

Molekulare Charakterisierung von gezüchteten humanen dreidimensionalen Chondrozytentransplantaten

Die Abgeschlossenheit des Knorpels von klassischen Entzündungs- und Reparaturwegen (Blutung, Entzündung, Granulation, reparative Gewebeformation) ist für die limitierte Fähigkeit zur Selbstheilung verantwortlich. Daher weisen Knorpeldefekte ohne Verletzung des subchondralen Knochengewebes eine nur minimale Heilungstendenz auf [22]. Die Wiederherstellung solcher pathologisch veränderter Gelenkflächen ist das Ziel der Transplantation von künstlichen Knorpelgeweben und -ersatzmaterialien.

Vor allem in den letzten Jahren wurden aufgrund der Fortschritte in der Zellkulturtechnik etliche Methoden entwickelt, um defekte chondrale oder auch osteochondrale Areale des Gelenkknorpels zu ersetzen [5]. So wurden als Gelenkknorpelersatz Periost- [1], Perichondrium- [4], osteochondrale Transplantate [29], allogene Menisken [25] und auch Prothesen aus künstlichen Materialien eingesetzt. Allen diesen Versuchen ist gemeinsam, dass sie nur teilweise zu erfolgversprechenden Verbesserungen für den Patienten führten. Zwar konnten Schmerzen für den Patienten reduziert und seine Mobilität erhöht werden, aber letztendlich führten diese Ansätze nicht zu einer dauerhaften Erneuerung oder Rekonstruktion von belastbarem hyalinem Gelenkknorpel.

Eine weitere recht gängige Alternative stellt die von Brittberg et al. [9] entwickelte Methode der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) dar, für welche bereits durch die Arbeitsgemeinschaft Autologe Chondrozytentransplantation der DGOOC und der DGU Anforderungen hinsichtlich der Transplantatbiologie vorgeschlagen wurden [2]. Hierbei wird dem Patienten arthroskopisch eine Knorpelprobe aus einem unbelasteten Bereich entnommen und in der Zellkultur expandiert. Die so vermehrten Chondrozyten werden in Suspension in den Knorpeldefekt, welcher mit einem Periostlappen abgedeckt ist, injiziert.

Die ersten klinischen Ergebnisse der initialen Studie von Brittberg et al. [9] waren sehr zufriedenstellend; Biopsate von 22 Patienten zeigten in 12 Fällen die Ausbildung von Knorpelstrukturen, die hyalinem Knorpel sehr nahe kamen.

Trotz der guten Erfolgsaussichten kann diese Technik nur bei bestimmten, umschriebenen Defekten eingesetzt werden. Das Abdecken des Knorpeldefekts mit Periostlappen oder adäquaten Materialien setzt das Vorhandensein von gesunden Knorpelstrukturen an den Rändern des Defekts voraus, an denen die Abdeckung der zu injizierenden Knorpelzellen verknüpft wird.

Neuere Tissue-engineering-Ansätze erlauben durch die Kombination von autologen Zellen, einer künstlichen, temporären extrazellulären Matrix und bioreseorbierbaren Polymeren die Herstellung funktioneller und operativ handhabbarer Knorpeltransplantate [30]. Biokompatible, resorbierbare Polymere vermitteln hierbei eine initiale mechanische Stabilität und gestatten zudem eine hohe Formvariabilität des Transplantats.

Das Arrangieren von expandierten, differenzierten Knorpelzellen in einer temporären Matrixsubstanz soll den Chondrozyten optimale Bedingungen zur Differenzierung und zur Ausbildung einer chondrozytären extrazellulären Matrix ermöglichen. Als biokompatible Substanzen kommen hier beispielsweise Kollagene, Fibrin und Hyaluronsäure in Betracht, welche in vitro und in vivo hinsichtlich ihrer die chondrogene Reifung unterstützenden Eigenschaften getestet wurden [10, 18, 33].

In der vorliegenden Studie wurden in diesem kombinatorischen Tissue-engineering-Ansatz in humanem Serum expandierte humane artikuläre Chondrozyten in biokompatible und resorbierbare Materialien (Fibrinkleber und Polyglactin-Polydioxanon-Vliese, PGLA) eingebettet und anschließend mehrwöchig bis

Orthopäde 2004 · 33:76–84
DOI 10.1007/s00132-003-0505-3
© Springer-Verlag 2003

C. Kaps · S. Fuchs · M. Endres · S. Vetterlein · V. Krenn · C. Perka · M. Sittlinger

Molekulare Charakterisierung von gezüchteten humanen dreidimensionalen Chondrozytentransplantaten

Zusammenfassung

Die Transplantation von Chondrozyten in resorbierbaren Polymervliesen ist eine vielversprechende Methode zur Behandlung von Knorpeldefekten. Die Züchtung dieser künstlichen Knorpelgewebe ist durch eine Dedifferenzierung im Monolayer, dem Einsatz von abbaubaren Matrizen und Polymeren und der erneuten Expression chondrozytärer Markergene in dreidimensionaler (3D-)Kultur gekennzeichnet.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die molekulare Charakterisierung von phänotypischen Veränderungen während des autologen Knorpel-Tissue-engineering. Humane artikuläre Chondrozyten wurden isoliert, mit humanem Serum bis zur Passage 3 expandiert und in humanem Fib-

rinogen und Polyglactin/Polydioxanon-Vliese eingebettet, um bis zu 4 Wochen 3D kultiviert zu werden. Die Dedifferenzierung im Monolayer und die Ausbildung von Knorpelgewebe in vitro und nach subkutaner Transplantation in Nacktmäuse wurde mittels Expressionsanalyse chondrozytärer Gene und anhand histologischer und immunohistochemischer Verfahren untersucht. Die Vermehrung der Chondrozyten mit humanem Serum führte zur Induktion von Typ-I- und Typ-III-Kollagen, während die knorpelspezifischen Gene Typ-II-Kollagen, „Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein“, „Cartilage-Link-Protein“ und Aggrecan reprimiert wurden, um erneut in 3D-Kultur in Polyglactin/Polydioxanon-Vliesen

induziert zu werden. Subkutane Transplantationen im Mausmodell dokumentierten die Synthese von Proteoglykan und knorpelspezifischem Typ-II-Kollagen. Das 3D-Anordnen von humanen Gelenkchondrozyten in resorbierbaren Polyglactin/Polydioxanon-Vliesen unterstützt die chondrogene Differenzierung und die Bildung einer hyalinähnlichen Knorpelmatrix in vitro und in vivo.

Schlüsselwörter

Tissue engineering · Humane Chondrozyten · Resorbierbare Polymere · Genexpressionsanalyse

Molecular characterization of tissue-engineered human articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleeces

Abstract

Three-dimensional arrangement and subsequent transplantation of chondrocytic cells in resorbable polymers has been shown to be a promising technique for the treatment of cartilaginous defects. Engineering of artificial cartilage tissue includes dedifferentiation of chondrocytes in monolayer culture, the use of biodegradable matrices and polymer scaffolds, and re-expression of chondrocytic marker genes in three-dimensional culture.

The aim of this study was to characterize molecularly the phenotypic changes occurring with autologous cartilage tissue engineering. Human articular chondrocytes were isolated, cultured in medium containing human serum,

and expanded up to passage 3. Chondrocytes were embedded in human fibrinogen and in polyglactin-polydioxanon fleeces and cultured three-dimensionally up to 4 weeks. Dedifferentiation of chondrocytes in monolayers and formation of cartilage tissue in vitro or after subcutaneous transplantation into nude mice was assessed by gene expression analysis of typical chondrocytic genes, histology, and immunohistochemistry. The expansion of chondrocytes with human serum resulted in the induction of type I and type III collagens, whereas cartilage-specific type II collagen, cartilage oligomeric matrix protein, cartilage link protein, and aggrecan

were repressed and induced again after three-dimensional arrangement of chondrocytes in polyglactin-polydioxanon. Transplantation experiments documented the synthesis of proteoglycan and cartilage-specific type II collagen in vivo. Three-dimensional arrangement of human articular chondrocytes in resorbable polyglactin-polydioxanon fleeces supports chondrogenic differentiation and the formation of a hyaline-like cartilaginous matrix in vitro and in vivo.

Keywords

Tissue engineering · Human chondrocytes · Resorbable polymers · Gene expression analysis

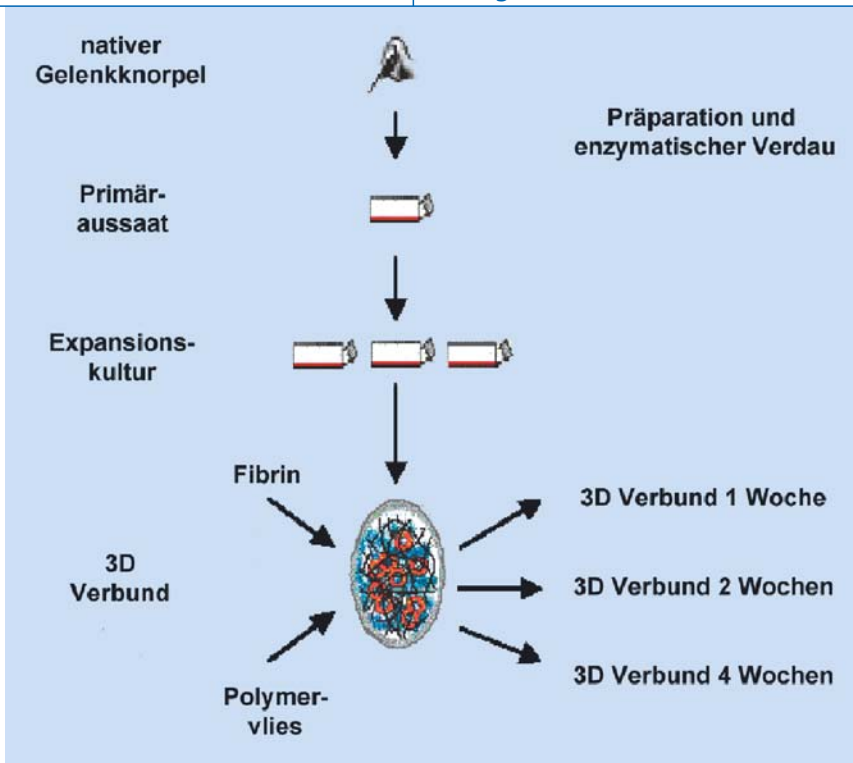


Abb. 1 ▲ Ablaufdiagramm zum Tissue engineering von Knorpel

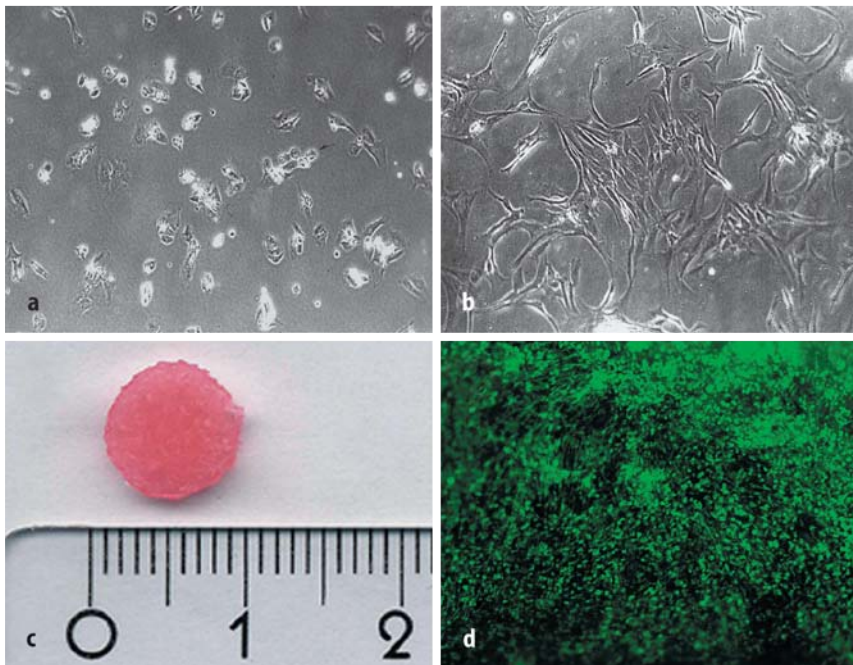


Abb. 2a–d ▲ Vermehrung und 3D-Kultur von humanen Gelenkchondrozyten. Frisch isolierte humane Chondrozyten adhären nach ca. 2–3 Tagen auf der Wachstumsfläche und beginnen sich zu strecken (a). In der Zellkultur expandierte Chondrozyten (Passage 3) zeigen einen langgestreckten, fibroblastoiden Phänotyp (b). Durch das 3D-Arrangieren von Chondrozyten mit Fibrin und Polyglactin/Polydioxanon werden Transplantate runder (Durchmesser 8 mm, c) ermöglicht. Die Kultur im 3D-Verbund führt zu einer erneuten Ausprägung des chondrozytären Phänotyps, die Färbung mit Propidium Iodid und Fluoreszeindiazetat zeigt die gleichmäßige Verteilung vitaler Chondrozyten im Transplantat (d, Vergr. a, b 1:100, d 1:50)

zur Ausbildung eines vitalen 3D-Knorpeltransplantats kultiviert. Im Hinblick auf die klinische Anwendung solcher Tissue-engineering-Transplantate zur Regeneration artikulärer Knorpeldefekte wurden ausschließlich klinisch zugelassene Materialien eingesetzt; die Zellkultur erfolgte ebenfalls unter „autologen“ Bedingungen durch die Verwendung humaner Chondrozyten, humanen Fibrins und humanen Serums.

Zur Charakterisierung der chondrogenen Reifungskapazität dieser Tissue-engineering-Transplantate wurde in allen Phasen eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, um die Kapazität humaner artikulärer Chondrozyten zur Redifferenzierung in vitro auf molekularer Ebene aufzuzeigen. Die subkutane Transplantation dieser Tissue-engineering-Knorpeltransplantate im Nacktmausmodell bestätigte die chondrozytäre Reifung der mit humanen Chondrozyten, humanem Serum und humanem Fibrin hergestellten künstlichen, 3D-Knorpelgewebe in vivo.

Material und Methodik

Isolation der Chondrozyten

Humaner artikulärer Knorpel wurde von sechs adulten humanen anonymisierten Spendern (Alter 56–77 Jahre, 12–48 h post mortem) gewonnen. Hierzu wurde der Gelenkknorpel von den Femurkondylen des Kniegelenks unter sterilen Bedingungen präpariert. Zur Isolierung der Chondrozyten wurde die extrazelluläre Matrix über Nacht in RPMI (Biochrom, Berlin) mit 10% Humanserum (PAA, Linz, Österreich), 1,5 U/ml Kollagenase P (Boehringer, Mannheim), 500 U/ml Kollagenase Typ CLS II (Biochrom, Berlin), 50 U/ml Hyaluronidase (Sigma, Taufkirchen), 100 U/ml Penicillin (Biochrom, Berlin) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin) verdaut. Die resultierende Zellsuspension wurde 3-mal mit Hank-Lösung (Biochrom, Berlin) gewaschen.

Die Anzahl der vitalen Zellen wurde unter Verwendung der Trypan-blau-Färbung mit einem Hämocytometer bestimmt, um initial 20.000 vitale Zellen/cm² Wachstumsfläche in Zellkulturflaschen auszusäen. Die Zellen wurden mit RPMI, welches mit 10% Vollblutserum

Tabelle 1

Oligonukleotidsequenzen			
Gen	Embl-Datenbank	Oligonukleotide (5'→3')	Produktgröße [Bp]
GAPDH	M33197	GGC GAT GCT GGC GCT GAG TAC TGG TTC ACA CCC ATG ACG A	149
Typ Iα1-Kollagen	Z74615	CGA TGG CTG CAC GAG TCA CAC CAG GTT GGG ATG GAG GGA GTT TAC	180
Typ IIα1-Kollagen	X06268	CCG GGC AGA GGG CAA TAG CAG GTT CAA TGA TGG GGA GGC GTG AG	128
Typ IIIα1-Kollagen	X14420	GGT TTT GCC CCG TAT TAT GGA AGT TTC TAG CCG GGT TTT TAC GAG	142
COMP	L32137	GGG TGG CCG CCT GGG GGT CTT CTT GCC GCA GCT GAT GGG TCT C	116
Link-Protein	U43328	GCG TCC GCT ACC CCA TCT CTA GCG CTC TAA GGG CAC ATT CAG TT	145
Aggrecan	X17406	CCA GTG CAC AGA GGG GTT TG TCC GAG GGT GCC GTG AG	146

BP Basenpaare, COMP Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein

(DRK, Berlin) supplementiert wurde, unter konventionellen Zellkulturbedingungen kultiviert. Alle 2 Tage erfolgte der Medienwechsel. Erreichten die Zellen 80% Konfluenz, wurden sie mittels Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) abgelöst und in einem 1:2-Verhältnis subkultiviert. Während der gesamten Zellkulturphase wurden die individuellen Zellpräparationen der 6 Spender strikt separat gehalten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, genehmigt.

Tissue engineering

Die expandierten Chondrozyten (Passage 3) der individuellen Präparationen wurden getrennt voneinander, wie bereits beschrieben, 3D verpackt [26]. Die in humanem Fibrinogen (Tissucol, Baxter, München) suspendierten Chondrozyten wurden in runde Polyglactin/Polydioxanon-Vliese (Ethisorb, Durchmesser 8 mm, Dicke 1,5 mm, Ethicon, Norderstedt) eingebracht. Das Polymerisieren des Fibrinogens erfolgte durch Inkubieren mit Thrombinlösung in phosphatpufferter Salzlösung (PBS) bei 37°C für 20 min. Die 3D-Zellpolymertransplantate wurden nachfolgend für 4 Wochen in Ham's F12-Medium (Biochrom, Berlin) mit 5% Voll-

blutserum (DRK, Berlin), 50 µg/ml Ascorbinsäure und 35 µg/ml Prolin zur chondrozytären Induktion kultiviert.

Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse wurde nach initialer Isolierung der spenderspezifischen Gesamt-RNA [11] und anschließender Herstellung eines repräsentativen RNA-Gemisches der 6 Spender durch Mischung zu gleichen Teilen durchgeführt. Untersucht wurden der native Gelenkknorpel, die Primäraussaat (P₀ nach Erreichen der Konfluenz), die Expansionskultur (P₃ nach Erreichen der Konfluenz) und der 3D-Verbund nach einer, 2–4 Wochen (Abb. 1). 5 µg der Gesamt-RNA wurde nach dem Hybridisieren mit 500 ng oligo-(dT)_{12–18} Primer (Gibco-BRL, Karlsruhe) durch 5 U Reverse Transkriptase (Gibco-BRL, Karlsruhe) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben [16]. Die relative Expressionshöhe des nicht regulierten Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde zum Normalisieren der einzelnen cDNA Proben verwendet. Jeweils 1 µl der normalisierten cDNA wurde unter Verwendung des „SYBR Green PCR Core Kit“ (Applied Biosystems, Langen) im „i-Cycler real-time PCR System“ (BioRad, München) eingesetzt. Die relative Quantifizie-

rung der Expressionshöhe von chondrozytären Markergenen (Tab. 1) wurde wie beschrieben [1] durchgeführt. Die Markergenexpression wird im prozentualen Verhältnis zur Expressionshöhe von GAPDH angegeben.

Transplantation im Mausmodell

Zum Verifizieren der Knorpelreifung von 3D-verpackten Chondrozyten in vivo wurden von 3 Spendern Chondrozyten isoliert, über 3 Passagen unter Verwendung von humanem Serum expandiert und 3D verpackt. Die so hergestellten Transplantate ($n=9$) wurden für 1 Woche in vitro vorkultiviert (Tissue engineering) und nachfolgend subkutan in homozygote, thymusaplastische Nacktmäuse (CD1 nu/nu; Alter 8–9 Wochen; Charles River Wiga, Sulzfeld) implantiert [28]. Nach 12 Wochen wurden die Tiere getötet. Die explantierten Knorpelgewebe wurden in „TissueTek OCT Compound“ (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und für nachfolgende histologische bzw. immunhistochemische Untersuchungen kryokonserviert.

Histologische und immunhistochemische Untersuchung

Für histologische und immunhistochemische Färbungen wurden 10-µm-Dünnschnitte der Präparate angefertigt. Zur Darstellung von Proteoglykanen wurden die Schnitte mit Alcian blau (pH=2,5) und zum Nachweis von kollagenen Matrixkomponenten nach Masson-Goldner gefärbt. Für den immunhistochemischen Nachweis von Typ-II-Kollagen wurden die Dünnschnitte für 1 h mit dem Primäantikörper (Kaninchen anti-human Typ-II-Kollagen, DPC-Biermann, Bad Nauheim) oder als Kontrolle mit Kaninchen IgG (DAKO, Hamburg) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit biotinylierten gegen IgG gerichteten Antikörpern und mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (DAKO, Hamburg). Zur Farbentwicklung wurde das AEC-Substrat Kit (Fa. DAKO) verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zur Darstellung der Verteilung und der Vitalität der Chondrozyten im 3D-Verbund in vitro, wurden die Transplantate

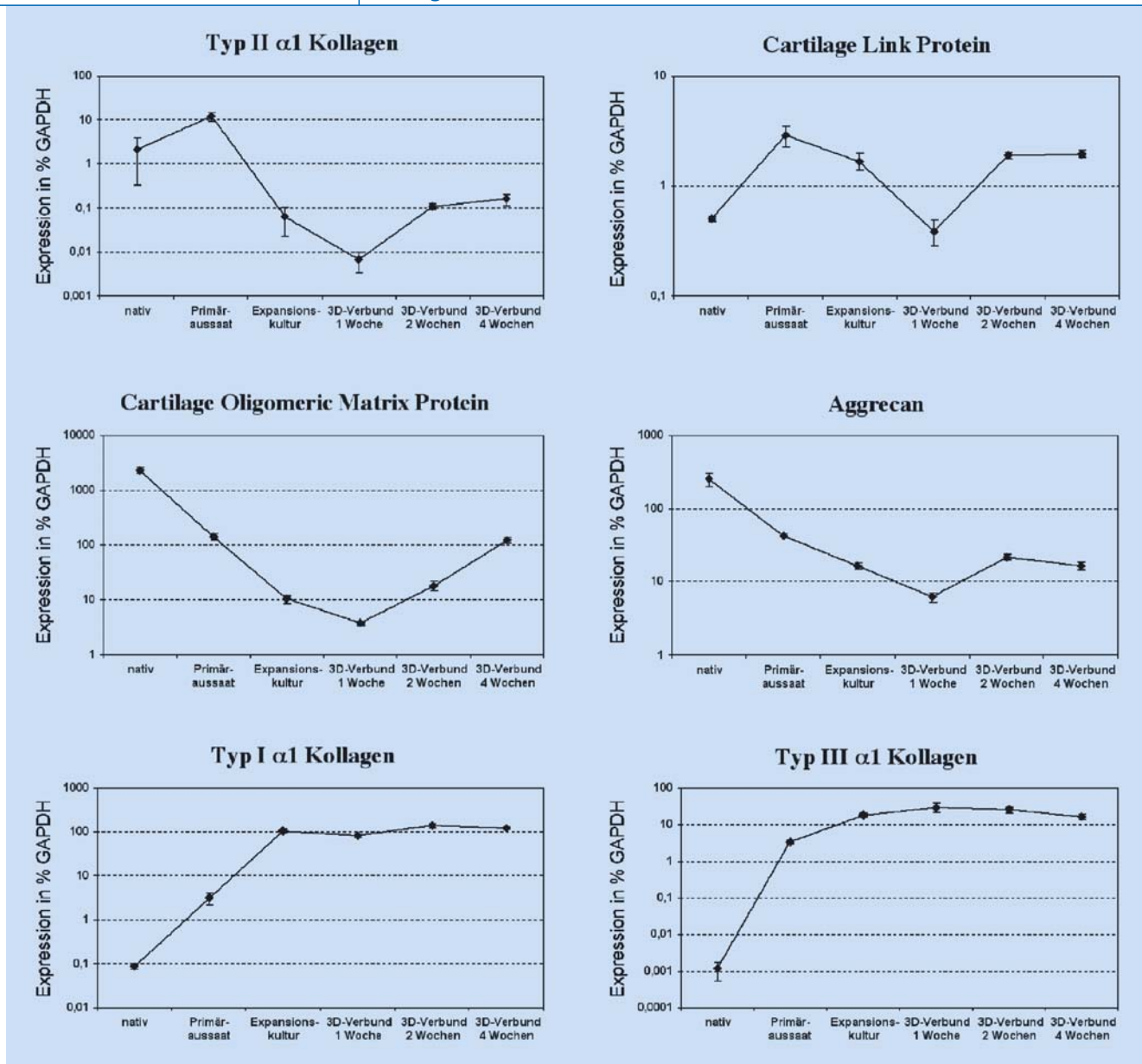


Abb. 3 ▲ Analyse der Genexpression chondrozytärer Matrixmoleküle während des Tissue engineering von Knorpel. Die Expression der Matrixmoleküle ist gemessen am Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) prozentual in logarithmischer Darstellung angegeben. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zum Mittelwert von Triplikaten

aus resorbierbaren Polyglactin/Polydioxanon-Vliesen und Fibrin mit Propidium-Iodid (PI) und Fluoreszein-Diazetat (FDA), wie bereits beschrieben [24], gefärbt.

Ergebnisse

Tissue engineering

Für das Tissue engineering von 3D-Knorpeltransplantaten (s. ■ Abb. 1) unter Verwendung von humanem Vollblutserum

wurden humane Chondrozyten zunächst durch einen enzymatischen Verdau aus ihrer natürlichen extrazellulären Matrix herausgelöst. Durchschnittlich wurden von den 6 Spendern 1,8 Mio. Zellen/g Gelenknorpel präpariert, wobei die Vitalität im Mittel bei 82% lag.

Die frisch isolierten Chondrozyten zeigten eine charakteristische runde Morphologie. Bereits nach 2–3 Tagen adhärten die Zellen auf der Wachstumsfläche und begannen sich zu strecken (■ Abb. 2a). Während der weiteren Kul-

tur im Monolayer proliferierten die Zellen und bedeckten nach 2 Wochen rund 80% der Wachstumsfläche. Im Zuge des Subkultivierens und der Proliferation verloren die Chondrozyten ihre typische Morphologie und veränderten ihre Zellform hin zu einem langgestreckten, eher fibroblastoiden Typ (s. ■ Abb. 2b); die Chondrozyten dedifferenzierten. Die Vitalität der Zellen lag nach der Primäraussaat und während der Expansionsphase bis hin zur Passage 3 durchschnittlich bei >94%.

Durch das Resuspendieren der expandierten Chondrozyten in humanem Fibrinogen und das nachfolgende Einbringen in Polyglactin/Polydioxanon-Vliese konnten künstliche, 3D-Knorpeltransplantate von runder (Durchmesser 8 mm) und gestreckter, rechteckiger (20×30 mm) Form hergestellt (s. **Abb. 2c**) und bis zu 4 Wochen *in vitro* kultiviert werden.

Die resorbierbaren Polyglactin/Polydioxanon-Vliese zeigten nach 2-wöchiger Kultivierung erste Degradationserscheinungen; das Fragmentieren der Vliesfasern war allerdings nicht mit einem Verlust der Formstabilität *in vitro* verbunden. Die eingebrachten langgestreckten, dedifferenzierten Chondrozyten nahmen im 3D-Verbund wieder ihre charakteristische chondrozytäre Gestalt an und zeigten selbst nach einer Kultivierung von 2 Monaten *in vitro* eine homogene Verteilung im 3D-Verbund und eine hohe Vitalität (s. **Abb. 2d**).

Genexpressionsanalyse

Die morphologischen Veränderungen der humanen artikulären Chondrozyten aufgrund des HerauslöSENS aus der extrazellulären Matrix, der Expansion in der Monolayerkultur und des erneuten Überführens in den 3D-Verbund sind begleitet von Modulationen auf molekularer Ebene. Für die Beschreibung dieser molekularen Vorgänge während des Tissue engineering von Knorpeltransplantaten wurde zu markanten Punkten die Genexpression typischer chondrozytärer Markergene aufgenommen (**Abb. 3**). Die chondrozytären Matrixmoleküle Typ-II-Kollagen und Cartilage-Link-Protein (CRTL) wiesen über den gesamten Kulturverlauf hinweg ein vergleichbares Expressionsprofil auf. Die Expression beider Moleküle war im nativen Knorpel nachzuweisen und zeigte eine deutliche Induktion während der Primäraussaat.

Nach dem Vermehren und Subkultivieren der Zellen zum Zeitpunkt der Expansionskultur wiesen Typ-II-Kollagen (Faktor 200) und CRTL (Faktor 2) eine im Vergleich zur Primäraussaat reprimierte Expression auf. Eine weiteres Herabregulieren der beiden Markergene wurde noch nach einwöchiger Kultivierung im Polyglactin/Polydioxanon-Vlies festgestellt.

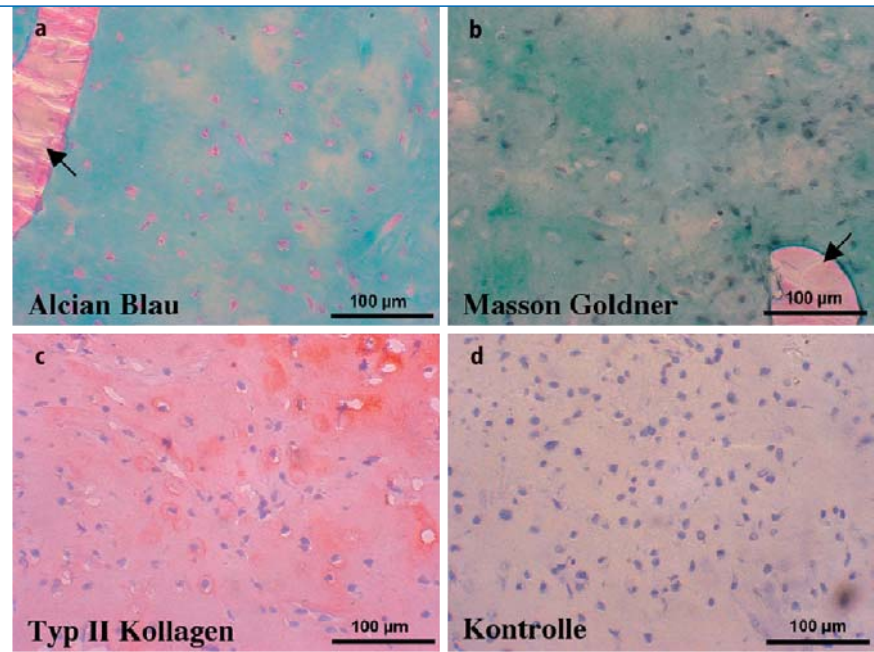


Abb. 4a–d ▲ Reifung einer hyalinähnlichen Knorpelmatrix nach subkutaner Transplantation im Nacktmausmodell. Nach 3 Monaten zeigen histologische Färbungen mit Alcian-Blau (a) und Masson-Goldner (b) den Aufbau einer proteoglykan- und kollagenhaltigen Matrix an. Innerhalb dieser Matrix sind Polydioxanonfasern (a, b; Pfeil) des abbaubaren Vlieses nachweisbar. Polyglactinfasern sind nicht zu detektieren. Immunologisch kann das knorpelspezifische Typ-II-Kollagen (c) homogen und die Chondrozyten umschließend dargestellt werden; Kontrollfärbungen (d) sind negativ. Die Messbalken repräsentieren 100 µm

Die Kultivierung der Chondrozyten im 3D-Transplantat führte nach 2-wöchiger Kultivierung unter chondrogenen Bedingungen zu einer erneuten Induktion der Gene Typ-II-Kollagen (Faktor 18) und CRTL (Faktor 5), welche im weiteren Verlauf der 3D-Kultur erhalten blieb. Im Vergleich zu Typ-II-Kollagen und CRTL zeigten die Markergene „Cartilage Oligomeric Matrix Protein“ (COMP) und Aggrecan ein höheres Expressionsniveau im nativen Gelenknorpel. Bereits in der Primäraussaat konnte für beide Gene, COMP (Faktor 16) und Aggrecan (Faktor 6), eine deutliche Repression festgestellt werden, welche sich bis zu dem Zeitpunkt der einwöchigen Kultur im 3D-Verbund fortsetzte. Die 3D-Kultur resultierte in der Induktion von COMP nach 2-wöchiger Kultur um den Faktor 5 und weiterführend nach 4-wöchiger Kultur in der Erhöhung um den Faktor 7. Auch die Expression von Aggrecan wurde nach 2-wöchiger Kultur im 3D-Verbund induziert (Faktor 3) und blieb in der weiteren Kultur stabil.

Im Gegensatz zu diesen typischen chondrozytären Markergenen, welche zunächst reprimiert und nach 2-wöchiger Kultur im 3D-Transplantat erneut indu-

ziert wurden, wiesen die Gene Typ-I- und Typ-III-Kollagen ein differierendes Expressionsprofil auf. Typ-I-Kollagen konnte im nativen Knorpel schwach nachgewiesen werden und wurde im Laufe der Primäraussaat und Expansionskultur deutlich induziert (Faktor 1000). Typ-III-Kollagen hingegen war im nativen Knorpel nur äußerst schwach nachweisbar (0,001% der Expression von GAPDH). In der Zellkultur konnte Typ-III-Kollagen eindeutig nachgewiesen werden und wurde von der Primäraussaat ausgehend in der Expansionsphase um den Faktor 6 induziert. Die während der Monolayerkultur stark induzierte Expression von Typ-I- und -III-Kollagen erreichte nach Überführen der Chondrozyten in den 3D-Verbund ein Plateau, welches im Falle von Typ-I-Kollagen vergleichbar mit dem Expressionsniveau des Haushaltgens GAPDH war.

Transplantation im Mausmodell

Um das *In-vivo*-Reifen von Knorpeltransplantaten im etablierten Nacktmausmodell zu evaluieren, wurden von 3 Spendern jeweils drei künstliche Knorpelgewebe mit

Hier steht eine Anzeige
This is an advertisement



Springer

85 x 240 mm

den Techniken des Tissue engineering unter Verwendung von humanem Vollblutserum erfolgreich gezüchtet und subkutan implantiert. Nach 12 Wochen wurden die transplantierten Gewebe entnommen und histologisch untersucht. Die Explantate eines der drei Spender wiesen eine deutliche Resorption und eine ausgeprägte Infiltration von fibroblastoiden Zellen in das Knorpeltransplantat auf. In histologischen Färbungen konnte in den infiltrierten Transplantaten nur eine marginale bis keine Knorpelreifung nachgewiesen werden. Die übrigen 6 Transplantate wiesen kaum Infiltrationen auf und zeigten eine vergleichbare Gewebereifung von hyalinarigem Knorpel (■ Abb. 4).

Histologisch konnte eine uniforme Verteilung der transplantierten Chondrozyten nachgewiesen werden. Das eingebrachte Polymer war weitestgehend resorbiert, wobei Fasern von Polyglactin nicht mehr, Polydioxanon (s. ■ Abb. 4a, Pfeil) hingegen deutlich dargestellt werden konnten. Die Färbungen mit Alcian blau zeigten die Synthese und homogene Ablagerung von interzellulären Proteoglykanen einer chondrozytären extrazellulären Matrix an (s. ■ Abb. 4a). Kollagene Anteile der gebildeten Matrix wurden in den Masson-Goldner-Färbungen (s. ■ Abb. 4b) perizellulär angefärbt. Immunhistochemisch konnte innerhalb der extrazellulären Matrix Typ-II-Kollagen homogen und auch diskret die Chondrozyten umschließend dargestellt werden (s. ■ Abb. 4c). Korrespondierende Kontrollfärbungen (s. ■ Abb. 4d) wiesen keine Anfärbung auf und bestätigten die Spezifität des immunologischen Nachweises von Knorpel-spezifischem Typ-II-Kollagen.

Diskussion

Tissue engineering von Knorpelgewebe ermöglicht die Bereitstellung künstlicher Gewebetransplantate aus autologen Chondrozyten, einer künstlichen extrazellulären Matrix und resorbierbaren Polymeren. In den letzten Jahren konnten in mehreren Studien erfolgversprechende Resultate zur In-vitro- und In-vivo-Reifung von Tissue-engineering-Transplantaten für artikulären [33], aurikulären [27] und Nasenseptumknorpel [17] dokumentiert werden. Die klinische Anwendung dieser

Tissue engineering Techniken erfordert eine sorgfältige und strikt autologe Handhabung der vom Patienten gewonnenen Zellen und Gewebe, um das Risiko von Infektionen oder Kontaminationen während der Herstellung von individuellen, angepaßten Transplantaten zu minimieren. Eine wichtige Aufgabe der künstlichen Gewebezüchtung ist die Gewinnung von ausreichendem Gewebe bei minimaler Morbidität der Entnahmestelle. Daher ist ein wichtiges Ziel des Knorpel-Tissue-engineering die effiziente Isolierung von vitalen Chondrozyten ausgehend von geringen Biopsiemengen und ihre adäquate Vermehrung unter autologen Bedingungen [15].

Während der Kultur und Vermehrung der Zellen im Monolayer verlieren die Chondrozyten ihren typischen Charakter und dedifferenzieren. Der Verlust des chondrozytären Phänotyps ist auf molekularer Ebene von der Repression des knorpelspezifischen Typ-II- und der Induktion des eher dem fibroblastoiden Zelltyp zuzuordnenden Typ-I-Kollagens begleitet [6]. Die erneute Ausbildung des charakteristischen chondrozytären Phänotyps wird durch eine 3D-Anordnung der dedifferenzierten Chondrozyten erzielt, welche die Bildung der entsprechenden Gewebeformation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterstützt [8, 28].

In dieser Studie wurde mittels Analysen zur Genexpression die De- und Redifferenzierung von adulten, humanen Gelenkchondrozyten während der Herstellung von autologen Tissue-engineering-Knorpeltransplantaten mit humanem Vollblutserum und humanem Fibrinogen verfolgt. Anhand der Expressionsmuster charakteristischer Markergene konnte der Verlust des Knorpelphänotyps nach Vermehrung der Chondrozyten im Monolayer und die erneute Induktion des chondrozytären Phänotyps im 3D-Verbund aus Fibrin und Polyglactin/Polydioxanon-Vliesen aufgezeigt werden. In subkutanen Transplantationsexperimenten wurde die Ausbildung von hyalin-ähnlichen Knorpelstrukturen im nu/nu-Nacktmäusemodell bestätigt. Bei dem Tissue engineering von Knorpel konnten phänotypisch und auf Ebene der Genexpression 2 Phasen aufgezeigt werden.

Das Herauslösen der Chondrozyten aus ihrer natürlichen Umgebung und die anschließende Kultivierung im Monolayer zur Zellvermehrung führte zur Repression charakteristischer chondrogener Markergene. Während dieser Phase dedifferenzierten die Zellen, prägten ein eher fibroblastoides Erscheinungsbild aus und zeigten die Repression von Typ-II- und die Induktion von Typ-I-Kollagen. Vergleichbare Regulationsmuster während dieser Phase der Dedifferenzierung konnten auch für mit fötalem Kälberserum expandierte Gelenkknorpelzellen auf Genexpressions-ebene aufgezeigt werden. So wird beispielsweise die Expression der chondrozytären Matrixkomponenten Typ-II-Kollagen und Fibromodulin reprimiert, während Lumican und das „Cartilage Glycoprotein-39“ induziert werden [7]. Die Dedifferenzierung der mit humanem Serum expandierten Chondrozyten wurde hier ebenfalls durch das Expressionsmuster der chondrozytären Matrixproteine CTRL [23], Aggrecan [32] und COMP [34] angezeigt, welche in der Expansionsphase im Monolayer deutlich reprimiert wurden. Hierbei ist besonders auf die kurzzeitige Induktion von Typ-II-Kollagen und CTRL während der Primäraussaat hinzuweisen. Diese Erhöhung der Matrixsynthese mag auf den initialen, inhärenten Reparaturmechanismus der Knorpelzellen nach Störung der natürlichen Matrixumgebung zurückzuführen sein, welcher auch *in vivo* z. B. bei der Mikrofraktur artikulären Knorpels beschrieben ist [14].

Einhergehend mit dem Herabregulieren chondrozytärer Markergene während der Phase der Dedifferenzierung wurden die Gene des eher fibroblastoiden Zelltyps, Typ-I- und Typ-III-Kollagen, kontinuierlich induziert. In der 2. Phase wurde durch das Einbringen der dedifferenzierten Chondrozyten in Fibrin/Polyglactin/Polydioxanon und der anschließenden Kultivierung im 3D-Verbund eine Differenzierung der Zellen hin zum chondrozytären Typ eingeleitet. Diese Redifferenzierung war begleitet von der erneuten Induktion der durch die Kultur im Monolayer reprimierten Markergene Typ-II-Kollagen, CTRL, Aggrecan und COMP. Das 3D-Arrangieren von dedifferenzierten Chondrozyten in geeigneten Biomaterialien, wie Alginat [21], Agarose [6], Hyalu-

ronsäure [3] und hier humanes Fibrin, stellt hierbei eine wichtige Komponente für das Initiieren der chondrogenen Differenzierung von dedifferenzierten, fibroblastoiden und expandierten Chondrozyten dar. Demgegenüber konnte durch das Arrangieren der Chondrozyten im 3D-Verbund die Induktion an Typ-I- und Typ-III-Kollagen nicht revertiert werden; die Expression dieser eher nicht Knorpelspezifischen Gene blieb relativ konstant auf einem hohen Niveau. Allerdings könnte hier der Verlust des Knorpelphänotyps eher durch den Verlust typischer chondrozytärer Moleküle (Markergene) denn durch das Auftreten von nichttypischen, fibroblastenassoziierten Molekülen begleitet sein [20]. Nach einer mehrwöchigen *In-vitro*-Kultivierung prägten die expandierten humanen Chondrozyten wieder den chondrozytären Charakter aus, nachdem diese in einen 3D-Verbund aus Fibrin und resorbierbarem Polymer überführt wurden. Die hier dargelegten Untersuchungen zur Genexpression sind exemplarisch mit vereinigten RNA-Proben der Patienten durchgeführt worden. Inwieweit diese Erkenntnisse allgemeingültig auf individuelle Patientenproben zu übertragen sind, wäre hier in einer statistisch breiter angelegten Studie zu verifizieren.

Des Weiteren konnte auch *in vivo* die Fähigkeit von expandierten artikulären Chondrozyten zum erneuten Ausprägen eines hyalinähnlichen Phänotyps bestätigt werden. Die mit Vollblutserum vermehrten Chondrozyten wurden mittels humanem Fibrin und Polyglactin/Polydioxanon-Vliesen 3D arrangiert und für 1 Woche in der Zellkultur chondrogen induziert.

Die subkutane Implantation dieser künstlichen Gewebetransplantate resultierte nach einem Zeitraum von 3 Monaten reproduzierbar in einem hyalinähnlichen Knorpelgewebe. Hier konnte in einem Falle eine nur marginale Bildung reifen Knorpelgewebes beobachtet werden, wobei das subkutan implantierte Transplantat deutliche Resorptionserscheinungen und infiltrierte Wirtszellen aufwies. Durch diese infiltrierenden Zellen, losgelöst von der chondrogenen Kapazität der Transplantate, mag hier die Reifung des Gewebes nachhaltig gestört worden sein. Obwohl die hier in diesem Transplantationsmodell [28] verwendeten Nacktmäuse

eine Defizienz der T-Zellen aufweisen, sind Wundreaktionen nach Transplantation zu beobachten, welche wirtabhängig zu einer bindegewebigen Verkapselung des Transplantats mit nachfolgender Resorption und Destruktion des Gewebes führt.

Anhand histologischer und immunhistochemischer Färbungen der Transplantate wurde die Formation einer hyalinähnlichen extrazellulären Matrix mit Einlagerung von Proteoglykanen und Kollagenen, insbesondere des knorpelspezifischen Typ-II-Kollagens, nachgewiesen. Die Reifung humaner mit humanem Serum expandierten Knorpelzellen im 3D-Verbund im subkutanen Transplantationsmodell der Nacktmaus ist konsistent mit der Bildung hyalinähnlicher Knorpelgewebe nach intramuskulärer Injektion von beispielsweise mit fötalem Kälberserum expandierten Gelenkchondrozyten [12].

Fazit für die Praxis

Das 3D-Arrangieren von mit humanem Vollblutserum expandierten adulten, artikulären Chondrozyten in humanem Fibrin und resorbierbaren Polyglactin/Polydioxanon-Vliesen stellt ein hervorragendes System für die Reifung künstlicher Gelenkknorpeltransplantate dar. Auch im Tiermodell konnte neben subkutanen Transplantationen bereits eine gute Defektheilung von orthotropen Gelenkdefekten im Kaninchen mit Formation hyalinähnlichen Knorpels gezeigt werden [26]. Die textile Struktur des resorbierbaren Polymers erlaubt zudem ein Einnähen des Tissue-engineering-Knorpeltransplantats in den Defekt und die Fixation im subchondralen Knochen am offenen Gelenk [31] oder mittels arthroskopischer Techniken [13].

Korrespondierender Autor

Dr. C. Kaps

Labor für Tissue Engineering,
Experimentelle Rheumatologie und
klinische Immunologie,
Medizinische Fakultät, Humboldt-Universität,
Charité, Tucholskystraße 2, 10117 Berlin
E-Mail: christian.kaps@charite.de

Danksagung

Diese Studie wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG BU 445/5-4) und vom Senat von Berlin (B002).

Literatur

1. User Bulletin 2 (1997) ABI Prism 7700 sequence detection system. Applied Biosystems, pp 1–36
2. Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft „Autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) und Tissue Engineering“ unter Schirmherrschaft der DGU und DGOOC. (2002) http://www.thieme.de/zfo/02_02/ortho_16.html
3. Aigner J, Tegeler J, Hutzler P et al. (1998) Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res* 42: 172–181
4. Amiel D, Coutts RD, Abel M, Stewart W, Harwood F, Akeson WH (1985) Rib perichondrial grafts for the repair of full-thickness articular-cartilage defects. A morphological and biochemical study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 67: 911–920
5. Anders S, Schaumburger J, Grifka J (2001) Surgical intra-articular interventions in arthrosis. *Orthopade* 30: 866–880
6. Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215–224
7. Benz K, Breit S, Lukoschek M, Mau H, Richter W (2002) Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 284–292
8. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lassel C, Freisinger P (1994) Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 212: 97–104
9. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889–895
10. Brun P, Abatangelo G, Radice M, Zacchi V, Guidolin D, Daga Gordini D, Cortivo R (1999) Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res* 46: 337–346
11. Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532–537
12. Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP (2001) Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum* 44: 1608–1619
13. Erggelet C, Sittlinger M, Lahm A (2003) The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy* 19: 108–110
14. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, Rodkey WG, Steadman JR, Goodnight JL, McLlraith CW (2003) Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop* 2003: 215–227
15. Gruber R, Sittlinger M, Bujia J (1996) In vitro cultivation of human chondrocytes using autologous human serum supplemented culture medium: minimizing possible risk of infection with pathogens of prion diseases. *Laryngorhinootologie* 75: 105–108
16. Gubler U, Hoffman BJ (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25: 263–269
17. Haisch A, Schultz O, Perka C, Jahnke V, Burmester GR, Sittlinger M (1996) Tissue engineering of human cartilage tissue for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin gel and polymer carriers. *HNO* 44: 624–629
18. Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, Lust G (1994) Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 12: 485–497
19. Hoikka VE, Jaroma HJ, Ritsila VA (1990) Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scand* 61: 36–39
20. Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir HI (1995) Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *J Cell Sci* 108: 1991–1999
21. Liu H, Lee YW, Dean MF (1998) Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads. *Biochim Biophys Acta* 1425: 505–515
22. Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64: 460–466
23. Neame PJ, Barry FP (1994) The link proteins. *Exs* 70: 53–72
24. O'Brien MC, Bolton WE (1995) Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry. *Cytometry* 19: 243–255
25. Ochi M, Sumen Y, Jitsuiki J, Ikuta Y (1995) Allogeneic deep frozen meniscal graft for repair of osteochondral defects in the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg* 114: 260–266
26. Perka C, Schultz O, Sittlinger M, Zippel H (2000) Chondrocyte transplantation in PGLA/polydioxanone fleece. *Orthopade* 29: 112–119
27. Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD, Vacanti CA (1999) Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg* 103: 1111–1119
28. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittlinger M (1998) Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 42: 347–356
29. Schottle PB, Oettl GM, Agneskirchner JD, Imhoff AB (2001) Operative therapy of osteochondral lesions of the talus with autologous cartilage-bone transplantation. *Orthopade* 30: 53–58
30. Sittlinger M (1995) Tissue engineering: artificial tissue replacement containing vital components. *Laryngorhinootologie* 74: 695–699
31. Thiesen F, Barnewitz D, Zimmermann J, Klein C, Larcher Y, Günther M, Sittlinger M, Wilke I (2000) Tissue Engineering – Eine neue Methode der Reparation von defekten Gelenkknorpel bei Pferden. *Veterinärspiegel* 2: 134–136
32. Velikonja NK, Wozniak G, Malicev E, Knezevic M, Jeras M (2001) Protein synthesis of human articular chondrocytes cultured in vitro for autologous transplantation. *Pflugers Arch* 442: 169–170
33. Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI (1998) Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 4: 429–444
34. Zaucke F, Dinsler R, Maurer P, Paulsson M (2001) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J* 358: 17–24