

1 Einleitung

1.1 Hyaliner Knorpel

1.1.1 Allgemeines

In der Beschaffenheit und Funktionalität des humanen Skelett- und Stützsystems spielt der hyaline Knorpel eine herausragende Rolle. Von den verschiedenen Knorpelarten, welche im humanen Organismus vorkommen, überwiegt hyaliner Knorpel. Die Eigenschaften hyalinen Knorpels beruhen auf einer besonderen Morphologie der Chondrozyten und der Produktion extrazellulärer Matrix. Durch den aufrechten Gang des Menschen ist die Belastung des Knorpelgewebes sehr hoch und führt häufig zu degenerativen Erkrankungen des Gelenks und einer Zerstörung der Architektur des Knorpelgewebes⁸¹. An Stellen des Knorpels mit sehr hohen Kräften zeigen kollagene Fasern besonders präzise und stetige Orientierungen, was die hohe Widerstandsfähigkeit und Zugfestigkeit erklärt⁸. Es handelt sich bei Knorpel um gefäßfreies Gewebe. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion mit Hilfe der in der Gelenkhöhle vorhandenen Synovia.

1.1.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre faserige Matrix entspricht beim Knorpel bis zu 98 % des gesamten Gewebes¹¹⁶. Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels sind vorwiegend Kollagene und Proteoglykane. Zu 90 % besteht hyaliner Knorpel aus Typ II Kollagen und geringen Mengen Typ III, VI, IX und XI Kollagen. An Glykosaminoglykanen findet man Chondroitin-4-Sulfat und Keratansulfat im Knorpel¹¹. Die besondere Druckfestigkeit des Gewebes wird durch die Struktur dieser Matrix und insbesondere durch die hohe Wasserbindungskapazität von Glykosaminoglykanen ermöglicht¹¹⁹. Knorpel besteht zu etwa 15 – 25 % seines Trockengewichtes aus Kollagen Typ II⁸⁶. Eine biochemische Besonderheit dieses Kollagenmoleküls ist dessen Aufbau aus drei identischen $\alpha 1(\text{II})$ Ketten. Die Primärstruktur dieser α -Ketten besteht häufig aus dem Triplett Glyzin (33,5 %), Prolin (12 %) und Hydroxyprolin (10 %)⁶⁰. Kollagen Typ X wird nur in hypertrophen Chondrozyten gebildet, die für die Kalzifizierung bestimmt sind^{70; 109}. Dieses Kollagen besteht aus drei identischen $\alpha 1(\text{X})$ Ketten. Darüber hinaus ist dieses Kollagen in der Lage, Kalziumionen zu binden, und begünstigt dadurch offenbar Kalkeinlagerungen im Knorpel bei der Ossifikation⁶⁴. Die

Kollagentypen IX und XI sind typisch für Knorpelgewebe. Im Vergleich zu Kollagen Typ II kommen sie jedoch nur in sehr geringen Mengen vor. Kollagen Typ IX kann selbst keine Fibrillen bilden, ist aber quervernetzt mit Typ II Kollagenfibrillen³⁵. Eine Besonderheit ist die große N-terminale globuläre Domäne. Bei humoralen Immunreaktivitäten bei Knorpeltransplantationen¹⁷ ist sie möglicherweise ein Angriffspunkt. Beim Kollagen Typ XI, welches zusammen mit Kollagen Typ II gefunden wird, handelt es sich vermutlich um einen integralen Bestandteil der Typ II Fibrillen⁸³. Demnach handelt es sich bei den Fibrillen des Knorpelgewebes um ein Gemisch aus Typ II, Typ IX und Typ XI Kollagen. Die Glykosaminoglykane Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat erhöhen die Bildung von Kristallisationskernen des Kollagens. An den einzelnen Kollagenmolekülen finden sich in periodischen Abständen von 67 nm hydrophobe und geladene Aminosäuren. Daher entsteht eine gestaffelte Anordnung in einer Periodizität von 67 nm in den Kollagenfibrillen, welche sich im Elektronenmikroskop in Form einer Querstreifung darstellt⁶⁰. Um die spezifischen Eigenschaften der Kollagenfasern zu erhalten erfordert die Kollagensynthese eine strenge Kontrolle hinsichtlich des Kollagentyps, der Menge und der Qualität der einzelnen Kollagenmoleküle⁹³. Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix sind Proteoglykane und Hyaluronsäure⁷⁴. Die Proteoglykane sind jeweils aus einem Kernprotein und über 100 Glykosaminoglykanen aufgebaut. Sie sind meist wesentlich größer und haben einen höheren Kohlenhydratanteil (90 – 95 %) als Glykoproteine. Die Glykosaminoglykane sind an Proteinkerne gebunden und bilden Proteoglykane. Über nichtkovalente Bindungen an die langkettige Hyaluronsäure können diese Aggregate mit Molekulargewichten von über 100 Millionen bilden (Aggrecan) (Abb. 1). Die unzählige Vielfalt der Proteoglykane ist durch die Unterschiede in Proteingehalt, Molekülgröße sowie Anzahl und Typ der Glykosaminoglykane begründet. Es werden nicht sofort stabile Aggregate aus den neu synthetisierten Proteoglykanen geformt, diese „reifen“ erst einige Zeit, bevor sich stabile Strukturen bilden⁷. Die Aggregation schränkt die Beweglichkeit innerhalb des Fasernetzwerks ein und sorgt für eine hohe Konzentration im Gewebe⁴⁸. Die Proteoglykanmoleküle des Knorpelgewebes beinhalten jeweils ca. 80 Chondroitin-4-Sulfatketten, 100 Keratansulfatketten und ca. 60 Oligosaccharide⁷⁷. Das Kernprotein besteht aus etwa 2000 Aminosäuren. Beim Chondroitin-4-Sulfat und Keratansulfat handelt es sich um unverzweigte Disaccharidketten. Das Disaccharid des Chondroitin-4-Sulfats besteht aus D-

Glukuronsäure und N-Acetyl-DGalaktosamin, das Disaccharid des Keratansulfats aus D-Galaktose und N-Acetyl-D-Glukosamin. Mit Hilfe von Linkproteinen binden die Proteoglykane an die Hyaluronsäure, welche wiederum über das CD44 Glykoprotein an die Zelle binden kann ⁴. Durch das Fehlen dieser Linkproteine wären die Aggregate kleiner und weniger stabil ⁹⁰.

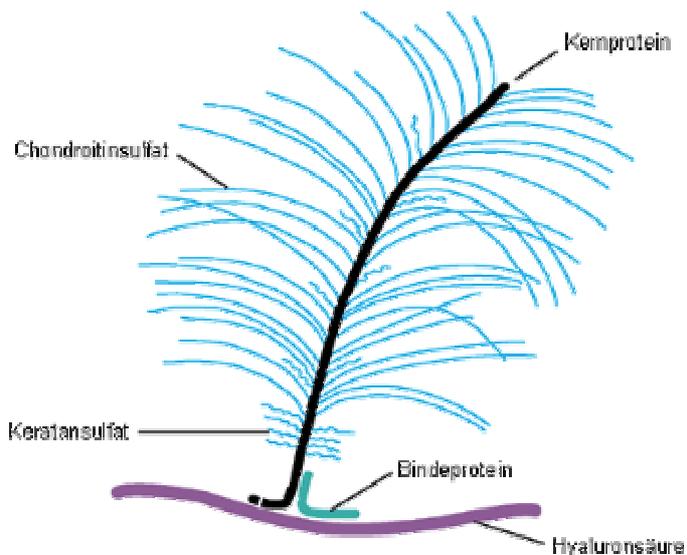


Abb.1 Proteoglykan-Hyaluron-Aggregat im Knorpelgewebe (Aggrecan)

1.1.3 Differenzierung und Dedifferenzierung von Knorpelgewebe

In ihrer Gestalt ähneln die mesenchymalen Vorläuferzellen der Chondrozyten den Fibroblasten und synthetisieren Typ I und Typ III Kollagen, Fibronectin und knorpelspezifische Proteoglykane ²⁸. Mit einer starken mRNA Synthese für Kollagen Typ II zeigt sich zunächst die Differenzierung der Chondroblasten. Im extrazellulären Raum werden große Mengen dieses Kollagentyps abgelagert und trennen langsam die Zellen bzw. Chondrone räumlich voneinander, während allmählich Kollagen Typ I und Fibronectin verschwinden. In der Entwicklungslinie ist ein weiteres Stadium durch hypertrophe Chondrozyten ⁹⁶ gekennzeichnet. In dieser Phase der Hypertrophie nimmt die Kollagen Typ II Synthese ab, stattdessen findet man vermehrt Kollagen Typ I. Über den Differenzierungsgrad lässt sich also anhand des Kollagen-Phänotyps eine zuverlässige Aussage treffen. Im Knorpelgewebe der Gelenke sind die Chondrozyten in ihrem Entwicklungsverlauf fixiert und zeigen deshalb nur eine sehr geringe Stoffwechselaktivität und kaum Zellteilung. In den Monolayer-Kulturen zeigt sich ein

anderes Verhalten. In Kultur erweist sich der Phänotyp der Chondrozyten als sehr instabil. Innerhalb kürzester Zeit verlieren die Zellen ihre normale runde Form und gleichen morphologisch Fibroblasten. Auch die typischen Eigenschaften der Knorpelzellen, die Synthese von Kollagen Typ II¹⁰, verlieren sie. Die Zellen produzieren stattdessen die untypischen Kollagene Typ I und Typ III und Fibronectin²⁷. Knorpelzellen, die sich derart in vitro verändert haben, bezeichnet man im Allgemeinen als dedifferenzierte Chondrozyten (engl. Fibroblast like cells). Dieser Dedifferenzierungsprozess kann durch eine Reihe von Faktoren beschleunigt oder induziert werden, insbesondere durch Fibronectin, Vit. A und Interleukin-1^{41;49;127}. Den phänotypischen Veränderungen kann aber auch mittels geeigneter Kulturbedingungen entgegengewirkt werden. Wenn die Chondrozyten in einem Gel, z. B. aus Agarose oder Kollagen, kultiviert werden bleibt die Synthese von Kollagen Typ II über lange Zeit erhalten^{53;63}.

1.1.4 Heilung und Regeneration von Knorpel

Bei beschädigtem Gelenkknorpel ist das Potenzial zur Regeneration sehr limitiert, Defekte größer als 2 - 4 mm im Durchmesser heilen selten⁵⁶. Im Falle einer Verletzung des Knorpels proliferieren die Zellen des Perichondriums, die zur Läsion migrieren und sie ausfüllen. Eine Metaplasie dieser Mesenchymzellen zu Chondrozyten findet aber nur sehr langsam und in sehr geringem Umfang statt. Um beschädigten oder untergegangenen Gelenkknorpel zu behandeln, gibt es vier Möglichkeiten: Wiederherstellen, Ersetzen, Entlasten oder Entfernen. Die Wiederherstellung des Knorpels schließt die Oberfläche, die hyaline Struktur und den subchondralen Knochen mit ein. Ihn zu ersetzen kann mit Hilfe von Transplantaten oder Prothesen erreicht werden. Mittels einer Osteotomie wird die Gelenkoberfläche entlastet und der Stress auf sie sinkt³. Mit Hilfe zweier Strategien kann die Wiederherstellung erreicht werden: einmal durch Steigerung der intrinsischen Kapazität des Knorpels oder alternativ durch Regenerieren einer neuen Gelenkoberfläche durch das Transplantieren von Chondrozyten, chondrogenen Zellen oder Geweben, die das Potenzial zur Bildung neuen Knorpels haben. Durch Rekrutierung von pluripotenten Zellen aus dem Knochenmark, die durch den subchondralen Knochen wandern, oder durch mechanische, elektrische, durch Laser oder andere Stimuli kann eine Steigerung der intrinsischen Heilung erzeugt werden^{62;75;102}. Aktuell gibt es Untersuchungen über den

Einsatz von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Die einfache Injektion solcher Faktoren führt aber auch zu Komplikationen wie Osteophytenbildung und Synovitis, induziert durch TGF- β 1 und TGF- β 2^{33;122}. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von Gerüsten und Materialien, welche mit Wachstumsfaktoren oder Zellen beladen sind¹⁰⁰, um gezielt den Defekt zu behandeln. So erzielten z. B. Gelenkplastiken, welche mit Hilfe von Periost-Transplantaten in den subchondralen Knochen von Kaninchen durchgeführt worden sind, eine gute Wiederherstellung der Defekte⁹⁵. Das Periost enthält pluripotente mesenchymale Stammzellen mit dem Potenzial entweder Knochen oder Knorpel zu bilden. Weil es als ganzes Gewebe transplantiert werden kann, besteht die Möglichkeit, seine eigene Matrix als Träger für andere Zellen und Wachstumsfaktoren zu benutzen⁹⁴. Ebenso wurden Erfolge mit perichondralen Transplantaten erzielt⁵².

1.2 Knochenzemente

Die Möglichkeit, Knochendefekte mit einem plastisch formbaren und in situ aushärtenden Material auszufüllen, wurde schon 1893 von Stachow untersucht¹¹⁵. Im Tierversuch testete er die Auffüllung von Knochendefekten unter anderem mit Gips, geschmolzenem Zinn, Gutapercha-Zahnkitt und Kupferamalgam. Über den erfolgreichen Einsatz von „Gips als Plombenmaterial“ beim Menschen wurde 1925 von S. Kofmann berichtet⁶⁵. Schließlich wurden auch Kunststoffe aus Polymethylmetacrylat (PMMA) für die Verankerung von Gelenkimplantaten und zur Auffüllung von großen Knochendefekten entwickelt⁸⁷. Jedoch waren die Ergebnisse unbefriedigend, da es zu einer bindegewebigen Abgrenzung des PMMA vom Knochen kommt, welche auf die jahrelange Auslaugung des PMMA zurückzuführen ist.

Ein idealer Zement, wie z. B. Kalziumphosphatzement, muss primär eine gute Verbindung mit dem umgebenden Knochen eingehen, um dann nach partieller Degradation vom Knochen durchbaut zu werden, um eine Lockerung zu vermeiden. Vor diesem Hintergrund wurden in der Vergangenheit ionomäre Zemente getestet, von welchen man eine deutlich bessere Knochen-Zement-Verbindung erwartete²³. Schon im Jahre 1975 berichteten Brown und Chow¹⁶ von ersten erfolgreichen Versuchen mit in vivo aushärtendem Calciumphosphatzement (CPC) und meldeten diesen im Jahre 1985 zum Patent an¹⁵. Bei ihren Versuchen mischten sie Dicalciumphosphatdihydrat (DCPD) mit Tetracalciumphosphat (TTCP) und Dicalciumphosphat (DCP), TTCP und Hydroxylapatit (HA). Das Endprodukt ähnelte einem Apatit. Ebenfalls 1985 stellte

Lemaitre⁷³ zusammen mit seiner Arbeitsgruppe einen Dicalciumphosphatdihydratzement (DCPDC) her, indem er α -Tricalciumphosphat (α -TCP) mit Monocalciumphosphatmonohydrat (MCPM) mischte. Etwa in der gleichen Zeit begann Constantz²⁴ Versuche mit über 1000 verschiedenen Calciumphosphatmischungen und stellte schließlich eine Mischung aus Monocalciumphosphatmonohydrat (MCPM), α -Tricalciumphosphat (α -TCP) und Calciumcarbonat her. Unter Titration mit wasserfreier Phosphorsäure und Natriumphosphatlösung entstand so eine Paste, welche ca. 5 min Verarbeitungszeit benötigt und unter physiologischen Temperaturen und pH aushärtet. Plasmaspektrometrisch wurde gezeigt, dass es sich um ein teilcarbonisiertes Hydroxyapatit (Dahllit) handelt, eine Kristallisationsform, wie sie im menschlichen Knochen vorkommt. Dieser Zement ist seit 1997 unter dem Namen Norian SRS (skeletal repair system)/ CRS (craniofacial repair system) auf dem deutschen Markt.

1.2.1 Anforderungen an resorbierbare Knochenzemente

Nach den Problemen, die sich aus der Übertragung viraler Erkrankungen bei allogener Knochentransplantation ergeben^{23;39;44}, sollte ein solcher Zement frei von organischen, menschlichen oder tierischen Bestandteilen sein, er sollte vollständig synthetisch hergestellt sein. Die Substanz sollte keine antigenen Eigenschaften haben, sie darf nachweislich nicht kanzerogen sein und sie muss voll resorbierbar sein. Bei der Resorption ist es wichtig dass diese ohne erhebliche zelluläre Reaktionen und ohne chronische Entzündungsreaktionen ablaufen. Ebenso ist es wünschenswert, dass der Verlust an mechanischer Stabilität während der Resorptionszeit umgekehrt proportional dem Stabilitätsgewinn durch Aufbau körpereigenen Knochens geschieht. Bei vollständiger Resorption des Zementes sollte ein vollständiges Auffüllen des ursprünglichen Defektes durch neu gebildeten Knochen erfolgt sein. Der Knochenzement sollte durch seine Eigenschaften eine sterile Verarbeitung im Operationssaal ermöglichen. Nach dem Anmischen sollte der Zement eine pastenartige Konsistenz haben, und um ein möglichst optimales Handling zu erreichen sollte die Verarbeitungszeit (Zeit vom Anmischen bis zum Beginn der Aushärtung) in einer Größenordnung von 10 - 20 min liegen. Die Aushärtungszeit muss reproduzierbar sein und sollte konstant bei Körpertemperatur stattfinden. Die Aushärtung sollte pH-neutral geschehen. Die mechanischen Eigenschaften des Knochenzementes sollten denen des

gesunden Knochens ähnlich sein.

1.2.2 Calciumphosphatzemente

Bei der Entwicklung von Knochenzementen lag das Interesse bisher bei Substanzen, welche im menschlichen Knochen vorkommen²⁵. Im menschlichen Knochen finden sich an anorganischen Materialien Calciumphosphatapatite mit geringen Anteilen von Natrium, Magnesium, Fluoriden und anderen Spurenelementen. Demnach sind Calciumphosphate natürliche, im Menschen vorkommende und am Stoffwechsel teilnehmende Substanzen. Sie sind synthetisch herzustellen und nicht allergen. Seitdem Brown und Chow in vivo aushärtende Calciumphosphatzemente zum Patent angemeldet haben, wurden zahlreiche verschiedene Zusammensetzungen untersucht^{30;29}. Trotz der großen Zahl an Kompositionen von Calciumphosphatzementen gibt es nur drei verschiedene Endprodukte an Calciumphosphatzementen. Es sind Apatit (PHA)(α -BSM, Bonesource, Cementek, Mimix, Biopex, Fracture Grout), als Brushite (DCPD)(chronOs Injekt) oder als amorphes Calciumphosphat (ACP) (Norian CRS, Norian SRS).

1.3 Tissue Engineering

1.3.1 Definition

Unter Tissue Engineering versteht man die In-vitro-Herstellung von Gewebe. Die Gewebetechnologie stellt die Anwendung der Technik und der Naturwissenschaften in Richtung des grundlegenden Verständnisses von Struktur-Funktion-Beziehungen normaler und pathologisch veränderter Gewebe und die Entwicklung von biologischen Substituten dar, um Gewebefunktionen wiederherzustellen, aufrechtzuerhalten oder zu verbessern²⁶.

In den vergangenen Jahren hat das noch junge Forschungsgebiet Tissue Engineering sehr an Bedeutung gewonnen. Es funktioniert aufgrund der interdisziplinären Zusammenarbeit der Bereiche Biomaterialforschung, Zellbiologie, Zellkulturtechnik und verschiedenen medizinischen Fachrichtungen. Es bestand in der Medizin zu jeder Zeit der Wunsch nach Ersatzmaterialien, um die unterschiedlichsten Defekte zu versorgen. Eines der häufigsten, aber auch kostenintensivsten Probleme des Gesundheitssystems ist der Verlust oder der Ausfall von Organen. Der Mangel an Spenderorganen und Spendergeweben, die sehr hohen Kosten, die Nebenwirkungen der Immunsuppression, aber auch die Morbidität der Spenderregion sind große Herausforderungen und schränken bis heute die Organ- und Gewebstransplantation ein. Viele Ärzte erkannten die Unzulänglichkeiten dieser Therapieformen und suchten über die Grenzen der klassischen Transplantation nach Lösungen. Implantierbare Prothesen oder die Verwendung von apparativ-mechanischem Ersatz können nicht oder nur teilweise die Funktionen des spezialisierten Gewebes oder Organs ersetzen. Daher wird in der heutigen Zeit sehr intensiv an der In-vitro-Herstellung von fast allen menschlichen Geweben geforscht. Ein organisches autologes Ersatzmaterial, welches mit Hilfe des Tissue Engineerings hergestellt wird, könnte in der Zukunft eine Lösung darstellen. Schon heute bietet die autologe Chondrozytentransplantation eine Alternative zu konservativen Methoden¹⁴.

1.3.2 Zellkulturtechnik

Die Zellkulturtechnik hat es als Ziel, geeignete Umgebungsbedingungen für Zellen herzustellen, um die Zellaktivität, das Zellwachstum und die Zellfunktion *in vitro* zu erhalten. Schon sehr früh postulierte Virchow für jede Zelle ein eigenes Wachstum falls sie unter bestimmten äußeren Bedingungen vom Zellverband getrennt werden würde¹²³. Im Jahre 1898 konnte Ljunggren Hautstücke in Flüssigkeit am Leben erhalten⁷⁶. Die Züchtung von Zellen auf einem Glasträger gelang 1912 Carrel²¹. Mit der Weiterentwicklung der Zell- und Gewebekultur, aber auch der Organkultur tauchten schnell Fragen zu der Zusammensetzung des die Zellen umgebenden Mediums auf. Trotz der frühen Versuche im Bereich der Zell- und Gewebekultur setzte sich erst in den 50er Jahren die Formulierung „Nährmedium“ durch, bei welchem es sich um eine definierte Zusammensetzung aus Salzen, Nährstoffen, Aminosäuren und Vitaminen handelte, welche als Zusatz meist Serum benötigte. 1965 gelang Ham⁴⁶ die Herstellung eines serumfreien Mediums für Säugerzellen mit Hilfe der Ham's F12 Zusammensetzung. Alle Medien enthalten die essenziellen Aminosäuren, meist werden aber auch die nichtessenziellen zugesetzt. Die wichtigsten Salzionen sind Na^+ , K^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} und HCO_3^- . In der heutigen Zeit werden zahlreiche Nährmedien für unterschiedliche Zellarten kommerziell vertrieben. Auch bei den Kulturmethoden hat sich seit den ersten Versuchen der Zell- und Gewebekultur viel entwickelt. Die am weitaus häufigsten verwendete Kulturmethode für humane aber, auch animale Zellen ist die Monolayerkultur in Polystyrenflaschen. Bei der Monolayerkultur haften die meisten Zelltypen innerhalb eines Tages am hydrophoben Flaschenboden an und beginnen mit ihrem Wachstum. Es wurden allerdings auch viele andere Kulturmethoden entwickelt, z. B. Suspensions-, Organ-, Schwamm-, Roller-, Mikroträger- und Perfusionskultur^{46;71;72;78;118}. Bei der Zell- und Gewebekultur gibt es mehrere Bedingungen, welche erfüllt sein sollten, um ein möglichst optimales Ergebnis zu erzielen. So gilt es, Temperatur, Kohlendioxid- und Sauerstoffgas und den pH-Wert für die Zellen zu optimieren. Die Temperatureinstellung richtet sich nach der Körpertemperatur des Tieres, von welchem die Zellen stammen. Bei humanen Zellen liegt die Temperatur bei 36,5 °C. Der Inkubator sollte allerdings sicherheitshalber in der Temperatur etwas niedriger eingestellt sein, dies stellt in der Praxis auch kein größeres Problem dar, weil Zellen niedrigere Temperaturen recht gut tolerieren können. Die meisten Zellen reagieren allerdings sehr empfindlich auf eine Temperaturerhöhung.

Eine Temperatur von 39,5°C vertragen sie nur für wenige Stunden, und ab 40°C sterben die meisten Zellen rasch ab³⁸. Bei einer niedrigen Zelldichte wird eine CO₂-Atmosphäre gebraucht. Auf die Zugabe von CO₂ kann bei höheren Zelldichten verzichtet werden, wenn ein geeignetes Puffersystem (z. B. HEPES) verwendet wird⁵⁹. Bei dem Sauerstoffbedarf gibt es Unterschiede bei den einzelnen Kulturen. Die Mehrheit benötigt atmosphärischen oder etwas erniedrigten Sauerstoffdruck⁶. Ein pH-Wert von 7,4 ist für Zellkulturen bestens geeignet, allerdings werden für manche Kulturen leichte Abweichungen empfohlen, so z. B. ein pH-Wert von 7,6 für Knorpelzellen. Um den pH-Wert im Kulturmedium leicht überprüfen zu können bedient man sich des Indikators Phenolrot. In der Zellkultur wird trotz der relativ schwachen Pufferkapazität am häufigsten Bikarbonat zur Pufferung eingesetzt. Erheblich stärker in der Pufferung sind Good's Puffer⁴² (z. B. HEPES oder Tricin).

1.3.3 Tissue Engineering chondraler Gewebe

Knorpelgewebe eignet sich aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften äußerst gut für das Tissue Engineering und für die Zellkultur. Da sich im nativen Gewebe die Chondrozyten in einem arretierten Zustand befinden, ist ihr Stoffwechsel nicht sehr hoch. Da keine Gefäßversorgung des Knorpels vorliegt, ist ihr Sauerstoffbedarf ebenfalls gering. Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, Zellen und Gewebe zu transplantieren. Beide haben Vor- und Nachteile. Allogene Knorpeltransplantate sind mit teilweiseem Erfolg in Kaninchen getestet worden^{36;126}. Allerdings besteht immer die Gefahr der Abstoßung. Das Tissue Engineering zielt darauf ab, Zellen aus ihrer Matrix herauszuisolieren und danach in Monolayerkultur zu vermehren. Das Ziel danach ist, ein Transplantat herzustellen, welches sich gut weiterverarbeiten und operativ einsetzen lässt. Chondrozytentransplantationen, die nur isolierte Zellen benutzen, haben das Problem, die Zellen im Defekt zu halten und zu stabilisieren⁹. Daher ist es sinnvoll, patienteneigene Zellen mit Hilfe des Tissue Engineering zuerst in der Monolayerkultur zu vermehren und dann mit einem geeigneten Zellträger eine dreidimensionale Knorpelzellkultur zu formen. Diese dreidimensionale Anordnung der Zellen ist die Voraussetzung für die In-vitro-Herstellung einer extrazellulären Matrix, aber auch grundsätzlich für die Herstellung autologer Transplantate. Für diese dreidimensionale Anordnung müssen die Zellen nicht wie bei der üblichen zweidimensionalen Kultivierung auf dem planen Boden von Kulturgefäßen, sondern

räumlich verteilt und immobilisiert werden. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Zellen dreidimensional räumlich anzuordnen. Zellen können z. B. sehr einfach mit Hilfe von Gelen dreidimensional verankert werden ^{5;19;68;114}. Es ist bekannt, dass Knorpelzellen in solchen Gelen knorpelspezifische Kollagene synthetisieren. Auch bereits dedifferenzierte Chondrozyten wechseln bei der Kollagensynthese von Typ I zu Typ II. Allerdings ist nach Redifferenzierung in einer dreidimensionalen Matrix die Expression von Kollagen IX nach mehreren Wochen irreversibel blockiert ¹²⁸. Das Bestreben, chirurgisch implantierbare vitale Zellstrukturen zu entwickeln, führte in den letzten Jahren zu neuen Ansätzen bei der dreidimensionalen Zellverteilung. So wurden z. B. Chondrozyten auf zerkleinerte resorbierbare Fäden ausgesät und mit Erfolg in Nacktmäuse transplantiert ¹²⁰. Auch Defekte in den Gelenkflächen bei Kaninchen wurden mit Hilfe von Chondrozyten in porösem Polylaktid repariert ¹²⁵. Vacanti et al. ¹²¹ entwickelten eine Methode um Zellen in ein Polymerkonstrukt einzubeziehen. Diese Zellträger müssen im Hinblick auf eine praktische Anwendung der fertigen Transplantate gewisse Anforderungen erfüllen. Es kommt bei der In-vitro-Herstellung des vitalen Gewebematerials auf eine gewisse Formstabilität an. So sollte ein solches Material z. B. gut belastbar und nicht brüchig sein. Daraus lässt sich ableiten, dass Gelstrukturen aus Agarose oder Kollagen aufgrund ihrer empfindlichen Konsistenz für die Verarbeitung ungeeignet sind. Da eine möglichst hohe Zahl von Zellen homogen im Raum verteilt und dort festgehalten werden sollen, ist es notwendig, dass der Zellträger im Inneren der Struktur eine möglichst große Oberfläche aufweist. Bei der künstlichen Gewebeentwicklung wird versucht möglichst, den gesamten interzellulären Raum mit neu synthetisierter Matrix zu füllen. Daher ist es wichtig, das Volumen des Fremdmaterials auf ein Minimum zu reduzieren. Neben den Gelen sind also auch Fasern, gewebte Strukturen, ungewebte Vliese und poröse Mikrostrukturen mögliche Zellträger.

1.4 Die osteochondrale Biphas

Bisher beschränkten sich die Bemühungen, osteochondrale Defekte mit Hilfe des Tissue Engineerings zu therapieren, auf die Knorpelschicht. Ein häufiges Problem ist dabei die Verankerung des künstlichen Materials. Artifizielles Gewebe wurde bisher mit Hilfe von Fibrinkleber oder press fit^{98;79} verankert. Es wurden mittels Tissue Engineerings vermehrte autogene Zellen unter einen über den Defekt genähten Periostlappen gespritzt¹³. Osteochondrale Transplantate bieten eine gute Verankerung im subchondralen Knochen⁴⁷ und die Möglichkeit, auch den beschädigten Knochen zu ersetzen. Autologe Transplantate haben aber den Nachteil, große Mengen an Eigenspendermaterial zu benötigen, das von unbelasteten Stellen aus dem Gelenk gewonnen werden muss. Einen Ansatz zur Lösung dieses Problems bietet die Kombination aus dem Tissue Engineering der Knorpelphase und einem bioaktiven Trägermaterial zur Verankerung im subchondralen Knochen. Dieses Trägermaterial ermöglicht eine stabile Verankerung im subchondralen Knochen und soll nach der Transplantation kontinuierlich durch körpereigenen Knochen ersetzt werden. Grundsätzlich sind die Herstellung und der Einsatz eines solchen biphasischen Implantats mit vitalen chondrozytären Zellen möglich⁶⁷. Die Vorteile sind leichtes Handling, eine gute Verankerung und der Verzicht auf zusätzliche Materialien um das Implantat zu fixieren.

1.5 Aufgabenstellung und Ziele

Ziel und Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, osteochondrale Implantate herzustellen, mit welchen es möglich ist, Knorpelläsionen im Kaninchen gelenk suffizient und dauerhaft zu rekonstruieren. Um diese Aufgabe zu erfüllen mussten Kaninchenchondrozyten isoliert und mit Hilfe des Tissue Engineerings vermehrt werden. Diese in vitro hergestellten Chondrozyten galt es mittels einer Vliesstruktur fest mit einem Knochenzement zu verbinden, um eine möglichst optimale Verankerung im Gelenkknochen zu erreichen. Zur Beurteilung des Einwachsverhaltens der Implantate und der Wiederherstellung der Knorpeloberfläche wurden nach der Explantation umfangreiche histologische und morphometrische Untersuchungen durchgeführt.