatisch entstandene Abriebprodukte als auch dislozierte und aufgefaserte Knorpel- und Meniskusanteile beeinträchtigen die Gelenkfunktion und können zur Synovitis mit Gelenkerguss führen [84]. Ein Débridement und das Glätten dieser Strukturen lindert diese mechanischen und inflammatorischen Symptome [5,7,8,85]. Eine Umstellungsosteotomie führt zu einer Verlagerung der Belastungszone aus dem Bereich des defekten in einen gesunden Bereich des Gelenkknorpels. Es kommt zu einer Besserung der Symptomatik [5,6,86] und einer nachweisbaren Erholung des vorgeschädigten Knorpelbereiches [73,87].

Durch Eröffnung der subchondralen Platte können die vaskulär vermittelten klassischen Reparationsvorgänge ablaufen. Das Einbringen von mehreren Bohrlöchern [9,88], die Mikrofrakturierung [3,10], die Spongialisierung [89] und die Abrasionsarthroplastik [8,85,89] können meist arthroskopisch durchgeführt werden [90]. Zunächst bildet sich ein hyalinartiges Gewebe aus, das aber zunehmend fibrosiert und sich folglich biomechanisch zunehmend verschlechtert [11,90].

Die Möglichkeiten der Trans- bzw. Implantation werden im Folgenden gesondert besprochen.

4.2.1 Rekonstruktion durch Transplantation/Implantation

Bei Wiederherstellung der artikulierenden Gelenkflächen durch Transplantate bzw. Implantate werden verschiedene Vorgehensweisen verfolgt. Es können chondrale bzw. osteochondrale native Gewebe, als auch isolierte Zellen, sowohl autogener als auch allogener Herkunft verwendet werden. Die Zell- bzw. Gewebegewinnung für das Transplantat muss nicht notwendiger Weise aus dem Zielgewebe erfolgen: Neben periostalem, perichondralem und synovialem Gewebe finden zunehmend Stammzellen Verwendung. Diese können embryonaler Herkunft sein oder aus dem Knochenmark gewonnen werden. Isolierte Zellen können entweder direkt oder nach erfolgter Kultivierung transplantiert werden. Es besteht die Möglichkeit sie in Monolayerkultur zu vervielfältigen. Eine dreidimensionale Zellkultur zur Herstellung vitaler transplantierbarer Gewebe kann in z. T. biodegradablen Matrices im Rahmen des Tissue-Engineerings erfolgen.

4.2.1.1 Allogene / Autogene Transplantation

Immunologische, anatomische, physiologische, biomechanische und infektiologische Aspekte spielen bei der Transplantation von chondralen bzw. osteochondralen Geweben respektive von isolierten Chondrozyten eine Rolle. Da es sich bei Knorpel um ein avaskuläres Gewebe handelt, gibt es kaum Angriffspunkte für das Immunsystem, solange intaktes allogenes Knorpelgewebe ohne den subchondralen Anteil transplantiert wird. Werden hingegen isolierte allogene Chondrozyten für die Transplantation verwendet, so kommen diese mit dem Immunsystem des Empfängers in Kontakt. Die transplantierten Zellen tragen Oberflächenantigene, eine Immunantwort im Sinne einer T-Zellaktivierung wird hervorgerufen [91]. Die Makromoleküle der chondrogenen Matrix besitzen demnach nur eine geringe Immunogenität. Diese Matrix scheint die Oberflächenantigene der im Gewebe befindlichen Zellen abzuschirmen, so dass die Immunantwort auf ein Minimum reduziert wird, bzw. vollständig ausbleibt [23,24]. Das Abschirmen der Zellen vor dem Immunsystem des Empfängers durch Einbettung in eine künstliche Matrix [18,27,28] scheint den selben Effekt hervorzurufen. Wird frisches allogenes osteochondrales Gewebe transplantiert, so kommt es im Verlauf, wegen der im subchondralen Knochen vorhandenen immunogenen Zellen, zu einer Lymphozyteninfiltration und damit zu einer immunologischen Abstoßung [25,26]. Eine gesteigerte Resorption des subchondralen Knochens bzw. eine verzögerte Neubildung durch immunologische Vorgänge kann zum

Kollabieren und damit zur vollständigen Insuffizienz des Transplantates führen [24]. Diese könnte eine entscheidende Rolle bei der Zeitpunktbestimmung der Wiederaufnahme der Belastung in der späteren klinischen Anwendung spielen. Das Tieffrieren von allogenen osteochondralen Transplantaten kann eine spätere Abstoßungsreaktion unterdrücken [92], führt aber zu einer deutlichen Reduktion vitaler Zellen [93], die für das Langzeitüberleben des Transplantates erforderlich sind. Der DNS Gehalt allogener Transplantate, der sich proportional zur Qualität der Gewebeerscheinung verhält, nimmt nach erfolgter Transplantation fortlaufend ab [94]. Bei autogener Transplantation werden höhere Zahlen vitaler Zellen und geringere degenerative Matrixveränderungen beobachtet [95,96]. Die Verwendung von autogenen osteochondralen Transplantaten gewährleistet nicht notwendigerweise das nahtlose Einheilen des Gewebes. Bei Inkongruenz, z.B. bei einem zu tief sitzenden Transplantat, kann es, neben der Ausbildung einer deutlichen Demarkationslinie aus Faserknorpel mit geringerem Proteoglykangehalt am Übergang zwischen Transplantat und umgebendem Gewebe, zum vollständigen bindegewebigen Umbau des Transplantates kommen [97].

Für die dreidimensionale anatomische Rekonstruktion von osteochondralen Defekten unter Verwendung von allogenen Gewebe, ist die orthotope (gleichartige) Entnahmemöglichkeit am Spender von entscheidendem Vorteil: Sind Entnahme- und Empfängerort anatomisch optimal aufeinander abgestimmt, so können im Verlauf entstehende degenerative Veränderungen, die durch Inkongruenz der Gelenkflächen hervorgerufen werden können, auf ein Minimum reduziert werden. Wird autogenes Gewebe verwendet, wird dieses meist aus nicht lasttragenden Gelenkarealen gewonnen [85,98]. Eine Gelenkkongruenz kann hier nur annähernd hergestellt werden, während der Entnahmeort ebenfalls durch Inkongruenz zu einer erhöhten Morbidität im Sinne von degenerativen Veränderungen des Gelenkes führen kann. Zum Teil kann diese Problematik mit Hilfe der Mosaikarthroplastik (Entnahme mehrerer kleiner Zylinder, dadurch feinere Abstimmung bei der Rekonstruktion der späteren Gelenkfläche) verringert werden [98]. In diesem Zusammenhang führen defekte bzw. vollständig fehlende Menisci (traumatische, degenerative bzw. iatrogene Genese) ebenfalls zu einer Verschlechterung des Endergebnisses [99]. Erhöhter Abrieb kann zur Synovitis führen, ein Gelenkerguss die Folge sein [84]. Die zeitgleiche Wie-

derherstellung der physiologischen Achsen- und Gelenksstellung im Sinne von Umstellungsosteotomien führt zu deutlich besseren Ergebnissen [100].

Während das Spendergewebe bzw. daraus isolierte Zellen bei der autogenen Transplantation ein festgesetztes Alter haben [101], kann bei der allogenen Transplantation auf jüngeres Gewebe zurückgegriffen werden: Je geringer das Alter des Spenders ist, desto ausgeprägter ist die Fähigkeit der Zellen, Reparaturvorgänge im Bereich des Knorpelgewebes vorzunehmen.

Nicht zuletzt besteht bei der Transplantation von allogem Gewebe grundsätzlich die Gefahr einer Transfektion (HIV, Hepatitis-Viren, Prionen etc.) [102]. Mittlerweile können bestehende Gewebetechniken das Risiko einer Transfektion äußerst gering halten, die Transfektionsgefahr ist allerdings mit den aktuell bestehenden Techniken nicht vollständig eliminierbar [103].

4.2.1.2 Perichondrium - Periost - Synovis

Um auf der Suche nach Zellen bzw. Geweben für die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten nicht auf den eigentlichen Gelenkknorpel zurückgreifen zu müssen, kann auf die chondrogenen Eigenschaften von perichondralen Zellen zurückgegriffen werden [12,13]. Der neu gebildete Knorpel ist in seinen Eigenschaften ungleichmäßig. Das Einsprossen von Kapillaren kann vor allem in bindegewebigen Abschnitten gefunden werden, so dass die Neovaskularisation einer Bildung von hyalinem Knorpel entgegenwirkt [14].

In klinischen Untersuchungen am Knie wurden Knorpelläsionen zunächst bis auf den Knochen débridiert [104]. Autogenes Perichondrium von den Costae wurde mit der chondralen Seite zum Gelenk hin auf den subchondralen Knochen bzw. auf die intakte subchondrale Platte mit kleinen punktförmigen Blutungen mit Hilfe von humanem Fibrinkleber befestigt. In den arthroskopischen Verlaufskontrollen drei und zwölf Monate nach Transplantation erschienen 27 von 30 der ehemaligen Defekte komplett mit knorpelähnlichem Gewebe gefüllt. In den Biopsien konnten allerdings keine Chondrozytennester nachgewiesen werden. In den Röntgennachkontrollen wurden Mineralisierungen des Reparationsgewebes nachgewiesen [104]. Abgesehen von der Gefahr eines Transplantatverlustes konnten nach Behandlung am Kniegelenk in

der 10-Jahres-Verlaufskontrolle klinisch keine Unterschiede im Vergleich zu Patienten gefunden werden, die mit Hilfe der Mikrofrakturierung behandelt wurden [13].

Auch die xenogene Transplantation (Kaninchen → Schaf) liefert in experimentellen Untersuchungen gute Ergebnisse im Sinne von histologisch nachweisbarem Gelenkknorpel mit einem Kollagen-II-Gehalt von 74% [105]. Quantitativ ist Periost im ausgewachsenen Individuum dem Perichondrium deutlich überlegen. Die neo-chondrogenen Eigenschaften des Periosts im Rahmen der Kallusbildung während der Frakturheilung wurden bereits 1930 beschrieben [106]. Nach Transplantation von autogenem Periost in osteochondrale Defekte und biomechanischer Stimulation durch passives Bewegen in den ersten 4 Wochen nach Transplantation kann im Kaninchenmodell in der 1-Jahres-Verlaufskontrolle eine fortbestehende regenerierte Gelenkknorpeloberfläche beobachtet werden [15,107]. Im Vergleich zu dem angrenzenden nativen Knorpel konnten allerdings neben Unterschieden der Anordnung und Verteilung von Kollagenfasern Typ II auch ein Zelluntergang von chondrozytären Zellen im Sinne von leeren Lakunen und so genannten Ghost-Zellen (Zellen ohne Zellinhalt) im Transplantat beobachtet werden [108]. In einer klinischen Studie konnte bei Knorpeldefekten der Patella und erfolgter Transplantation von autogenem Periost klinisch (MRT), und mit Hilfe von Biopsien histologisch, hyalinartiges Knorpelgewebe nachgewiesen werden [109]. Auch bei allogener Transplantation von Periost werden bessere Ergebnisse, im Sinne von nachweisbar höheren Kollagen Typ II Synthesen erzielt, je geringer das Spenderalter ist [110]. Ein entscheidender Faktor für die Qualität des Reparationsgewebes scheint die richtige biomechanische Stimulation zu sein: Passive im Gegensatz zu aktiver Bewegung *post operationem* führt zu deutlich besseren klinischen Ergebnissen [111]. Bei der Verwendung von Perichondrium bzw. Periost zur Behandlung von Knorpelläsionen scheint die Ausrichtung des Transplantates (Kambiumschicht zum Knochen, bzw. zur Gelenkseite hin) keinen Einfluss auf die Qualität des Reparationsgewebes zu haben [112]. Kommen synoviale Gewebe zum Einsatz so ist das Proliferationspotential der Zellen abhängig vom Entnahmeort im Gelenk, und weist deutliche Unterschiede auf [16].

4.2.1.3 Chondrozytentransplantation

Die Verwendung von isolierten Chondrozyten zur Behandlung von Knorpeldefekten erfordert eine Fixation der Zellen im entsprechenden Defekt. Dies kann durch ent-

sprechende Trägermaterialien bzw. durch das Herstellen einer Barriere zum Gelenk hin geschehen [17,80]. Eine Barrieremöglichkeit stellt das Übernähen des Defektes mit autogenem Periost dar. In Knorpeldefekten ohne Penetration der subchondralen Platte führt der Einsatz von isolierten Chondrozyten unter einem Periostlappen bzw. in einem Trägermaterial zu einer signifikanten Zunahme des Reparaturgewebes und einer besseren histologischen Morphologie im Vergleich zu unbehandelten Defekten [80].

Bei osteochondralen Defekten kann die Defektheilung nach Chondrozytentransplantation in folgende drei Phasen eingeteilt werden [18]: Nach der Transplantation von isolierten Chondrozyten in einen Knorpeldefekt kommt es zunächst zu einer Phase der *Proliferation*. Diese Phase hält bei embryonalen Hühnerchondrozyten über ca. 4 Wochen an und ist durch eine ausgeprägte Zellvermehrung und eine geringe Zunahme der extrazellulären Glykosaminoglykane charakterisiert. In der darauf folgenden *Reifungsphase* von der 4. bis zur 8. Woche kommt es zur Ausbildung von knorpelartigem Gewebe. Die Differenzierung der Zellen im Sinne von massiver Produktion extrazellulärer Matrix findet jetzt vermutlich in Abhängigkeit von der Lokalisation im Defekt, dem lokalen nutritiven Angebot und der mechanischen Stimulation statt. Die Proliferation der Zellen nimmt mit Zunahme der Matrixproduktion deutlich ab. Die ab der 9. Woche beginnende *Transformationsphase* hält bis zur 24. Woche an. Sie ist durch eine vom subchondralen Knochen ausgehende vaskuläre Penetration des Reparaturgewebes gekennzeichnet. Es kommt zu degenerativen Veränderungen der Chondrozyten in diesem Bereich, die durch primäre Osteone ersetzt werden. Eine Neuausbildung der subchondralen Platte ist das Resultat [18].

4.2.1.4 Mesenchymale Stammzellen

Während der Ontogenese differenzieren die Zellen und passen sich vom Phänotyp und ihrer Proteinsynthese zunehmend ihrer Mikroumgebung an. Diese Differenzierung scheint nicht oder nur in begrenztem Masse umkehrbar zu sein, so dass die Zellen ihre Fähigkeit verlieren, sich auf veränderte Umgebungseinflüsse einzustellen. Die Zellen eines ausgewachsenen Individuums sind dann in ihrer Funktion der Proteinsynthese und Morphologie optimal in ihr Gewebe eingebettet, können sich aber nicht mehr auf eine Umgebungsänderung einstellen. Ein differenzierter Chondrozyt im Gelenkknorpel übernimmt dabei vollständig andere Funktionen als ein Chondrozyt

in einem Discus intervertebralis. Aber auch innerhalb eines Gewebes finden sich unterschiedlich differenzierte Zellen mit entsprechend unterschiedlichem genetischen Potential. So produzieren Chondrozyten in den oberflächlichen Schichten des Gelenkknorpels eine andere Matrix als z.B. Zellen im Bereich der Knorpel-Knochen-Grenze [113,114]. Es findet grundsätzlich eine Anpassung von isolierten Zellen an die entsprechende Mikroumgebung statt [18,22]. Die Mikroumgebung hat dabei einen direkten, bei bereits ausdifferenzierten Zellen aber einen begrenzten Einfluss auf die entsprechende Anpassung der Syntheseleistung und des Phänotyps der Zellen. Demnach sollte die Verwendung von undifferenzierten Stammzellen, mit entsprechend höherem Potential zur Anpassung an die jeweilige Mikroumgebung, zu einem dem nativen Gewebe ähnlicheren Reparationsgewebe führen. Allerdings stellt die Bereitstellung einer genügenden Anzahl von pluripotenten Stammzellen mit dem fortschreitenden Alter ein Problem dar, da deren Zahl im Alter signifikant abnimmt [20]. Osteochondrale Vorläuferzellen können z.B. aus Periost und Knochenmark gewonnen und nach der Isolation mit Hilfe der Zellkultur vervielfältigt werden. So kann eine Bereitstellung einer entsprechenden Anzahl von autogenen mesenchymalen Stammzellen erfolgen [19-21]. Diese Zellen haben ein weiteres Spektrum möglicher chondrogener Genexpression, so dass sie nach Transplantation in einen Knorpeldefekt besser in der Lage sein sollten, die typisch chondrogene Mikroarchitektur nachzubilden [21,27]. Neben Subpopulationen von aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen können Stammzellen mit chondrogenen Eigenschaften auch aus anderen Geweben gewonnen werden [115]. Ob es bei einem Erhalt der phänotypischen gelenkknorpeltypischen Ausdifferenzierung von Chondrozyten bleibt, oder ob es zu Hypertrophien kommt, scheint eng an vorhandene Mediatoren geknüpft zu sein, die sich in der Mikroumgebung der Zelle befinden [116]. Bei der Wiederherstellung der knorpeligen Gelenkfläche von osteochondralen Defekten können bereits 6 Monate nach Transplantation mesenchymaler Stammzellen am Knorpel-Knochen-Übergang annähernd identische biomechanische Eigenschaften (Nachgiebigkeit und Steifigkeit, gemessen mit poröser Stempelvorrichtung) beobachtet werden wie bei nativem Gewebe. Histologisch findet sich hyalinartiges Knorpelgewebe fest verbunden mit der neu gebildeten subchondralen Platte [19].

4.2.2 Biomaterialien - Biologische und synthetische Matrices

Bei der Rekonstruktion von Knorpel und Knochendefekten soll es durch Einsatz von biologischen und synthetischen Matrices zu einer Wiederherstellung von physiologischen und biomechanischen Eigenschaften des defekten Gewebes kommen. Nach Möglichkeit sollten die Matrices degradieren und durch Knochen- bzw. Knorpelgewebe vollständig ersetzt werden.

Folgende Voraussetzungen sind für den klinischen Einsatz von biodegradablen bzw. bioresorbierbaren Matrices erforderlich:

1. Das Material sollte bei Implantation den biomechanischen Anforderungen an das Gewebe entsprechen.
2. Die bei der Degradation entstehenden Abbauprodukte dürfen keine Toxizität besitzen.
3. Die Degradationsgeschwindigkeit der Materialien muss an das Nachwachsen des jeweiligen Gewebes angepasst sein.
4. Während der Degradation sollte ein stabiles Interface zwischen Biomaterial und entsprechendem Gewebe physiologischen biomechanischen Belastungen standhalten, damit es nicht zur Implantatlockerung bzw. -insuffizienz kommt.

Unterschiedliche Techniken werden beim Einsatz solcher Materialien verfolgt: Bei der direkten Implantation soll es zu einer fortschreitenden Besiedlung durch lokale Zellen des umgebenden Gewebes kommen, die während der Degradation Matrix produzieren und so das Biomaterial allmählich ersetzen. Es können auch aktiv-resorptive Vorgänge stattfinden (z.B. Osteoklasten). Das Implantat kann zusätzlich direkt vor der Implantation mit zuvor isolierten osteogenen bzw. chondrogenen Zellen beimpft werden, um die Remodellierung zu beeinflussen. Die eigentliche Gewebedifferenzierung findet also *in vivo* statt. Beim Tissue-Engineering hingegen soll die Verwendung von Matrices den zuvor isolierten und zu transplantierenden Zellen temporär eine gewebeähnliche dreidimensionale Orientierung ermöglichen. Die Zellen bilden bereits *in vitro*, also vor der Transplantation, gewebetypische Matrix, während die entsprechende Matrix des Biomaterials zunehmend degradiert bzw. resorbiert werden kann [30,117]. Nach der Implantation können die biomechanischen Eigenschaften des Materials neben der Platzhalterfunktion dazu beitragen, das sich bildende noch vulnerable Transplantatgewebe vor übermäßigen Belastungen zu

schützen um damit ein qualitativ besseres Reparatursgewebe zu erreichen [28]. Einsetzbare Biomaterialien lassen sich analog zum Aufbau der osteochondralen ECM in organische und anorganische Substanzen einteilen. Des Weiteren werden sie in biologische und synthetische Materialien unterteilt. Werden sie untereinander in einem Implantat kombiniert, so spricht man von Kompositen.

Biologisch vorkommende organische Materialien besitzen Vorteile durch eine hohe Biokompatibilität. Die Zerfallsprodukte können durch die vorhandenen Stoffwechselwege abgebaut bzw. ausgeschieden werden, falls dies erforderlich ist. Makromoleküle können aber auch direkt in das sich regenerierende Gewebe integriert werden und dort entsprechende Funktionen übernehmen [34,118]. Zu den organischen Biomaterialien zählt die vollständig demineralisierte und zellfreie Knochen- und Knorpelmatrix bzw. deren Bestandteile wie Kollagene, Proteoglykane und Hyaluronsäuren. Es kommen Präparationen fester Implantatkörper [32] als auch Gele zur Anwendung [31,33]. Der biologischen Herkunft nach können wachstumsstimulierende Faktoren, aus der ehemaligen Matrix stammend, bereits in der Präparation vorhanden sein [37,38]. Des Weiteren werden Fibrin, Agarose und Alginat zu den organischen Biomaterialien gezählt. Biologische anorganische Biomaterialien können direkt eingesetzt oder durch bestimmte Prozesse in ihrer chemischen Struktur verändert werden, um deren Eigenschaften bezüglich Degradation, Biomechanik, Zelltaxi, -verträglichkeit, etc. zu modulieren [35]. In der Regel kommen von organischen Bestandteilen befreite Knochenpräparationen bzw. Exoskelette (z.B. koralliner Art), bei der Behandlung von Knochendefekten zum Einsatz. Chemisch veränderte Präparationen werden meist zu den synthetischen Biomaterialien gezählt.

Struktur und Eigenschaften von synthetischen Matrices erstrecken sich über einen sehr weiten Bereich und lassen sich mit entsprechendem technischen Aufwand gut einstellen. Die organischen Materialien werden in homo- und kopolymere Polyester, Polyaminosäuren, Polyanhydride, Polyorthoester und Polyphosphazene eingeteilt. Zu den anorganischen synthetischen Materialien gehören die hydrothermal [35] aus den bereits erwähnten biologisch anorganischen Materialien bzw. die durch Sinterungs- und Elutionsprozesse hergestellten Hydroxylapatitkeramiken [36], Biogläser (kalziumhaltige Silikate), kalziumphosphathaltige Knochenzemente und Kalziumsulfate. Der große Vorteil der synthetischen Biomaterialien liegt in ihrer praktisch unbe-

grenzten Verfügbarkeit. Wegen der sehr unterschiedlichen Anforderungen des chondralen bzw. ossären Gewebes an die Biomaterialien, sollen diese nun getrennt betrachtet werden.

4.2.2.1 Biomaterialien zur Knochenregeneration

Demineralisierte Knochenmatrix enthält Kollagen Typ I, nichtkollagene Proteine und kann osteoinduktive Wachstumsfaktoren enthalten [38,119]. Die Osteoinduktivität ist größer als bei allogenen Transplantaten (mineralisiertes Knochengewebe), da die Demineralisierung zu einer erhöhten Freisetzung der Wachstumsfaktoren führt [37,38]. Neben dieser Stimulation spielt die Geometrie des Materials, also dessen Präparation bei der Gewebedifferenzierung eine entscheidende Rolle [120]. Eine strukturelle Druckfestigkeit besteht nicht [38], so dass sich der Einsatz im Gelenkbereich als problematisch darstellt. In der Klinik wird das Material zum Strecken bei ungenügender Menge autogenen Knochengewebes verwendet [121].

Kollagen ist bei weitem das am häufigsten vorkommende Protein der Knochenmatrix. Seine Struktur lässt eine Mineralisierung, eine sekundäre Vaskularisierung und eine Bindung von Wachstumsfaktoren zu, so dass ein günstiges Milieu für die Knochenregeneration geschaffen wird [122]. Beim Einsatz von Kollagenschwämmen zur Behandlung von osteochondralen Defekten wird eine deutlich bessere Regeneration des subchondralen Knochens im Tiermodell erreicht. Allerdings kommt es darüber nur zur Ausbildung einer fibrocartilaginösen Knorpelschicht [31]. Kollagen besitzt (ähnlich wie demineralisierte Knochenmatrix) neben einer potentiellen Immunogenität keine strukturelle Druckfestigkeit, so dass es klinisch am ehesten als Transportvehikel für weitere osteogene Faktoren genutzt werden könnte [119].

Polymere finden in der Regeneration von Knochengewebe in erster Linie beim *Tissue Engineering* ihre Anwendung. Dreidimensionale Polymergerüste werden mit osteogenen Zellen besiedelt und kultiviert, um später in einen entsprechenden Knochendefekt implantiert zu werden. In Kombination mit Kalziumphosphaten ermöglichen sie die Herstellung von Kompositen mit vollständig neuen Eigenschaften bezüglich Druckfestigkeit und Elastizitätsmodul [123]. Da Polymere vor allem beim *Tissue Engineering* der Knorpelphase aber auch bereits klinisch als Zellträger für den Knor-

pelersatz eingesetzt werden, soll später eine ausführlichere Darstellung dieser Biomaterialien erfolgen (Entwicklung der Methodik).

Biologischer Kalziumkarbonat in der Kristallform Aragonit bzw. Kalzit degradiert im Vergleich zum größten Teil der eingesetzten Hydroxylapatite (Kalziumphosphate) deutlich schneller [41]. Die Knochenbindung findet bei den Kalziumkarbonaten direkt statt und erfolgt nicht über die Ausbildung einer afibrillären Apatitschicht im Sinne einer Zementlinie, wie es bei den langsamer degradablen Hydroxylapatiten der Fall ist [42,43]. Der Einsatz von auf Kalziumphosphaten basierenden Implantaten als Knochenersatzmaterialien ist vielfach untersucht worden [39,124]. Die meisten Biomaterialien aus Kalziumphosphat sind durch eine hohe Biokompatibilität, die Fähigkeit eine Knochenbindung herzustellen und unterschiedliche Degradationsgeschwindigkeiten gekennzeichnet. Diese Charakteristik rührt sowohl von der chemischen als auch der polykristallinen Struktur. Kalziumphosphate fördern die Adhäsion und Proliferation von Osteoblasten [40,125]. Eine Porosität verbessert die Penetration von Flüssigkeit, was zu einer vermehrten Löslichkeit führt, die die Eigenschaften der Kalziumphosphate als Biomaterial mitbestimmt [126]. Die hohe Biokompatibilität der Kalziumphosphate steht im direkten Zusammenhang mit der Zusammensetzung des anorganischen Knochenanteils, da natürlicher Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ 45 % der gesamten Knochenmasse ausmacht. Synthetische Hydroxylapatitkeramiken und β -Trikalziumphosphate $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ sind deshalb die am häufigsten untersuchten Knochenersatzstoffe [41,127]. Trikalziumphosphate (TCP) gehören zu den schnell degradierbaren Biomaterialien [128,129] (Tabelle 12) und werden klinisch erfolgreich als Knochenersatz eingesetzt [44,45,127]. Sie werden ihrer kristallinen Struktur nach in α - und β -TCP eingeteilt. Aufgrund dieser Struktur besitzen sie geringfügig unterschiedliche Degradationsgeschwindigkeiten. Löslichkeiten für den Knochenersatz wichtiger Kalziumphosphate sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Eine Sonderform der Kalziumphosphate stellen die so genannten Kalziumphosphatzemente (KPZ) dar. Ihre Eigenschaften und die der Kalziumsulfate werden unter den in dieser Studie eingesetzten Materialien der Knochenphase diskutiert.

Eine weitere Gruppe von in Frage kommenden Knochenersatzstoffen stellen die Biogläser bzw. die Glaskeramiken dar. Bereits 1971 wurden kalziumhaltige Silikate als

mögliche Knochenersatzstoffe beschrieben [130]. Die biologisch aktive Oberfläche führt zu einer Stimulierung des Knochenwachstums und zu einer lastenübertragenden Knochenbindung [131,132]. Die Knochenbindung findet ähnlich wie beim Hydroxylapatit über die Ausbildung einer Apatitschicht statt [133]. Da Biogläser im Vergleich zu kortikalem Knochen eine nur geringe mechanische, d.h. lastenübertragende Stabilität besitzen, werden unterschiedliche Ansätze bezüglich einer Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften dieser Materialien verfolgt [134,135]. Klinisch werden Biogläser als Ersatz für Gehörknöchelchen in der Hals-Nasen-Ohrenchirurgie, aber auch in der Wirbelsäulen-, Unfall- und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie erfolgreich eingesetzt [46,136,137].

4.2.2.2 Biomaterialien zur Knorpelregeneration

Verschiedenste biologische und synthetische Biomaterialien werden in experimentellen und klinischen Untersuchungen zur Regeneration von Knorpelgewebe eingesetzt. In der Regel handelt es sich um Materialien, die eine dreidimensionale Verteilung von chondrogenen Zellen erlauben. Folgende verschiedene Vorgehensweisen werden beim Einsatz von Gelen und Festkörpern verfolgt: Die Materialien können direkt in den Knorpeldefekt implantiert werden, um sekundär von chondrogenen Zellen besiedelt zu werden. Sie können allerdings auch vor der Implantation mit chondrogenen Zellen bestückt und ggf. zusätzlich vorkultiviert werden (*Tissue Engineering*). Klinische Erfahrungen mit der Direktimplantation im Gelenkbereich wurden durch kleine Kohlenstofffaser-Kissen gemacht. Die Zwischenräume der Fasern füllen sich mit einem kräftigen Bindegewebe, dass von seinen Eigenschaften dem Reparatursgewebe nach Abrasionsarthroplastik ähnelt [138]. Auch vier Jahre nach Implantation kann eine deutliche Schmerzreduktion verzeichnet werden [139]. Es gibt allerdings auch Anhaltspunkte, dass die Kohlenstofffasern gleichzeitig zu degenerativen Veränderungen führen können [80].

Werden Kollagenfestkörper ohne vorherige Zellbesiedlung in osteochondrale Defekte implantiert, so kommt es zu einem fibrocartilaginösen Regenerat mit einem deutlich geringeren Proteoglykananteil und dadurch geringerer Druckelastizität im Vergleich zu nativem hyalinen Knorpel [31]. Eine weitere Problematik stellt die Reproduzierbarkeit von Untersuchungen anhand von natürlichen Kollagenmatrices dar [140]. Werden für *in vitro* Untersuchungen Kollagenmatrices als Trägermateria-

lien für isolierte Chondrozyten verwendet, so kommt es durch Vorliegen von Kollagen I zu einer Dedifferenzierung. Die Zellen nehmen eine fibroblastenähnliche Morphologie an, während die chondrozytentypische Morphologie bei Kollagen II – Matrices erhalten bleibt und eine Steigerung der DNA-Synthese und des GAG-Gehaltes nachgewiesen werden kann [141]. Initial scheint die Differenzierung auch von der Beschaffenheit der Porosität abhängig zu sein [142]. Kollagene können ebenso in Gelform [27,143] genutzt werden. Sowohl differenzierter Phänotyp der Chondrozyten als auch deren GAG-Produktion bleiben bei Anzucht in Kollagen-Gelen über sechs Wochen erhalten [144]. An die Struktur der Kollagene lagern sich zelluläre Enzyme an und zerlegen seine Struktur. Die Degradation des Materials schafft so Platz für das sich entwickelnde Gewebe [31]. 6 Monate nach Implantation zeigt sich im Tiermodell eine deutlich bessere Regeneration des Knorpelgewebes als in den Kontrollen [145]. Im Vergleich zu Kollagenmatrices neigen Kollagengele in Anwesenheit von Serum zu schrumpfen, was bei der Defektanpassung unter Umständen zu Inkongruenzen führen kann [146]. Ein weiteres Problem stellt die Immunogenität von Kollagenbestandteilen dar, so dass die Einheilung im Defekt gestört werden kann [47,48].

Werden immunologisch inerte Gele verwendet, können allogene Zellen vor dem Immunsystem des Empfängers abgeschirmt werden. Gleichzeitig können sie für eine initiale Fixierung im Defekt sorgen [18]. Werden dedifferenzierte Chondrozyten dreidimensional in Gelen kultiviert, so kommt es zu einer Redifferenzierung und Wiederaufnahme der für Chondrozyten typischen Kollagensynthese [57]. Neben den Kollagengelen werden weitere natürliche Hydrogele zur dreidimensionalen Anordnung isolierter chondrogener Zellen eingesetzt. Dazu zählen Alginat [51,147,148], Fibrin [52-55], Hyaluronsäuren [56] und Agarose [57,58]. Auch wenn der alleinige Einsatz einer viskösen Chondrozyten-Hyaluronsäuresuspension bereits *in vivo* zu einer Gelenknorpelregeneration führt [56], können die Gele, bzw. deren Bestandteile auch untereinander kombiniert werden, um bestimmte Eigenschaften zu optimieren [147,149]. Die biomechanische Stimulierbarkeit von Chondrozyten scheint durch dreidimensionale Gel-Kulturen erhalten zu bleiben, was - abhängig vom Stimulus - zu einer reproduzierbaren Matrixproduktion führt [58].

Als Gerüst für die Gewebezüchtung bzw. als Vehikel für lebende chondrogene Zellen werden neben biologischen Kollagenmatrices synthetisch hergestellte Polymere eingesetzt. Der große Vorteil der synthetisch hergestellten Polymere liegt in der praktisch freien Modulierbarkeit dieser Materialien. Sie können als Vliese [49], als poröse Festkörper [50] oder als Gele eingesetzt werden. Durch eine dreidimensionale Anpassung der Biomaterialien kann eine anatomische Rekonstruktion erfolgen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Veredlung mit Wachstumsfaktoren, die dann kontinuierlich während der Degradation freigesetzt werden können. Neben den bereits klinisch zugelassenen Poly-(L)laktaten (PLLA), Polyglykolaten (PGA), deren Kopolymeren (PGLA) und Polydioxanon (PDS) werden viele weitere Polymere auf ihre Eigenschaften als biokompatible Trägermaterialien für die Knorpelregeneration untersucht. Zu ihnen gehören unter anderem Polycaprolactone [150], Polyanhydride [151], poly(β -hydroxybutyrate) [152] und Polyphosphazene [153]. Polymere müssen nicht notwendigerweise mit isolierten Zellen bestückt werden. Eine Kombination mit vollständigen Geweben kann ebenfalls eine Differenzierung in Richtung eines anderen, später transplantierbaren Gewebes hervorrufen. So kann im Kaninchenmodell mit Hilfe von autogenem Periost, das auf PLA-Matrices aufgenäht wird, eine Defektheilung am Knie mit hyalinartigem Knorpelgewebe und einem Anteil von 82 % des Kollagen Typs II erreicht werden [154].

4.3 Entwicklung der Methodik

Bei der Entwicklung einer Methodik zur Wiederherstellung der knorpeligen Gelenkfläche müssen verschiedenste Aspekte beachtet werden. Da prothetische Materialien, wie sie in der orthopädisch-traumatologischen Chirurgie zum Einsatz kommen, nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen [59], muss ein alternatives Verfahren entwickelt werden. Ziel ist eine Rekonstruktion eines Defektes, nach der die ursprünglichen Eigenschaften des Gelenkanteils wiederhergestellt sein sollten. Das heißt, dass nicht nur eine Regeneration der knorpeligen Oberfläche erfolgen, sondern gleichzeitig eine Integration in das darunter liegende Gewebe stattfinden muss, um die ursprüngliche physiologische und biomechanische Gelenkfunktion wieder vollständig herzustellen. Bei der Orientierung am nativen osteochondralen Gewebe fällt seine Multiphasigkeit auf. Die Schichten haben unterschiedliche Eigenschaften und übernehmen entsprechend unterschiedliche komplexe physiologische und biomechanische Aufgaben bei der Gelenkfunktion und deren Erhalt [1]. Unter einem osteo-

chondralen Defekt versteht man das Fehlen von gesundem Gewebe in diesem Bereich. Zur Wiederherstellung muss dieser Defekt mit einem entsprechenden Material in seiner dreidimensionalen Ausdehnung gefüllt werden. Das Material sollte in seiner physiologischen und biomechanischen Beschaffenheit idealerweise dem nativen osteochondralen Gewebe gleichen. Das bedeutet, dass auch hier ein mehrphasiges Implantat mit entsprechenden Funktionen der einzelnen Phasen und deren Zusammenwirken zum Einsatz kommen sollte. Die Geometrie der Materialien spielt bei der Gewebedifferenzierung eine entscheidende Rolle [120]. Eine möglichst nahtlose Integration in das umgebende Gewebe ist wünschenswert. Das eingebrachte Material unterliegt dem gleichen physischen Stress, dem das anliegende Gewebe ausgesetzt ist. Da bis zum heutigen Tage künstliche Materialien keine Regenerationsfähigkeit und eine erheblich kürzere Lebensdauer als natives Gewebe besitzen, unterliegen diese erhöhten Abnutzungserscheinungen, die im Verlauf zu einer erneuten Defektbildung führen können [59]. Die Materialien sollten also nach Möglichkeit im Verlauf durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden und damit biodegradierbar sein. Während des stattfindenden Umbaus darf es nicht zu einer Insuffizienz des Materials oder dessen Verankerung im umliegenden Gewebe kommen. Die Materialien müssen immunverträglich und deren Degradationsprodukte dürfen nicht toxisch sein [155]. Ein einfaches möglichst minimalinvasives Verfahren [117,156] sollte für die spätere klinische Anwendung geplant werden. Bereits 1977 wurde eine potentielle Behandlung von Knorpeldefekten unter Einsatz von Zellexpansion mit an den Defekt dreidimensional in Form und Struktur angepassten Biomaterialträgern vorausschauend diskutiert [157].

4.3.1 Implantatherstellung (Gerüst für die Gewebezüchtung)

Sowohl bei chondralen als auch bei osteochondralen Defekten muss in der späteren klinischen Anwendung eine Fixierung des eingebrachten Biomaterials bzw. des gezüchteten Gewebes erfolgen, damit postoperativ möglichst schnell mit der erforderlichen Mobilisation begonnen werden kann. Diese Fixierung findet im subchondralen Knochen statt. Das Implantat muss also einen knochenäquivalenten Anteil besitzen. Da Knorpelgewebe nur sehr eingeschränkte regenerative Eigenschaften besitzt [71-73], aber ein Langzeitüberleben direkt von der Vitalität der Chondrozyten abhängig ist [25,94] sollten im knorpeligen Anteil des Implantates bereits vitale chondrogene Zellen vorhanden sein. Sowohl Zellverteilung als auch Struktur und Quantität der

von ihnen produzierten Matrix sollten nach Möglichkeit dem das Implantat umgebendem Gewebe entsprechen.

4.3.1.1 Materialien

Da sehr unterschiedliche Ansprüche an die Eigenschaften der erforderlichen Materialien entsprechend der Knochen- und Knorpelphase und an das zwischen ihnen liegende Interface gestellt werden, sollen diese Punkte im Folgenden einzeln betrachtet werden.

4.3.1.1.1 Knochenphase

Zur Auffüllung von Knochendefekten ist nach wie vor autogene Spongiosa der Goldstandard. Für die Entnahme ist allerdings in der Regel ein zweiter Eingriff erforderlich, der mit einer entsprechenden Erhöhung der Morbidität einhergeht [158]. Ist es nicht möglich, genügend autogenes Knochenmaterial zu gewinnen, so kann auf Ersatzmaterialien zurückgegriffen werden. Bereits erfolgreich in der Behandlung von Knochendefekten eingesetzte Materialien wurden zunächst auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Eine hohe biologische Verträglichkeit und eine schnelle Degradation einschließlich Ersatz durch Knochengewebe waren die Voraussetzungen. Bei der Auswahl konnten zwei Gruppen unterschieden werden: Zum einen die Kalziumkarbonate, der poröse Aragonit und der solide Kalzit, und zum anderen die abbindenden und damit frei modulierbaren Materialien Kalziumsulfat und die Kalziumphosphatzemente Norian SRS[®] und Biobon[®].

Findet eine direkte Knochenbindung an Biomaterialien statt, verläuft sie in folgenden Schritten: Zunächst erfolgt eine oberflächliche Degradation. Sie beinhaltet eine Auslaugung mit partikulärem Zerfall und bei bestimmten Implantaten eine einsetzende Osteoklasie. Im Anschluss kommt es zur Deposition von Calcosphäriten. Durch die Fusion der Calcosphärite entsteht eine Zementlinie [159]. Auf ihr werden von Osteoblasten synthetisierte Kollagene deponiert. Im Anschluss mineralisiert diese kollagenreiche Matrix [160]. Bei schnelldegradierbaren Implantaten, z.B. Kalziumkarbonaten und Trikalziumphosphaten, können Osteoblasten keine Zementlinie auf der Materialoberfläche deponieren. Durch das Hineinwachsen in die poröse Oberfläche kommt es zu einer physikochemischen Knochenbindung [161,162].

4.3.1.1.1 Kalziumkarbonate

Die Degradation von Kalziumkarbonaten nach Implantation im Knochen und der vollständige Ersatz durch Knochengewebe im Verlauf ist bei kleinen Defekten bekannt [163]. Bei gleicher chemischer Formel $[\text{CaCO}_3]$ unterscheiden sich die eingesetzten Kalziumkarbonate neben der Porosität lediglich in ihrer Struktur. Sie geht mit einer unterschiedlichen Symmetrie und Kristallstruktur einher. Kalzit besitzt eine trigonale, Aragonit eine orthorhombische Kristallstruktur [164]. Natürliche koralline Materialien ermöglichen eine Knochenbildung direkt an ihrer Oberfläche [43]. Die schnelle Degradation des Materials führt zu einer Erhöhung der Oberflächenrauigkeit, an der die Zellen anhaften. Von ihnen werden mineralisierende globuläre Strukturen und Kollagene produziert, die direkt an Vorsprüngen der Oberfläche und in den Mikroporen inserieren. Es bildet sich also keine Einkapselung durch Bindegewebe [42,43]. Während der Degradation kommt es zum Ersatz durch Knochengewebe, das zunehmend die biomechanische Funktion übernimmt, auch wenn es zunächst zu einer Verminderung der Druckfestigkeit kommen kann [165]. Eine Degradation des Materials erfolgt im Knochen interessanterweise schneller als im gut durchbluteten Weichgewebe [166], was das Vorliegen eines aktiven Umbauprozesses im Knochengewebe unterstreicht. An ihm sind enzymatische Lyse-Vorgänge beteiligt. Wird zum Beispiel die Carboanhydrase der Osteoklasten durch Acetazolamid gehemmt, kommt es zu einer verzögerten Degradation des Implantates [167]. Ein weiterer Faktor, der die Degradation entscheidend beeinflusst, ist die Porosität des Materials. Je größer das Porenvolumen ist, desto schneller erfolgen Degradation, Vaskularisierung und Knochenapposition [168]. Entsprechend wäre für eine spätere klinische Anwendung eine schnellere Degradation des porösen Aragonits zu erwarten. Sechs Monate nach Implantation können im humanen alveolären Knochen lichtmikroskopisch nach wie vor Kalziumkarbonat, bzw. Reste davon nachgewiesen werden. Das Biomaterial wird dabei vollständig von Knochen umbaut respektive ersetzt [168,169]. Kalziumkarbonate werden seit geraumer Zeit klinisch in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie eingesetzt [170-172]. Bezüglich der Zellverträglichkeit *in vitro* scheint kein Unterschied zwischen den Kristallformen Aragonit und Kalzit zu bestehen [173]. Wegen der schnellen Degradation kommt es bei der Umbauung mit Geflechtknochen nicht zur Ausbildung einer afibrillären, kollagenfreien, zementlinienartigen Schicht [174]. Die mechanische Bindung durch den Verankerungseffekt von neu gebildetem Knochen an der durch die Degradation zunehmend rauen Oberfläche des Implan-

tes spielt bei der Kalziumkarbonat-Knochen-Bindung eine entscheidende Rolle [174]. Interessanterweise führt die alleinige Implantation von Biocoral[®] auf Höhe des subchondralen Knochens bei 4 mm-Defekten im Patellagleitlager von Kaninchen zu einer hyalinartigen Regeneration des darüber liegenden Knorpels. Während nach drei Monaten noch Fragmente des Biocorals nachweisbar sind, ist ein Nachweis nach 6 Monaten nicht mehr möglich. Zu diesem Zeitpunkt findet sich bereits eine gut definierte neu ausgebildete Tidemark, ein dem nativen Gewebe äquivalenten Knorpel-Knochenübergang [175].

4.3.1.1.1.2 Kalziumsulfat / TCP

Das Hemihydrat von Kalziumsulfat kristallisiert und härtet in einer exothermen Reaktion zu hydratisiertem Kalziumsulfat (Gips) aus, indem Wasser hinzugegeben wird. Kalziumsulfat wird durch Osteoklasten abgebaut. Osteoblasten adherieren an dem Material und lagern auf der Oberfläche Osteoid ab [176]. Bereits 1892 wurde Gips als Knochenersatz erfolgreich am Menschen eingesetzt [177]. Nach Auffüllung von kurretierten einkammrigen Knochenzysten zeigen Langzeituntersuchungen eine vollständige Degradation des Materials, zum Teil kam es zu einem vollständigen Ersatz durch körpereigenen Knochen [178]. Bereits 6 Wochen nach Implantation können im Tiermodell weder radiographisch noch histochemisch Reste des Biomaterials nachgewiesen werden [179]. Wird eine Präparation aus Kalziumsulfat und TGF- β 1 verwendet, so kommt es bei Auffüllung eines kortikalen Defektes kritischer Größe zu einer Auffüllung von 67% des Defektes innerhalb von 6 Wochen [180]. Die in dieser Studie zusätzlich eingebrachten TCP-Partikel degradieren im Vergleich zum Kalziumsulfat deutlich langsamer [181] auch wenn sie zur Gruppe der schnell degradierbaren Kalziumphosphatverbindungen gehören [128,129] (Tabelle 12). Der klinische Einsatz von TCP als Knochenersatz hat sich bewährt [44,45].

4.3.1.1.1.3 Kalziumphosphatzemente

Die beiden eingesetzten KPZ besitzen wie das Kalziumsulfat abbindende Eigenschaften, die zur Interface-Stabilisierung eingesetzt werden können. Im Gegensatz zu den Kalziumkarbonaten und dem Kalziumsulfat kommt es bei der Degradation von Kalziumphosphaten zur Freisetzung von Phosphat. Die Präzipitation führt zu nadelförmigen Apatitkristallen an der Oberfläche der Biomaterialien. Sie gewährleistet einen nahtlosen Übergang zum mineralisierten Knochengewebe. Eine festere

Knochenbindung als bei den Kalziumkarbonaten ist das Resultat [182]. Unterschiedliche Zemente weisen dabei unterschiedliche Zeiten der Degradation auf.

Der KPZ I (Biobon[®]) besteht aus Vorläufern von Kalziumphosphat. Nach Hydratation entsteht eine Paste, die im Gegensatz zum Kalziumsulfat endotherm bei 37°C auskristallisiert und –härtet [64]. In einem Knochendefektmodell am Hund zeigt KPZ I nach Implantation ein ähnliches Verhalten wie autogene Spongiosa. Innerhalb von 26 Wochen wird das Biomaterial zu 99% durch neu gebildeten Knochen ersetzt [64]. Das Material hat während der Degradation bei Augmentation experimenteller Tibiaplateaufrakturen an der Ziege bessere biomechanische Eigenschaften als autogene Spongiosa, bei deren Einsatz es wiederholt zu Insuffizienzen kam. Nach 6 Monaten waren nur noch 4 % Volumenanteil des ursprünglich eingebrachten Materials vorhanden. Im klinischen Einsatz finden sich in bioptischen Untersuchungen nach 2-12 Monaten nur noch Reste des Zementes. Eine trabekuläre Knochenbildung findet ohne eine bindegewebige Umhüllung direkt an der Oberfläche des Materials statt. Die schnelle Degradation des Materials im Vergleich zu gesinterten Kalziumphosphaten wird dabei auf die amorphen kristallinen Eigenschaften des KPZ I zurückgeführt [183]. Wie in der kristallographischen Röntgenanalyse festgestellt, ist nach 28d in SBF im Schüttelbad nur noch ein reiner Hydroxylapatit (HA) $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ nachweisbar. Das nach 24h noch vorhandene Trikalziumphosphat (TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ kann nicht mehr nachgewiesen werden. Auch bei KPZ I besteht die Möglichkeit, durch Zusatz von Antibiotika oder Wachstumsfaktoren eine Aufwertung vorzunehmen [184].

Der KPZ II (Norian SRS[®]) hat von der Verarbeitung her ähnliche Eigenschaften wie der KPZ I. Es handelt sich um einen Karbonat-Apatit-Zement. Nach Zugabe der Natriumphosphatlösung kommt es zum Aushärten des Zementes innerhalb von 10 min. bei 37 °C. Nach dem vollständigem Aushärten liegt Dahllit vor, der in seiner Zusammensetzung der mineralischen Phase von Knochengewebe entspricht und eine Druckfestigkeit von bis zu 55 MPa besitzt [65]. Im Vergleich dazu besitzt Knochen eine Druckfestigkeit von $(8.78 \pm 5.2 \text{ MPa})$ im spongiösen [185] und bis zu 200 Mpa im kortikalen Bereich [186]. Nach der Implantation ist im Tiermodell bereits nach 2 Wochen fast die gesamte Oberfläche des Materials von Knochen ummantelt. Nach dem gleichen Muster wie es beim Einsatz von autogener Spongiosa und kortikalem

Knochen der Fall ist, wird das Material durch Osteoklasten und –blasten graduell remodelliert. Dabei kommt es zur Revaskularisierung und Ausbildung der ursprünglichen trabekulären Knochenstruktur. Biomechanische Untersuchungen weisen nach acht Wochen bereits eine praktisch identische Torsionsstabilität im Vergleich zur unbehandelten contralateralen Seite auf. Die Druckfestigkeit ist der von gesundem spongösem Knochen während der Degradation stets überlegen [187]. Eine Insuffizienz entsteht eher im Material selbst als an der Material-Knochengrenze [188]. Durch die feste Knochenbindung und seine hohe Druckfestigkeit ist der KPZ II für unser Modell gut geeignet und in der Klinik bereits erfolgreich zur Augmentation von Tibiaplateaufrakturen [189], bei Impressionsfrakturen des Kalkaneus [190], bei instabilen osteoporotischen Frakturen [191] und distalen intraartikulären Radiusfrakturen [192] eingesetzt worden. Im Weichgewebe kommt es zu einer vollständigen Degradation des Materials, es sind allerdings schmerzhaft Weichteilreaktionen beschrieben [193].

4.3.1.1.2 Knorpelphase

Bei der Auswahl der zu verwendenden Materialien für die Knorpelphase wurden unterschiedliche Aspekte in Betracht gezogen. Bei der Heilung von Knochendefekten (vaskularisiertes Gewebe) reicht es aus, ein degradierbares Implantat, das über die Zeit von neu gebildetem Knochen ersetzt wird, bereitzustellen. Für das Langzeitüberleben eines chondralen Transplantates ist es allerdings von Bedeutung, dass sich fortwährend lebende Zellen im transplantierten Gewebe befinden [94,194]. Da es wegen der Avaskularität des Knorpelgewebes zu keiner Migration chondrogener Zellen in den Knorpeldefekt kommt, sollten sich bei der Rekonstruktion bereits vitale chondrogene Zellen in den zu implantierenden Materialien in entsprechender Verteilung befinden. Die durchschnittliche Zelldichte im Gelenkknorpel beträgt 10×10^3 Zellen/mm³ am Femurkopf eines Erwachsenen [195]. Unter Berücksichtigung der Verdünnung mit Fibrin, der Fixierung mit verdünntem Thrombin und dem Volumen der Polymervliesfasern in der späteren Knorpelschicht, ist im hier etablierten Modell die Zelldichte mit $20\text{-}25 \times 10^6$ vitaler Zellen/ml in der Ausgangssuspension gewählt, um im Implantat eine dem nativen Gewebe entsprechende Dichte vitaler Chondrozyten zu erhalten. Neben einer dreidimensionalen Anordnung sollte den Zellen ermöglicht werden, selbst Matrix zu produzieren und damit während der Degradation der Biomaterialien diese zu ersetzen. Nach chirurgischer Behandlung eines Knor-

peldefektes ist die schnelle Mobilisation des Gelenkes für den Erhalt seiner vollen Funktion unbedingt erforderlich. Demnach sollte das Biomaterial-Zellkonstrukt bei Implantation eine ausreichende Stabilität besitzen, um entsprechende physiotherapeutische Beübungen zu ermöglichen, ohne dass das Implantat dabei in Mitleidenschaft gezogen wird. Eine Gewebeausdifferenzierung *prä implantationem* scheint also ratsam und wird durch die Fortschritte der Gewebezuchtforschung (Tissue-Engineering) *in vitro* zunehmend möglich [196]. Nach dem vollständigen Ersatz der Biomaterialanteile *in vivo* sollten sich vitale Chondrozyten in einer von ihnen produzierten Matrix befinden, die im Idealfall biomechanisch und -chemisch dem nativen Knorpel entspricht, damit die Zellen die Aufgabe der Gelenkknorpelerhaltung übernehmen können.

Gele ermöglichen eine dreidimensionale Anordnung von isolierten Chondrozyten, eine gleichmäßige Verteilung und den Erhalt der Differenzierung bzw. die Begünstigung der Redifferenzierung nach Vervielfältigung durch Monolayerkultur [57]. Von den Zellen produzierte Matrixbestandteile werden vor Ort gehalten und ersetzen degradierte Gelanteile. Ein ideales Gel scheint das natürliche Polymer Fibrin zu sein, das seit geraumer Zeit in der Chirurgie seine Anwendung findet. Chondrozyten bleiben in vernetztem Fibrin vital und zeigen den für Knorpel spezifischen Phänotyp [53], was mit unserem Modell bestätigt werden kann (Abb. 20). Beim Einsatz von in Fibrin eingebetteten Chondrozyten in der Behandlung von tiefen Knorpeldefekten kann im Pferdmodell eine qualitativ bessere Knorpeloberfläche im Vergleich zu den leergebliebenen Kontrollen beobachtet werden [55]. Neben den bereits erfolgten klinischen Zulassungen verschiedener industrieller Präparationen, ist für die spätere klinische Anwendung auch eine autogene Präparation möglich, so dass die nach wie vor kontrovers diskutierte Infektionssicherheit erheblich erhöht und eine Immunreaktion des Empfängers auf das zu implantierende Gel ausgeschlossen werden kann. Autogene Fibrinpräparationen haben dabei die gleichen biomechanischen Eigenschaften wie industriell gefertigte [197]. Die biomechanische Stimulierbarkeit von Zellen bleibt in Gelen erhalten [58], allerdings bieten Gele keine ausreichende Druckfestigkeit für eine frühe Mobilisation, so dass der alleinige Einsatz eines Fibrinzellkonstruktes biomechanisch fraglich ist [54]. Durch zusätzliches Einbringen eines festen degradierbaren Biomaterials können die biomechanischen Eigenschaften des Implantates deutlich verbessert werden. Bei der Auswahl eines dreidimensionalen bio-

degradablen Gerüsts scheint die Gruppe der hydrolytisch abbaubaren Polymere am vielversprechendsten. Poly-(L)Laktat (PLLA), Polyglykolat (PGA), deren Copolymere und Polydioxanon (PDS) gehören zu den am ausführlichsten untersuchten synthetischen Polymeren und werden seit den siebziger Jahren vor allem als Nahtmaterial in den chirurgischen Disziplinen eingesetzt. Matrices aus PGA und PLLA dienen beim Tissue-Engineering von Knorpel seit einiger Zeit als dreidimensionales Gerüst für Chondrozyten [30,198]. Diese Polyhydroxyester degradieren durch Hydrolyse [199] und zerfallen dabei in ihre Monomere Laktat und Glykolat. Beide α -Hydroxysäuren sind natürlich und kommen im humanen Organismus vor [200,201]. Laktat entsteht während des anaeroben Abbaus von Glykogen im Muskel und wird in der Leber zur Gluconeogenese verwendet. Glykolat hingegen ist ein Metabolit der Glycinsynthese aus Glyoxylat. Polyhydroxyester in entsprechender Aufbereitung bieten eine supportive Mikroumgebung für die chondrozytäre Differenzierung von Zellen [49,198]. Im Vergleich zu den natürlichen Polymeren Fibrin und Kollagen degradieren sie langsamer, so dass ein Ersatz durch ECM, die von eingebrachten isolierten Chondrozyten produziert wird, erfolgen kann [202]. Die Problematik der inhomogenen Zellverteilung und die daraus zum Teil resultierende unterschiedliche phänotypische Expression der Zellen bei direkter Besiedlung von Polymergerüsten [28,117] scheint durch die Kombination der Polymergerüste mit Gelen gelöst [203,204] was sich in dieser Studie bestätigt (Abb. 17-21). Diese Kombination scheint einer Verformung und Schrumpfung der Implantate entgegenzuwirken [203]. Dies ist für den Erhalt der anatomischen Rekonstruktion im Gelenkbereich unbedingt erforderlich. In dieser Studie konnten ebenfalls keine nennenswerten Schrumpfungartefakte beobachtet werden. Im Tiermodell kann mit vorkultivierten Polymervlies-Fibrin-Chondrozytenkonstrukten, die mit Hilfe von Fibrin im Defekt fixiert wurden, eine Regeneration der knorpeligen Gelenkfläche erreicht werden [204], was für den Einsatz dieser Kombination im Bereich der Knorpelphase spricht.

4.3.1.1.3 Interface-Stabilisierung

Sollen biphasische, an die Gelenkmorphologie angepasste Implantate hergestellt werden, um gezüchtetes Knorpelgewebe im subchondralen Knochen zu verankern, so darf es nach Implantation nicht zu einer Insuffizienz des Interfaces zwischen den beiden Phasen kommen. Die erforderliche Mobilisation nach chirurgischen Gelenkeingriffen führt zu Scher- und Druckbelastung auf das gesamte Implantat und damit

auch auf das Interface. Mit der Stabilität des Interfaces steht und fällt das Einwachsen der biodegradablen Implantate in anatomisch korrekter Position und bestimmt so das spätere klinische Ergebnis. Bei der Herstellung der Implantate in dieser Studie wurden verschiedene Techniken zur Interface Stabilisierung verfolgt:

1. Verklebung durch Fibrin
2. Direkte Zelladhäsion und Matrixapposition der Chondrozyten an der Knochenphase
3. Inkorporierung von Biomaterialanteilen der Knorpelphase in die Knochenphase (Komposit)

Auch wenn kommerzielle Fibrinpräparationen z. T. im Tiermodell erfolgreich zur Fixierung von zu transplantierendem, gezüchtetem Knorpelgewebe in entsprechenden Defekten eingesetzt wurden [204], scheint eine biomechanisch ausreichende Befestigung von nativen Knorpeltransplantaten unzureichend zu sein [205], so dass eine zusätzliche Immobilisation erforderlich ist. Die maximale Scherkraft, der frisch auspolymerisiertes Fibrin standhält, beträgt dabei 1,82-3,26 N/cm² [206].

Da die Degradation von Fibrin *in vitro* bereits nach drei Tagen einsetzt und bei einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml nach sieben Tagen 40 % des Fibrinklebers degradiert ist [53], ist davon auszugehen, dass die Fibrin-bedingte Stabilisierung des Interfaces mit zunehmender Kulturzeit eine immer kleinere Rolle spielt. Während der Degradation des Fibrins wurde allerdings von den zum Teil auch an der Knochenphase adherierenden Chondrozyten Matrix produziert, deren Bestandteile direkt an der Oberfläche der Knochenphase inserierten (Abb. 19) und so zunehmend die stabilisierenden Eigenschaften des Fibrins übernahmen [204,207]. Dieser Mechanismus der Interface-Stabilisierung gilt für alle in dieser Studie hergestellten Implantate. Das Interface des Kalziumkarbonatträgers Biocoral kann durch seine Porosität und der daraus resultierenden 674-fachen Interfaceflächenvergrößerung (s. Ergebnisse) am stärksten von diesem Mechanismus profitieren.

Bei der Verwendung von abbindenden Materialien (KPZ, Gips/TCP) für die Knochenphase (Abb. 9) kam ein weiterer Stabilisierungsfaktor hinzu: Durch die Inkorporierung von Vliesfasern in die Knochenphase entstanden noch vor dem Einsatz von Fibrin und Zellen Biomaterial-Komposite mit einer initialen Interface-Stabilität. Auch in den Randbereichen der Implantate konnte durch diese Methodik ein direkter Ver-

bund zwischen Knorpel- und Knochenphase erreicht werden, ohne dass es dort nach Perfusionskultur zu einer Abhebung der herstellungsbedingten unregelmäßigen Vliesstruktur kam, wie es bei den Kalziumkarbonaten zum Teil der Fall war (Abb. 13). Durch die Perfusionskultur kam es allerdings bei zwei der abbindenden Materialien (Kalziumsulfat-TCP und KPZ I) zur Interfaceinsuffizienz der Implantate. Auch wenn Kalziumsulfat Eigenschaften für die Knochenregeneration bei biomechanisch nicht belasteten Knochenarealen bietet [178], so verläuft die Degradation zu schnell, um eine erforderliche Stabilität des Implantates nach Perfusionskultur für die Durchführung der Implantation und dem darauf folgenden Verbleib im Gelenk zu gewährleisten. Während es bei den Implantaten aus Kalziumsulfat zu einer vollständigen Erweichung des Materials und damit zu einer vollständigen Insuffizienz der Knochenphase einschließlich des Interfaces kam, fand sich bei den Implantaten aus KPZ I lediglich eine Insuffizienz des Interfaces: Im Bereich der inkorporierten Vliesfasern kam es zu einer Auflockerung der Knochenphase und damit zu einer vollständigen Ablösung der Knorpelphase (Abb. 23). Da in diesem Bereich weder Reste von Fibrin noch neu produzierte Matrix der Chondrozyten vorliegen, scheint eine Interface-Stabilisierung über diese Mechanismen ausgeschlossen. Der KPZ I erschien in sich grobkörniger und damit inhomogener als der KPZ II, was zu einer Stabilitätsreduzierung innerhalb des Materials zu führen schien. Durch die resultierende erhöhte Porosität ist ein leichteres Eindringen von Flüssigkeit (Medium während der Perfusionskultur) möglich. Eine verstärkte Degradation der im Material befindlichen Polymerfasern führt zu einer lokalen Erhöhung von sauren Valenzen (Laktat- / Glykolatmonomere) [200,201], so dass in diesem Bereich verstärkt lytische Vorgänge angenommen werden können. Eine Erklärung für die Insuffizienz des Implantates wäre damit gegeben. Obwohl sich das Einbringen von Vliesanteilen bei KPZ II wegen der trockenen Konsistenz vor der Aushärtung am schwierigsten gestaltete, wartete dieses Trägermaterial bei der manuellen Prüfung mit dem stabilsten Interface auf. Um die Verarbeitungszeit dieses KPZ zu variieren und damit die Herstellung von Kompositen mit Polymervliesen zu erleichtern, könnte die Menge des zugemischten Monokalziumphosphatmonohydrates und Fluorids einen entscheidenden Faktor darstellen [208]. Eine vollständige Durchflechtung der Knochenphase der Implantate könnte zudem die elastischen Eigenschaften des Implantates verbessern und so denen des nativen Gewebes weiter annähern [123].

4.3.1.1.4 Randzone

Bezugnehmend auf eine erfolgreiche spätere klinische Anwendung muss ein besonderes Augenmerk auf die Randzone der Knorpelphase gelegt werden. Das nahtlose Einwachsen und damit die Matrixüberbrückung zwischen Knorpelphase des Implantates und dem umgebenden nativen Knorpel sind erforderlich, um den späteren biomechanisch-physiologischen Belastungen (Druck- und Scherkräfte) gerecht zu werden. Eine Spaltbildung würde einem Einriss des Knorpelgewebes gleichkommen und degenerative Gelenkveränderungen nach sich ziehen. Der Einsatz von mit vitalen Zellen besetzten organischen Matrices scheint eine Matrixüberbrückung möglich zu machen, auch wenn eine vollständige Überbrückung noch nicht beschrieben wurde: Werden perichondrale Zellen dreidimensional in porösem PLA gezüchtet so kann 6 Wochen nach Implantation in einen osteochondralen Defekt teilweise eine nahtlose seitliche Integration mit überbrückenden Kollagenfasern nachgewiesen werden [50]. Auch beim Einsatz von Scheiben zellfreier Knorpelmatrices, die mit vitalen isolierten Chondrozyten beimpft werden, kommt es nach subkutaner Implantation neben einer vollständigen Besiedlung der Matrices zum Zusammenwachsen der Scheiben mit Matrixbrücken [118], die biomechanisch als stabil angesehen werden [34]. Um eine optimale Anpassung des Implantates an die Dreidimensionalität eines Defektes zu erreichen, empfiehlt es sich, eine Schienvorrichtung zu verwenden. So können herstellungsbedingte Randinkongruenzen, die von den weichen, elastischen und anfänglich formbaren Eigenschaften der Knorpelphase herrühren, auf ein Minimum reduziert werden. Einen Hinweis dafür liefern die Ergebnisse der in Glasröhrchen kultivierten Implantate. Durch die Schienung während der Perfusionskultur scheinen diese Inkongruenzen deutlich geringer ausgeprägt.

4.3.2 Chondrozyten – Kultivierung

Isolierte Chondrozyten sind in der Lage, ihren Differenzierungsgrad in Subkultur *in vitro* beizubehalten [157]. Die Kulturbedingungen haben dabei einen entscheidenden Einfluss auf Phänotyp und Proteinsyntheseleistung. Isolierte Chondrozyten können in Monolayerkultur vervielfältigt werden. In dieser Phase verändert sich sowohl das phänotypische Erscheinungsbild als auch die genetische Expression [209]. Diese Dedifferenzierung ist teilweise rückläufig, werden die Zellen wieder dreidimensional orientiert. Es kommt dann zur Redifferenzierung der Zellen [57].

4.3.2.1 Isolation

Um Chondrozyten vermehren zu können, müssen die fest in ihre Matrix integrierten, nicht mehr proliferierenden Zellen aus ihrer Umgebung herausgelöst werden. Erst in den 60er Jahren wurden Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit der Isolation und Kultivierung von Chondrozyten beschäftigten [209]. Die Isolation von Chondrozyten wurde erst durch den Gebrauch von matrixdegradierenden Enzymen wie Trypsin, Kollagenase und Hyaluronidase möglich. Durch die Verwendung eines Enzymcocktails aus verschiedenen Enzymen (wie in dieser Studie) können unterschiedliche Verbindungen von Matrixbestandteilen gleichzeitig aufgebrochen werden. Die Digestion der Matrix erfolgt so schneller und effektiver und lässt eine Reduktion der einzelnen Enzymkonzentrationen bei gleicher Digestionsleistung zu. Dies führt zu einer Herabsetzung der Toxizität und damit zu einer höheren Vitalität isolierter Zellen [210]. Bei zum Teil stark variierenden Enzymaktivitäten, die auf unterschiedliche Chargen der Enzyme zurückgeführt werden konnten, lag nach 18h Stunden Digestion teilweise noch keine homogene Suspension vor. Verbliebene Knorpelstücke wurden mit einem frischen Enzymcocktail erneut für weitere 12h angesetzt. Die höheren Vitalitätsgrade der Zellen dieses zweiten Ansatzes lassen sich vermutlich auf die toxische Wirkung der zur Keimreduzierung durchgeführten Ethanolbehandlung der abgeschälten Knorpelstücke vor der Isolation zurückführen: Das Herauslösen der Zellen aus ihrer Matrix durch die Behandlung mit dem Enzymcocktail fördert zuallererst die Zellen, die sich in der Peripherie der Knorpelstücke befinden. Diese Zellen waren der höchsten Konzentration des Ethanols ausgesetzt. Beim Sekundäransatz sind die avitalen Zellen aus der Peripherie bereits aus ihrer Matrix herausgelöst, was die höheren Vitalitätsgrade des zweiten Ansatzes erklärt. Ein weiterer Aspekt, der die Isolation betrifft, und eine Rolle bei der Auswahl der Zellen spielt, ist die Lage der Zellen im nativen Knorpelgewebe: Chondrozyten aus unterschiedlichen Schichten des Gelenkknorpels zeigen metabolische Unterschiede auf, die ihre ursprüngliche anatomische Lokalisation widerspiegeln. Es besteht eine Korrelation zwischen der Proteoglykansynthese *in vitro* und der Proteoglykankonzentration der die Zellen der unterschiedlichen Schichten umgebenden ursprünglichen Matrix. Isolierte Zellen aus tieferen Schichten, die *in vivo* eine höhere Konzentration von Proteoglykanen besitzen, haben ebenfalls eine ausgeprägtere proteoglykanreiche Matrixproduktion als oberflächliche Zellen [114].

4.3.2.2 Vervielfältigung und Dedifferenzierung

Erst durch die Vervielfältigung von Chondrozyten wird es möglich, aus bioptisch gewonnenen kleinen Mengen Knorpelgewebes aus nichtlasttragenden Bereichen eines Gelenkes genügend autogene Zellen für die Gewebezucht bereitzustellen, um größere chondrale Defekte behandeln zu können [17]. Da in ihre Matrix eingebettete Chondrozyten nicht in der Lage sind zu proliferieren, muss zunächst eine Isolation der Zellen stattfinden. Sie können dann in einem zweidimensionalen Kultursystem (Monolayer) vervielfältigt werden [196], so dass eine ausreichende Anzahl von Chondrozyten zur Verfügung steht. Während der Multiplikation der Zellen kommt es zur Dedifferenzierung der Zellen. Sie verlieren ihre typische runde Morphologie, adherieren am Boden des Kulturgefäßes und nehmen dabei eine fibroblastenähnliche Morphologie an (Abb. 6d) [209]. Die für hyaline Chondrozyten typische Kollagen II – Synthese wird herunterreguliert, die eher für Fibroblasten typische Kollagen I - und - III – [211] als auch die Fibronektinsynthese [212] nimmt zu. Während dieser Metamorphose, die sich innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen vollzieht, kommt es auch zu mitotischen Aktivitäten und damit zur Proliferation der Zellen.

Bei vollständig konfluent bewachsenen Böden der Zellkulturflaschen kam es bei der Trypsinierung initial zu membranartigen Ablösungen, die auf Zellinteraktionen in der Monolayerkultur zurückgeführt werden. Dieser initiale Verbund ließ sich allerdings durch die Fortsetzung der Trypsinierung fast immer vollständig aufheben. Eine Vergrößerung des zeitlichen Abstandes zwischen den Passagen führte zwar zu einer höheren Zellzahl, die anschließende Isolierung der Zellen gestaltete sich aber wegen der Zunahme der Zellinteraktionen zunehmend schwieriger. Die Zellen wurden nur dreimal passagiert, da davon ausgegangen werden muss, dass mit zunehmender Anzahl der Passagen eine potentielle Redifferenzierung zu chondrogenen Zellen abnimmt [196]. Allerdings scheint sich eine Kultivierung von Zellen in Monolayer nicht nachteilig auf die Gewebedifferenzierung nach Implantation auszuwirken: Werden sechs Tage in Monolayer kultivierte Zellen in entsprechender Zelldichte in einer Fibrinmatrix implantiert, so kann dies im Vergleich zu frisch isolierten Zellen zu einem länger anhaltenden hohen phänotypischen Differenzierungsgrad führen [55].

4.3.2.3 Dreidimensionale Orientierung und Redifferenzierung

Einige Faktoren, die sich positiv auf eine Redifferenzierung und damit auf die Chondrogenese auswirken, sind bekannt: Werden die Zellen in hoher Dichte ausgesät [213], in Zellsuspensionen bzw. in Gelen kultiviert [214], in vollständigen Chondronen isoliert [215] bzw. als so genannte „Pellets“, also zusammenhängenden Zellkonglomeraten kultiviert [209], so bleiben die für Chondrozyten typische Genexpression und Zellmorphologie überwiegend erhalten.

Nach Isolation und Multiplikation scheint insbesondere die dreidimensionale Orientierung einen erheblichen Einfluss auf die Redifferenzierung der chondrozytären Zellen zu haben. Die Zellen sind dann in der Lage ihre ursprüngliche kugelige Morphologie wieder anzunehmen. Dieser Zellmorphologie scheint eine primäre Rolle bei der Modulation des Phänotyps und der Genexpression zuzukommen [57]: Die während der Monolayerkultur herunterregulierte Syntheseleistung hyaliner Chondrozyten von typischem Kollagen Typ II und chondrotypischen Proteoglykanen wird in einer dreidimensionalen Anordnung in Agarosegel wieder hochreguliert [57]. Kulturbedingungen, die sich positiv auf den Phänotyp auswirken, scheinen sich dabei negativ auf die Vervielfältigung der Zellen auszuwirken *et vice versa* [216]. Bei zunehmender Multiplikation der Zellen nimmt das Redifferenzierungspotential ab, damit scheint eine Vermehrung *in vitro* von geeigneten Zellen für eine Transplantation limitiert [196]. Eine technisch einfache dreidimensionale Orientierung von Zellen erfolgt über das Auspolymerisieren von Gel-Zellsuspensionen. Sie sind in der Lage, sowohl Zellen als auch von ihnen neu produzierte Matrixbestandteile vor Ort zu halten [217]. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da von den Zellen nur Vorstufen der späteren Matrixbestandteile (Prokollagene, Glykosaminoglykane etc.) ausgeschleust werden und sie sich erst extrazellulär zu Fibrillen und Proteoglykanen zusammensetzen. Diese wiederum aggregieren erst anschließend untereinander zur definitiven Matrix [218]. Der Verlust von Matrixbestandteilen durch das Hinwegdiffundieren und den Austausch von Medium *in vitro* kann so auf ein Minimum reduziert werden. Beim Einsatz von Gelen erfolgen sowohl Versorgung mit Nährstoffen als auch Entsorgung von Metaboliten wie im nativen Knorpel nur *per diffusionem* [49]. Die autogene Herstellung von Fibringelen in der späteren klinischen Anwendung schließt eine Immun- bzw. Fremdkörperreaktion [197] aus, so dass die Verwendung dieses Materials nahe liegt. Bei den in den Vorversuchen durchgeführten Experimenten mit in Fi-

brin dreidimensional orientierten Zellen ohne den Einsatz von Polymervliesen zeigte sich mit zunehmender Zeit eine deutliche Höhenminderung der Knorpelphase. Wegen der im Vergleich zur Matrixneusynthese der chondrozytären Zellen zügigen Degradation von Fibrin [53], kann das ursprüngliche Volumen bei alleinigem Einsatz von Fibrin als Trägermaterial nicht gewährleistet werden. Das Ausdünnen bei zunehmender Kulturzeit der zunächst erhobenen Knorpelschicht konnte aber durch gleichzeitigen Einsatz der langsamer degradierbaren Polymervliese auf ein Minimum reduziert werden. Das Vlies stellt für die von den dreidimensional orientierten Zellen produzierten Matrix ein initiales Gerüst dar, bis genügend Matrix produziert wurde, um das benötigte Volumen der Knorpelphase selbst aufrechtzuerhalten. Zudem kann das Vlies nach der Implantation (spätere klinische Anwendung), bis zum vollständigen Ersatz durch neu gebildetes Knorpelgewebe, erforderliche biomechanische Funktionen übernehmen [219]. Im Vergleich zu den Vorversuchen, in denen zur Zellorientierung ausschließlich Fibrin verwendet wurde, war eine homogene Zellverteilung bei Einsatz von Fibrin und Polymervlies schwerer zu erreichen. Bei der Beimpfung der Vliese scheint es zu Verwirbelungen zu kommen. Gleichzeitig ist eine Interaktion der Zellen mit und damit eine dreidimensionale Orientierung an den Polymervliesfasern denkbar.

4.3.2.4 Perfusionkultur

Bei bisherigen Kulturmethode mussten Medienwechsel und Substanzzugaben in bestimmten zeitlichen Abständen durchgeführt werden. Daraus resultieren unphysiologische Schwankungen von Konzentrationen der Mediumbestandteile. Der Einfluss dieser instabilen Bedingungen auf die Funktion der Zellen sollte auf ein Minimum reduziert werden. Einen Ausweg hierzu liefern Systeme, die eine konstante Perfusion der Zellkultur gewährleisten [66]. Neben der kontinuierlichen physiologischen Versorgung der Zellen wird durch das geschlossene System eine Kontaminationsgefahr, die bei den sonst erforderlichen häufigen Medienwechseln besteht, deutlich herabgesetzt. Gleichzeitig wird verhindert, dass Metabolite und Degradationsprodukte, die potentiell zytotoxisch sind, akkumulieren. Versuche mit Chondrozyten beimpften Kollagenschwämmen haben gezeigt, dass eine Perfusionkultur, die bei den meisten Zelltypen von Vorteil zu sein scheint, für die Chondroneogenese unvorteilhaft sein kann [220]. Allerdings setzte Mizuno keine Gelkomponente ein, die die neu produzierten Matrixbestandteile hätte immobilisieren können [217]. Zusätz-

lich besteht die Möglichkeit, dass eine kontinuierliche Perfusion von 0,33ml/h [220] die extrazelluläre Aggregation von Vorstufen der Matrixbestandteile stören könnte. Die Intervallperfusion, wie sie hier eingesetzt wurde, könnte trotz des höheren Medi- umdurchsatzes (0,5ml/h) von Vorteil sein: In den 30min. andauernden Ruheinter- vallen kann die extrazelluläre Aggregation der Vorstufen gesteigert ablaufen, und so neben der Immobilisation der Gelkomponente zur intensiveren Matrixanreicherung führen. Auch wenn davon ausgegangen werden muss, dass die biomechanische Stimulation durch die Intervallschaltung der Pumpvorgänge sehr gering ist, so ist ein positiver Effekt auf die Chondroneogenese möglich [221].

4.3.2.5 Physiochemische, pharmakologische und biomechanische Stimulation

Um die Ausdifferenzierung von osteochondralem Ersatzgewebe *in vitro* und *in vivo* zu stimulieren kann neben dem Einsatz unterschiedlicher Biomaterialien, Zellpräpa- rationen und Kulturtechniken zusätzlich eine physiochemische, pharmakologische bzw. biomechanische Stimulation der Zellen im Sinne einer gerichteten chondro- bzw. osteogenen Differenzierung erfolgen. Diese Stimulation erfolgt physiologisch während der Ontogenese und kann neben der biomechanischen Stimulation teil- weise unter Einsatz bestimmter Faktoren, die als Serumbestandteile, Wachstums- faktoren und Cytokine identifiziert werden können, nachvollzogen werden. Dazu ge- hören Fibronectin [222], Insulinlike Growthfactor-1 (IGF) [222,223], Transforming Growth Factor β (TGF- β) [223], Fibroblast Growthfactor (FGF) [224], Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) [146], die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und viele weitere. Da es sich um ein mehrphasiges Gewebe handelt, muss entsprechend eine unterschiedliche Stimulation für eine chondro- bzw. osteogene Differenzierung erfol- gen. Schon die mannigfaltigen physiochemischen Bedingungen wie unterschiedliche Konzentrationen von Mediatoren und gelösten Gasen im Medium während des *Tis- sue Engineerings* haben entscheidenden Einfluss auf die Gewebedifferenzierung. Parameter, deren Effekt auf die Differenzierung bekannt sind, umfassen z.B. den Sauerstoffpartialdruck [12,18,22,225] (Knorpel besitzt im Gegensatz zum Knochen einen anaeroben Metabolismus und ist nicht vaskularisiert [1]) und die Konzentratio- nen verschiedener Vitamine (z.B. Ascorbinsäure) [226], Aminosäuren und Spurene- lemente. Ein weiterer Faktor, der die Ausdifferenzierung von osteochondralem Ge- webe beeinflusst, stellt die biomechanische Stimulation dar. Für den Erhalt von Knorpel und Knochengewebe *in vivo* ist eine biomechanische Belastung erforderlich,

da ansonsten eine Degeneration des Gewebes erfolgt [73]. Sie gewährleistet einen Nährstoff- und Metabolittransport durch das unvaskularisierte, auf Diffusion angewiesene Gewebe [227]. Zell-Matrix Interaktion (mechanisch oder rezeptorvermittelt) und physiochemische Effekte (z.B. Na^+ -Konzentration, pH) scheinen eine wichtige Rolle bei der biosynthetischen Antwort der Zellen auf Kompression zu spielen [58].

In dieser Studie wurde bewusst auf die biomechanische Stimulation verzichtet, um nicht zu viele Variablen zu erzeugen. Sie wird aber insbesondere für das *Tissue Engineering* zunehmend ein Werkzeug darstellen, das die Gewebequalität durch entsprechende Differenzierung und Nährstoffversorgung deutlich verbessern wird. Gleichzeitig stellt sie allerdings auch eine Herausforderung an die verwendeten Biomaterialien dar, da diese der biomechanischen Belastung bis zum vollständigen Ersatz durch natives Gewebe standhalten müssen und es nicht zu einer Insuffizienz des Implantates oder seines Interfaces zum umgebenden Gewebe kommen darf.

4.4 Implantat-Eigenschaften und Gewebeerscheinung

Eine Züchtung von chondrogenem Gewebe auf degradierbaren subchondralen Implantaten ist grundsätzlich möglich. Für eine spätere klinische Anwendung ist neben der Wiederherstellung der knorpeligen Gelenkfläche eine biomechanisch stabile Verankerung des Gewebes erforderlich. Die Knochenphase muss also – in sich stabil – eine feste Verbindung zur Knorpelphase, als auch zum umgebenden Knochen haben. Die Knochenneubildung sollte der Degradation vorausgehen, damit es nicht zu einer Lockerung kommt. Während sich die Gewebeerscheinung der knorpeligen Phase als unabhängig vom Material der Knochenphase herausstellte, waren Interfaceigenschaften und Implantationsfähigkeit direkt vom Trägermaterial abhängig.

4.4.1 Knochenphase (Biomaterialträger)

Die beiden Kalziumkarbonate zeigten über die verschiedenen Kulturzeiten bis zu 84 d keine auffällige Materialermüdung in der manuellen Prüfung, so dass bei einer später erforderlichen und geplanten Kulturzeit von 3-4 Wochen von implantations- und im subchondralen Knochen verankerungsfähigen Materialien ausgegangen werden kann. Eine Perfusionskultur über diesen Zeitraum scheint in Anbetracht der Gewebeerscheinung der Knorpelphase sinnvoll, auch wenn Autoren anderer Untersuchungen bereits nach 2-3 Wochen von einer Sicherung der mechanischen Integrität des gezüchteten Knorpelgewebes durch bis dahin gebildete ECM ausgehen

[202]. Das bestehende Interface zeigte sich als stabil. Allerdings ist es fraglich, ob die Fixation zwischen Knorpel- und Knochenphase durch Fibrin und durch von den im Interface liegenden Zellen neuproduzierte Matrix [29] ausreicht, um den physiologischen biomechanischen Belastungen nach Implantation im Gelenk standzuhalten. Ein stabileres Interface findet sich in jedem Fall bei KPZ II [61], bei dem es auch nach den langen Kulturzeiten in keinem Fall zu einer Lockerung der inkorporierten Vliesfasern kam und so neben der Fibrin- und Matrixstabilisierung der Kalziumkarbonate ein zusätzlicher Stabilitätsfaktor besteht (Abb. 24). Im Vergleich dazu führt die Auflockerung des KPZ I im Bereich der inkorporierten Vliesfasern, die auf eine erhöhte Penetration des Mediums bei einer grobkörnigeren Struktur (Mikroporosität) im Vergleich zu KPZ II zurückzuführen ist, zu einer Insuffizienz des Interfaces. Dies kann auf eine erhöhte Degradation der Polymervliesfasern zurückgeführt werden (Abb. 23). Eine Kompensation der Stabilisierung über Fibrin- und Matrixbestandteile kann nicht stattfinden, da sich die Insuffizienz nicht im Bereich der Knorpelphase sondern im Trägermaterial befindet. Von der Implantationsfähigkeit beider KPZ (nur Knochenphase) nach Kultur kann ausgegangen werden. Auch wenn das KPZ II in der manuellen Prüfung als in sich stabiler und homogener wirkt, konnte ebenfalls keine Erweichung des KPZ I beobachtet werden, während der Kalziumsulfat-TCP-Träger bereits nach 1 Woche Perfusionskultur nur noch eine pastenartige Konsistenz besaß. Somit lag neben einer Interfaceinsuffizienz aufgrund der veränderten Materialeigenschaften eine Insuffizienz des Materials vor. Eine Implantation in einem biomechanisch belasteten Gelenkareal ist damit undenkbar.

Bezüglich der Zellverträglichkeit konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den eingesetzten Biomaterialien der Knochenphase beobachtet werden, was für eine gute Biokompatibilität der Trägermaterialien und deren Degradationsprodukte unter Perfusionskultur spricht [60]. An allen Trägermaterialien konnten adherierende Zellen beobachtet werden, die von metachromatisch anfärbbarer Matrix umgeben waren, was eine direkte Matrixapposition auf der Materialoberfläche vermuten lässt. Zum Beispiel wurden an der Seite eines Trägers (KPZ II) vitale Zellen in einer Pore gefunden, die vermutlich durch einen Lufteinschluss bei der Herstellung des Implantates entstanden war (Abb. 21c). Es ist zu vermuten, dass sich diese Zellen in unmittelbarer Nähe des KPZ II durch Zellteilung vermehrt haben, und das chemische Milieu in diesem Bereich keinen negativen Effekt auf die Vitalität chondrozytärer Zel-

len zu haben scheint. Die rötliche Teilanfärbung des KPZ II im Verlauf der Perfusionskultur ist höchstwahrscheinlich auf eine Einlagerung des Phenolrots, das als pH-Anzeige für Mediumveränderungen dient, zurückzuführen. Die Einlagerung des Farbstoffs nur im vliesfreien Bereich des KPZ II spricht für unterschiedliche chemische Eigenschaften beider KPZ (Abb. 16).

4.4.2 Knorpelphase

Sowohl die makroskopische als auch die mikroskopische Gewebeerscheinung der Knorpelphasen zeigte sich als unabhängig vom Trägermaterial der Knochenphase. Unter Perfusionskultur scheinen die verschiedenen Substanzen und deren Degradationsprodukte keinen nennenswerten Einfluss auf die Gewebedifferenzierung der Knorpelphase zu haben, was auf das Metabolitgleichgewicht durch den konstanten Mediaustausch im Rahmen der Perfusionskultur zurückgeführt werden kann [66]. Es zeigten sich überwiegend gleichmäßig verteilte vitale Zellen rundlicher Morphologie, was für eine Redifferenzierung der Zellen spricht [57]. Mit zunehmender Kulturzeit wurden Matrixbestandteile produziert, die als ECM aggregierten und metachromatisch anfärbbar sind. Diese Metachromasie konnte nicht nur in den biomaterialfreien Arealen beobachtet werden, sondern auch in unmittelbarer Nähe der Polymervliesfasern und an den Trägermaterialoberflächen (Abb.19), so dass von einer direkten An- bzw. Auflagerung von Matrix auf das Trägermaterial ausgegangen werden kann. Dies unterstreicht sowohl die bekannte Biokompatibilität der Polymervliese [204,207] und der verschiedenen Trägermaterialien [43,64,65,163,176] als auch die Stabilisierung des Interfaces durch dort mit den Biomaterialien in Verbindung stehenden Matrixbestandteilen.

Eine überwiegend gleichmäßige Verteilung der redifferenzierten und Matrix produzierenden in Fibrin eingebetteten Zellen konnte, wie auch in anderen Untersuchungen [53,217], in Abhängigkeit von der Kulturzeit in allen Präparaten beobachtet werden. Auch die in der Literatur beschriebene schnelle Degradation [53] konnte zum Teil nachvollzogen werden. Bei gleicher Zelldichte in allen Präparationen und von der Kulturzeit unabhängigen Ungleichheiten der Degradationsgeschwindigkeiten schießen diese von der FCS-Charge abhängig zu sein, so dass unterschiedliche Konzentrationen von fibrinolytischen Enzymen bzw. deren Inhibitoren in den entsprechenden Chargen denkbar wären. Eine stetige Zunahme von metachromatisch anfärbbarer

Matrix konnte in allen Präparaten während der gesamten Kulturzeit beobachtet werden, wobei nach der vierten Woche nur noch ein geringer Matrixzuwachs im Vergleich zum graduellen Fortschreiten der Vliesdegradation beobachtet werden konnte. Wegen der weiteren Zunahme der Matrix in Woche drei und vier scheint ein möglicher Implantationszeitpunkt in der späteren klinischen Anwendung nach Abschluss der vierten Woche zu liegen, auch wenn nach 2-3 Wochen schon die bis dahin gebildete ECM die mechanische Integrität des gezüchteten Knorpelgewebes sichern soll [202].

Die aus dicht übereinanderliegenden fibroblastenähnlichen Zellen und deren Matrix bestehende oberflächliche Schicht der Transplantate (Abb. 21d) wies histomorphologisch eine gewisse Ähnlichkeit zur Zona superficialis von nativem Gelenkknorpel auf: Dort sind die Zellen ebenfalls fibroblastenartig abgeflacht und lang gestreckt und liegen in mehreren Zellschichten übereinander [1]. Dieses Phänomen könnte mehrere Ursachen haben: Zum einen könnte die Methode der Zellaussaat und der Fixierung mit verdünntem Thrombin zu einer Erhöhung der Zelldichte in den oberflächlichen Schichten führen. Zum anderen scheint die Umspülung der Knorpelphasen-Oberfläche mit Medium (im Rahmen der Perfusionskultur) zu einer schnelleren Degradation der Fibrinanteile zu führen. Eine minimale biomechanisch-rheologische Stimulation durch intermittierend einsetzende Pumpvorgänge kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden [221]. Zum Teil in Nestern liegende Zellen (Abb. 22) wurden in vielen Präparaten gefunden und können als ein Hinweis für eine Regeneration des Gewebes gesehen werden [54]. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen schien die Anordnung der filamentären Strukturen der von den Zellen produzierten ECM chaotisch. Die Querstreifung der Fibrillen war nur angedeutet, wie es typisch für Kollagenfibrillen des embryonalen Knorpels ist. Bei den nadel- bzw. fadenförmigen Strukturen könnte es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Hyaluronsäuremoleküle handeln, bei den runden kleineren dichten schwarzen um Proteoglykangranula (Abb. 25). Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Oberfläche weist deutliche Ähnlichkeit mit der Oberfläche nativen Knorpelgewebes auf (Abb. 26) [228].

In allen Präparaten wurden vereinzelt avitale Zellen bzw. deren Überreste gefunden. Diese Zellen stammen von dem bei der letzten Trypsinierung bestimmten Prozentsatz avitaler Zellen. Zum anderen muss davon ausgegangen werden, dass sich be-

reits im Zelluntergang befindliche Zellen in der Trypanblaufärbung nach wie vor als vital darstellen, und dann erst im Verlauf der Perfusionskultur zu Grunde gehen.