

Immer nur Prothesen?

Die Chirurgie der Zukunft arbeitet mit biologischem Ersatz

Christian Candrian, Marcel Jakob

In den letzten Jahren wuchsen die Erwartungen an die Forschung, insbesondere die Forschung mit «gezüchteten Zellen». Neue Entwicklungen, wie die Herstellung von Herzgewebe und Herzklappen in vitro (1) oder sogar von ganzen Ohren (2), erwecken Hoffnungen, eines Tages ganze Organe oder Gelenke in vitro herzustellen zu können. Hinzu kommt die Stammzellenforschung, die in den letzten Jahren ebenfalls sehr wichtige Forschungserkenntnisse hervorgebracht hat. Wo steht jedoch die Realität der Forschung heute? Können wir wirklich in ein paar Jahren Teile oder sogar ein ganzes Gelenk in vitro mit eigenen oder auch allogenen Zellen massgeschneidert herstellen?



Dr. med. Christian
Candrian



PD Dr. med.
Marcel Jakob

Die Forschung im Gebiet des «Tissue Engineering» des Knorpels hat in den letzten Jahren in der Tat wichtige Entdeckungen hervorgebracht. Einer der ersten Schritte erfolgte vor 14 Jahren, als die Resultate der sogenannten autologen Chondrozytentransplantation (ACT) publiziert wurden (3). Dieses Verfahren hat sich unterdessen etabliert und kommt heute bei isolierten Knorpelschäden, nicht aber bei arthrotisch veränderten Gelenken, zum Einsatz. Bei diesem Verfahren wird eine Knorpelbiopsie arthroskopisch aus dem betroffenen Kniegelenk entnommen, die darin enthaltenen Chondrozyten mithilfe von verdauenden Enzymen isoliert und in vitro vermehrt. Zirka vier Wochen später werden die expandierten Zellen entweder in einer Zellsuspension oder auf einem Trägermaterial wieder in den Defekt im Kniegelenk, zum Teil auch ins Sprunggelenk, implantiert. Mit der Zeit bildet sich eine Art

Knorpelgewebe, das den vorbestehenden Knorpeldefekt auffüllt. Die klinischen Resultate sind gut, es bildet sich jedoch nur ein Ersatzgewebe, das biomechanisch «schwächer» ist als das native Knorpelgewebe.

Eine Weiterentwicklung dieses Konzeptes fand zirka fünf Jahre später statt: Man begann, ausgehend von isolierten Chondrozyten, in vitro reproduzierbar knorpelähnliches Gewebe zu züchten. Hyaliner Knorpel besteht zum grössten Teil aus Glycosaminoglycanen (GAG), welche vor allem die Fähigkeit besitzen, Wasser an sich zu binden, und Kollagen II, das vor allem die Reissfestigkeit des Knorpels bewirkt. Knorpelähnliches Gewebe, das hohe biochemische und histologische Ähnlichkeit mit nativem Knorpel aufweist, kann heute innert zwei bis vier Wochen mittels Zellkultur in vitro synthetisiert werden (Abbildung 1). Werden solche gezüchteten Gewebe zusätzlich im Subkutanewebe einer immundefizienten Maus für weitere zwölf Wochen kultiviert, können diese Gewebe die mechanischen Eigenschaften des nativen normalen Knorpels erreichen (4, 5).

Die ersten künstlichen Gelenke

Ein weiterer Meilenstein in Richtung biologisches Gelenk konnte in den letzten Jahren gesetzt werden, indem es möglich wurde, kom-

binierte Knorpelknochenzylinder im Labor zu züchten. Diese Konstrukte bestehen teils aus Knorpel und teils aus Knochen, wobei der Knorpel in den Knochen integriert ist. Es handelt sich hierbei um eine Vorstufe eines «gezüchteten» Gelenks. Es gibt hierfür verschiedene Methoden. Bei einer dieser Methoden werden gezüchtete Zellen auf ein Trägermaterial (z.B. Hyaff 11®) gegeben, und dieses wird auf einen Leichenknochenzylinder befestigt. Das Zell-Knochen-Trägerkonstrukt wird in der Folge mit speziellen Nährböden über mehrere Wochen kultiviert (Abbildung 2). Das Resultat sind gezüchtete osteochondrale Zylinder, die zum Beispiel für einen isolierten osteochondralen Defekt an der Talusrolle (Sprunggelenk) verwendet werden könnten (6).

Die biomechanischen Eigenschaften der gezüchteten Konstrukte sind aktuell noch denen des nativen Knorpels unterlegen, deshalb würde sehr wahrscheinlich die Einführung eines solchen osteochondralen Zylinders in einen realen Defekt am Talus, zum Beispiel in Press-Fit-Technik, zu Schäden am Konstrukt führen. Wir haben deshalb eine mögliche Implantationstechnik publiziert, welche diese Schwächen der gezüchteten Konstrukte umgehen könnte (Abbildung 3). Die Technik besteht darin, den Zylinder nicht mit konventioneller Hammertechnik in den Defekt einzuschlagen,

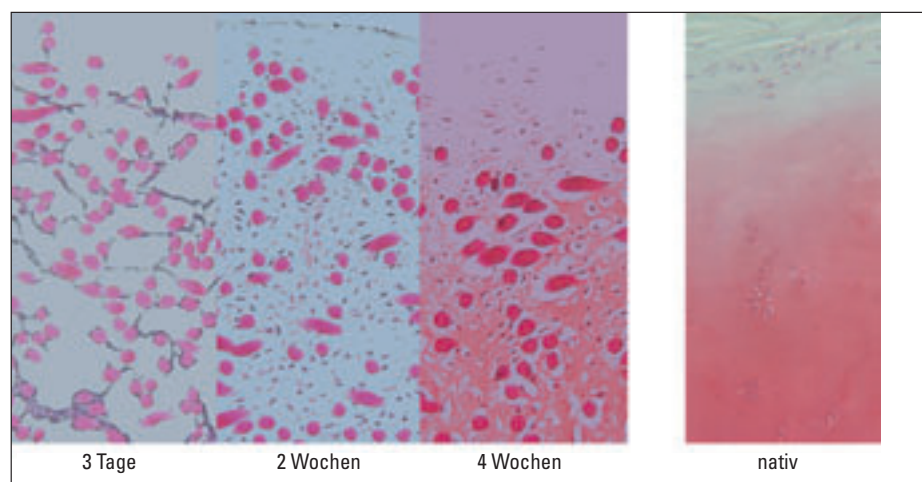


Abbildung 1: Histologische Schnittbilder von gezüchtigtem Knorpel in den verschiedenen Phasen der Knorpelmatrixbildung im Vergleich zu einem histologischen Schnittbild eines nativen Gelenksknorpels (rechts). Schon nach vier Wochen Zellkultur eines mit expandierten Zellen besiedelten Trägermaterials (Hyaff 11®) weist eine intensive Färbung Hauptbestandteile des nativen Knorpels nach, die Glucosaminoglycane (Safranin-O-Färbung).

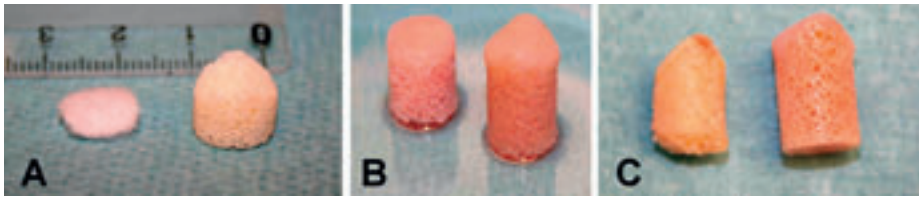


Abbildung 2: A: links der Hyaff 11®-Scaffold (Knorpelphase), rechts der Tutoplast®-Block (Knochenphase). B: gezüchtete osteochondrale Zylinder mit humanen expandierten Chondrozyten. C: rechts ein gezüchtetes Knorpelknochenkonstrukt, im Vergleich links im Bild ein Zylinder entnommen von einem Leichtenaluzylinder.

sondern das Konstrukt mittels Haltefäden in den Defekt einzuziehen (6).

Im «Bioreaktor Mensch» sollen diese implantierten Konstrukte weiter reifen und den Knorpelschaden möglichst wieder mit knorpelähnlichem oder eventuell sogar Knorpelgewebe ersetzen. Mithilfe der Implantation solcher im Labor gezüchteten Konstrukte könnte in Zukunft die von einer isolierten Knorpelläsion ausgehende Arthrose möglicherweise verhindert werden.

Der Einsatz von Bioreaktoren

In dem letzten Jahrzehnt haben sogenannte Bioreaktoren in den Knorpellabors Einzug gehalten. Es ist bekannt, dass physikalische Stimuli den Metabolismus der Chondrozyten und Osteoblasten modulieren und die Synthese von extrazellulärer Matrix erhöhen können, wenn

sie mit einer gewissen Frequenz und Intensität appliziert werden (7, 8). Deshalb wurden von verschiedenen Tissue-Engineering-Gruppen Bioreaktoren entwickelt, welche spezifische physikalische Kräfte nachahmen, die während der Gelenkbelastung entstehen, und die unter gewissen Umständen ein gelenkähnliches Milieu imitieren können.

Andere Bioreaktoren wurden entwickelt, um eine homogene Verteilung der Zellen auf die Trägermaterialien zu erreichen und gleichzeitig das Kulturmedium je nach Differenzierungsphase mit verschiedenen Wachstumsfaktoren zu versorgen und verschiedenste auf die Kultur positiv wirkende Parameter während der Kultivierungsphase zu regulieren (9).

Eine der grössten Herausforderungen, welche es in den nächsten Jahren zu bewältigen gilt, ist die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport metabolischer Ab-

bauprodukte im entstehenden Knorpel oder Knochengewebe während der Kultur. So ergibt sich bei der Kultivierung eines grossen Konstrukts zum Teil ein sehr schönes Gewebe in der Peripherie, während im Zentrum eine Nekrose entsteht. Mit Bioreaktoren konnte gezeigt werden, dass die Limitation des Transports dank Bioreaktoren verbessert (9) und genauer moduliert werden kann (10). Weitere Experimente in diesem Gebiet sind noch notwendig.

Was fehlt noch, um ein ganzes Gelenk im Labor herzustellen?

Rapid prototyping

Mithilfe einer in den Achtzigerjahren entwickelten Technik (rapid prototyping) ist es möglich, ein Objekt automatisiert genauestens nachzubilden. Man hat bereits erfolgreich versucht, aufgrund von 3D-Daten der Computertomografie eines nachzubildenden Gelenks, gekoppelt mit 3D-computerunterstütztem Design (computer added design [CAD]), anatomisch korrekt geformte Trägermaterialien nachzubilden (Abbildung 4). Diese Trägermaterialien könnten dann in der Folge mit expandierten Zellen besiedelt werden und in Bioreaktoren zu biologischen Gelenken herangezogen werden (11).

Herstellung eines Mandibulaköpfchens im «Reagenzglas»

Auf sehr ähnliche Art hat sich eine andere Arbeitsgruppe (12) aus Japan auf die In-vitro-Synthese von Mandibulaköpfchen konzentriert. Primäre mesenchymale Stammzellen einer Ratte wurden zu Chondrozyten und Osteoblasten differenziert und in eine Hydrogelsuspension gegeben. In der Folge wurden zwei separate Schichten dieses Hydrogel-Zell-Komposits durch sequenzielle Photopolymerisation in eine Form gebracht, welche einem menschlichen Mandibulakondyl entsprach. Das Endprodukt wurde zwölf Wochen im Subkutangewebe des Rückens einer immunodefizienten Maus kultiviert. Es konnte damit ein Konstrukt gezüchtet werden, welches die Form und Grösse des humanen Kondyls beibehalten hat; die radiologische Untersuchung ergab eindeutig Knochenformationen im Konstrukt. Histologisch zeigte sich eine klare zweischichtige Struktur mit einer Knorpelphase und einer Knochenphase und eindeutiger Integration beider Schichten. Die Architektur war einem normalen histologischen Präparat einer Ratte sehr ähnlich. Über die biomechanischen Qualitäten des Konstruktes wurden keine Angaben gemacht.

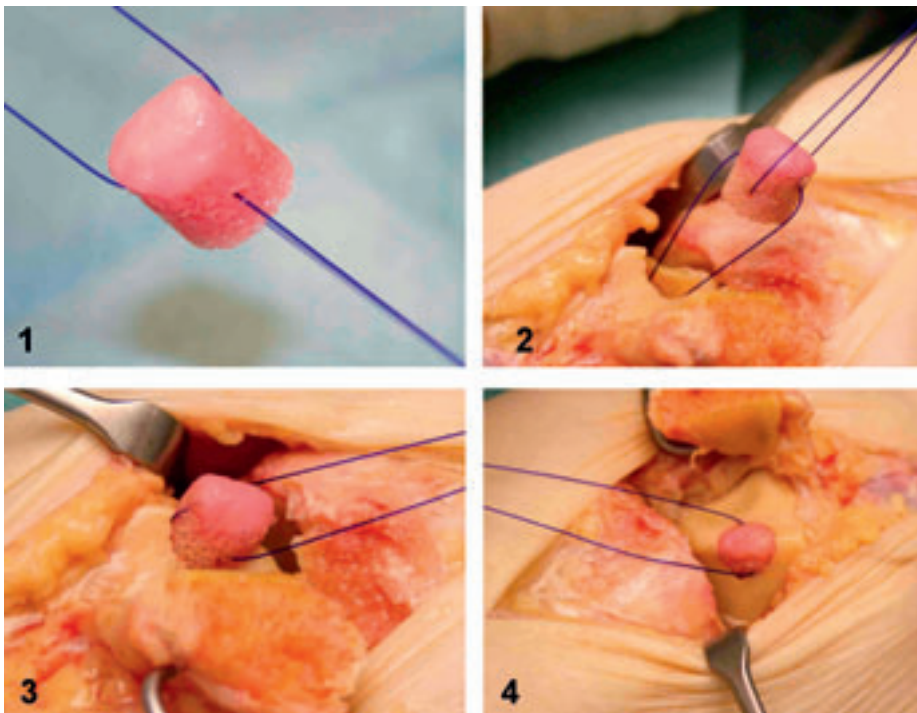
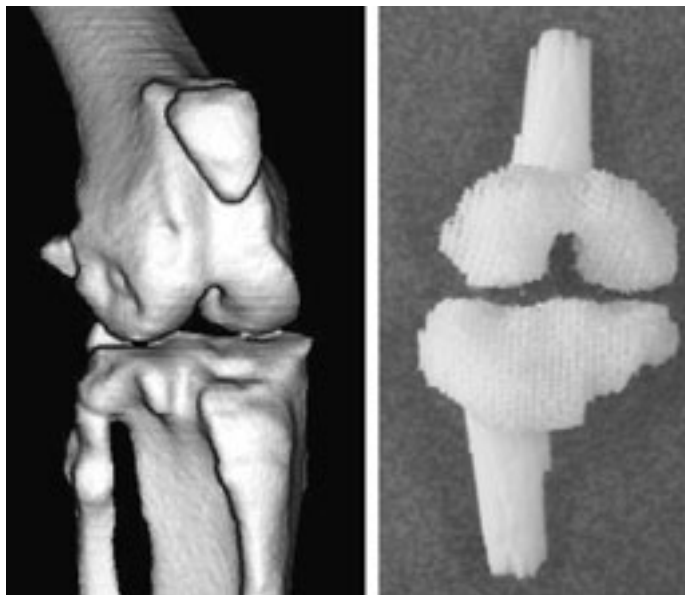


Abbildung 3: Darstellung einer möglichen Implantationstechnik eines gezüchteten osteochondralen Zylinders (1) am Leichenmodell. Der gezüchtete Zylinder wird von vorgelegten Fäden in den Defekt eingelegt und nicht hineingedrückt (2–4). Damit kann verhindert werden, dass die Zylinder beeinträchtigt werden.

Abbildung 4: Rapid prototyping für anatomisch geformte Träger. Mithilfe eines 3D-Modells, welches mithilfe der Computertomografie (links im Bild) eines Rattenknies generiert wurde, wird ein porotischer Träger aus speziellen Materialien automatisiert nachgebildet (rechts im Bild). Diese Bilder wurden freundlicherweise von Dr. T. Woodfield, Universität Twente, Holland, zur Verfügung gestellt.



In-vitro-Synthese einer Patella

Weitere Arbeitsgruppen berichteten (15) über erfolgreiche In-vitro-Synthese einer Patella. Dazu wurden zweiphasige Träger verwendet: eine untere Schicht aus Kalbsknochen, welche dank CAD anatomisch geformt und deren Oberfläche mit Chondrozyten besiedelt und mit Agarosegel bedeckt wurde. Die Kultur in vitro ergab schon nach sechs Wochen ein Konstrukt, welches makroskopisch, histologisch, biomechanisch und biochemisch sehr ähnliche Eigenschaften einer normalen Kalbspatella aufwies.

Conclusio

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die Weiterentwicklung des Tissue Engineering von Knorpel- und Knochengewebe in den nächsten Jahren beeindruckende Resultate verspricht. Ein erster Schritt könnten klinische Studien am Menschen mit gezüchteten osteochondralen Konstrukten sein, also ein partieller biologischer Gelenkersatz von Anteilen eines Gelenkes mit gezüchteten osteochondralen Konstrukten, zum Beispiel am Ta-

lus. Durch die Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften könnte es in Zukunft möglich sein, ein arthrotisch verändertes Gelenk mit einem in vitro gezüchteten Gelenk, also einem biologischen Gelenk, zu ersetzen. Viele Fragen, wie zum Beispiel die Integration und die Reifung der biologischen Gelenke innerhalb des «Bioreaktors Mensch», die optimalen Kulturbedingungen und das Zusammenspiel verschiedenster Wachstumsfaktoren, müssen in den nächsten Jahren noch geklärt werden. Insbesondere werden aber die erreichten biomechanischen Eigenschaften des zu implantierenden biologischen Gelenks entscheidend sein. ◆

Korrespondenzadresse:

Dr. med. Christian Candrian
 Departement Chirurgie
 Ospedale Regionale Lugano
 Via Tesserete 46
 6900 Lugano
 Tel. 091-811 61 25
 Fax 091-811 61 20
 E-Mail: christian.candrian@eoc.ch

Potenzielle Interessenskonflikte: keine

Literatur:

1. Radisic M. et al.: Cardiac Tissue Engineering using perfusion bioreactor systems. *Nat Protoc* 2008; 3 (4): 719–738.
2. Kusuhara H. et al.: Tissue engineering a model for the human ear: assessment of size, shape, morphology and gene expression following seeding of different chondrocytes. *Wound Repair Regen* 2009; 17 (1): 136–146.
3. Brittberg M. et al.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331 (14): 889–895.
4. Haisch A. et al.: The morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue engineered human septal cartilage. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262 (12): 995–997.
5. Duda G.N. et al.: Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo. *J Biomed Mater Res* 2000; 53 (6): 675–677.
6. Candrian C. et al.: A novel implantation technique for engineered osteochondral grafts. *Knee Surg Traumatol Arthrosc* 2009; Mar 21 (Epub ahead of print).
7. Demarteau O. et al.: Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2005; 310 (2): 580–588.
8. Candrian C. et al.: Engineered cartilage generated by nasal chondrocytes is responsive to physical forces resembling joint loading. *Arthritis Rheum* 2008; 58 (1): 197–208.
9. Davisson T. et al.: Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocytes three dimensional cultures. *Tissue Engineering* 2002; 8 (5): 807–816.
10. Wendt D. et al.: Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology* 2006; 45 (3–4): 481–488.
11. Woodfield T. et al.: Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using three dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials* 2004; 25 (18): 4149–4161.
12. Alhadlaq A. et al.: Tissue engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 2005; 87: 936–944.
13. Hung C. et al.: Anatomically shaped osteochondral constructs for articular cartilage repair. *Journal of Biomechanics* 2005; 36: 1855–1864.