

# Züchtung menschlichen Knorpelgewebes mit Hilfe einer Perfusionskammer

J. Bujia<sup>1</sup>, M. Sittinger<sup>3</sup>, C. Hammer<sup>2</sup>, G. Burmester<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten der LMU München (Direktor: Prof. Dr. E. Kastenbauer)

<sup>2</sup> Institut für Chirurgische Forschung, Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Meßmer)

<sup>3</sup> Institut für Klinische Immunologie und Rheumatologie Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. J. Walden)

## Zusammenfassung

Durch das begrenzte Angebot an frischem autologem Knorpeltransplantatgewebe wird in der rekonstruktiven Chirurgie im Kopfbereich oft auf avitales konserviertes Knorpelgewebe zurückgegriffen. Eine geeignete Methode zur in-vitro-Herstellung von Knorpelgewebe mit lebenden Zellen ist nur durch moderne Gewebekulturmethoden möglich, die die Erhaltung der phänotypischen Charakteristiken von Chondrozyten erlauben. Unter dieser Zielsetzung wurden menschliche Chondrozyten isoliert und in "low-melting" Agarose suspendiert. Das Konglomerat Zellen/Agarose wurde in eine Perfusionskammer für dreidimensionale Kultur eingebracht. Mit einer langsamen Peristaltikpumpe wurde in variablen Intervallen frisches Medium (Hams-F12 + 2% FCS + 50 µg/ml Ascorbinsäure) durch die Kammer mit einer Geschwindigkeit von 1 cm/h gepumpt. Der Differenzierungsgrad der Chondrozyten sowie die Proteoglykan- und Kollagen-Synthese wurde mit Hilfe von immunhistochemischen (APAAP-Immunfärbung) bzw. histochemischen (Azan-Färbung und Toluidin-Blau-Metachromasie) Methoden bestimmt. Die Chondrozyten behielten in dreidimensionalen Kultursystemen sowohl ihre morphologischen, phänotypischen als auch funktionellen Eigenschaften. Zusätzlich konnte eine Akkumulation von Matrixprodukten in der Umgebung der Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß durch dieses automatisierte dreidimensionale Kultur-Modell eine in-vitro-Herstellung von Knorpelgewebe für die Transplantation möglich ist.

## Schlüsselwörter

Knorpeltransplantation – Chondrozyten – Zellkultur

## Engineering Human Cartilage Tissue Using a Perfusion Chamber

In the field of otolaryngology cartilage grafting is commonly performed to reconstruct skeletal defects. Knowledge of chondrocyte growth and differentiation can now be used to engineer cartilage tissue for grafting. The first condition is that chondrocytes maintain their differentiated phenotype besides being able to produce a new cartilage matrix. The target of this study was to develop a three-dimensional culture system for in-vitro formation of vital cartilage transplants. Chondrocytes were isolated by digesting the cartilage matrix with collagenase and hyaluronidase. After embedding in "low-melting" agarose, the chondrocytes were placed into a perfusion culture chamber to provide a constant supply of nutrients to the cultures. The peristaltic pump was operated with on/off intervals of 30 min. Ham's F12 supplemented with 2% FCS and 50 µg/ml ascorbic acid was employed as culture medium. Monoclonal antibodies specific to collagens type I and type II were used to characterise cells and matrix synthesis. Synthesis of proteoglycans and collagens was achieved using toluidine blue and azan staining. Under the described culture conditions, the chondrocytes maintained a differentiated phenotype (expression of collagen type II) with synthesis of collagens and proteoglycans. An accumulation of matrix products was achieved pericellularly. After 2–8 weeks the obtained tissue exhibited an excellent histological appearance showing the typical features of cartilage tissue. The results show that the perfusion chamber allows a quick in-vitro fabrication of a piece of pure cartilage tissue for transplantation.

## Key words

Cartilage grafting – Chondrocytes – Cell culture

## Einleitung

Knorpelgewebe besitzt nur eine geringe Regenerationsfähigkeit, die es ausschließlich dem Perichondrium verdankt. Die Transplantation von Perichondrium-Transplantaten läßt sich jedoch nur mit begrenztem Erfolg zur Knorpelreparation einsetzen (15). Daher werden in der rekonstruktiven Chirurgie gewöhnlich Knorpeltransplantate zur Rekonstruktion

von Defekten verwendet (12, 14). Hierfür wird idealerweise autologes Knorpelgewebe verwendet. Da dieses nur begrenzt zur Verfügung steht, werden häufig chemisch konservierte allogene Knorpeltransplantate verwendet. Dies ist jedoch aufgrund des Auftretens von Resorptions- und Abstoßungsreaktionen des verpflanzten Gewebes nicht unproblematisch (9). Weiterhin wird die Möglichkeit einer HIV (human immunodeficiency virus)-Übertragung kontrovers diskutiert (7, 8).

In den vergangenen Jahren wurden neue Kenntnisse über die Bedingungen, die das Chondrozytenwachstum in in-vitro-Kulturen fördern, gewonnen (2, 18). Diese Erfolge führten zur Transplantation von isolierten Chondrozyten und mesenchyalem Gewebe als eine Möglichkeit, den Knorpelaufbau zu induzieren. Weiterhin konnten einige experimentelle Untersuchungen zeigen, daß das Einbringen von Stammzellen in die verletzte Region die Wundheilung beschleunigen kann (10, 11, 19). Eine weitere vielversprechende Methode für die Gewebetransplantation in der rekonstruktiven Chirurgie der Zukunft könnte eine gezielte in-vitro-Züchtung von Knorpelgewebe sein (6). In der vorliegenden Untersuchung wurde eine dreidimensionale Kulturmethode zur in-vitro-Fertigung von Knorpeltransplantaten etabliert.

## Material und Methoden

### Isolierung von Chondrozyten

Gesundes Knorpelgewebe (n = 12) wurde von Patienten im Rahmen von rekonstruktiven Eingriffen an der Nase entnommen. Die Knorpelproben werden, wie andernorts früher beschrieben, aufbereitet (5). Das Knorpelgewebe wird vom Perichondrium befreit und fein zerkleinert. Die extrazelluläre Matrix wird über 12–18 h bei einer Temperatur von 37 °C und unter Zugabe von 2 ng/ml Kollagenase Typ II (Seromed, Berlin, Deutschland), 0,1 mg/ml Hyaluronidase (Serva, Berlin, Deutschland) und 0,15 mg/ml DNase (Paesel, Frankfurt, Deutschland) in RPMI 1640 Medium (Seromed) in kleinen Spinner-Flasks (Wheaton, USA) auf einem Magnetrührer bis zur Auflösung des Knorpels inkubiert. Die sich daraus ergebende Zellsuspension wird durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 88 µm filtriert und dreimal in Phosphat-gepuffertem Kochsalz (Seromed) gewaschen. Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt. Die Vitalität der Zellen wird durch Trypanblauausschluß bestimmt.

### Chondrozytenkulturen

Die gewonnenen Zellen werden in 2% "low-melting" Agarose (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) suspendiert und anschließend in ein kaltes Wasserbad von etwa 4 °C eingetaucht, worin sich die Agarose verfestigt.

Das Konglomerat Zellen/Agarose wird danach in der Perfusionskammer eingesetzt (Abb. 1). Dafür wird die von Prof. Minuth für Monolayer-Kultur entwickelte Perfusionskammer leicht modifiziert für dreidimensionale Kultur eingesetzt (17). Die Kammer (Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) besteht aus einem Gehäuse mit einer Zufuhrleitung für Nährlösung. An die Perfusionskammer schließt sich dann eine Abflußkammer an, aus der eine Abflußleitung zu einem Auffangbehälter führt. Das Gehäuse ist mit einer Abdeckung versehen und liegt auf einer Heizungsplatte mit gleichbleibender Temperatur von 37 °C. Durch die Perfusionskammer wird eine Nährlösung bestehend aus Ham's F12 (Seromed), 20% FCS (Böhringer, Mannheim, Deutschland) und 50 µg/ml Ascorbinsäure mittels einer peristaltischen Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 1 cm/h infundiert. Die peristaltische Pumpe wird mit Pump- und Pausenintervallen von jeweils 30 min eingesetzt. In unserer Studie betrug die gesamte Kulturzeit 2 Monate. Dabei wurden alle 7 Tage Proben entnommen, in Stickstoff eingefroren und 4–5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

### Identifikation des Zellphänotyps

Der Differenzierungsgrad der Chondrozyten wird mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk) gegen menschliches Kollagen-Typ-II (Chemicon, Tamecula, USA) bestimmt. Der mAk wird in der Alkaline-Phosphatase-anti-Alkaline-Phosphatase (APAAP)-Methode eingesetzt. Nach der einstündigen Lufttrocknung werden die Proben in kaltem Azeton und Methanol (1:1) für 90 s fixiert. Alle Antikörper-Verdünnungen werden in 5% Schweineserum durchgeführt (DAKO, Hamburg, Deutschland). Der zweite Antikörper (Kaninchen-Immunglobulin-gegen-Maus-Immunglobuline, DAKO)

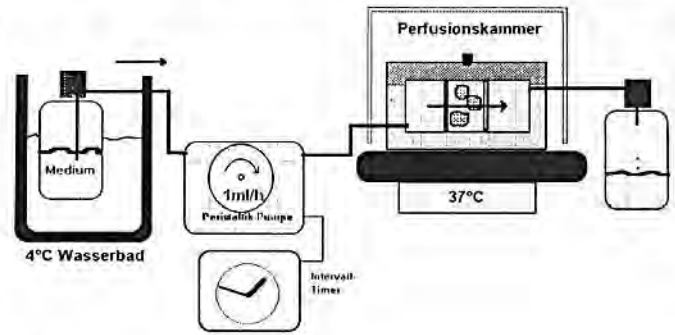


Abb. 1 Perfusionsystem

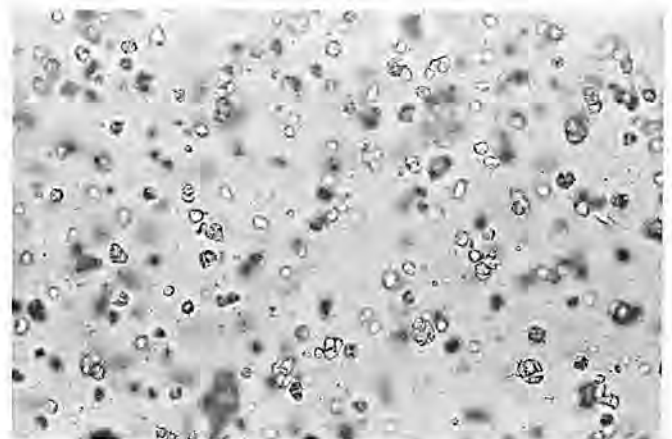


Abb. 2 Lichtmikroskopische Aufnahme von Chondrozyten, die in Agar eingebettet sind. Phasenkontrastmikroskop. Vergrößerung 100x.

und der APAAP-Komplex (DAKO) werden 1 : 100 verdünnt. Die Inkubationszeit beträgt für alle Antikörper und den APAAP-Komplex 30 min. Nach der Färbung mit Fuchsin werden die Schnitte mit Hämalum gegengefärbt. In der Negativkontrolle wird der erste Antikörper weggelassen, so daß keine Hintergrundanfärbung zustandekam.

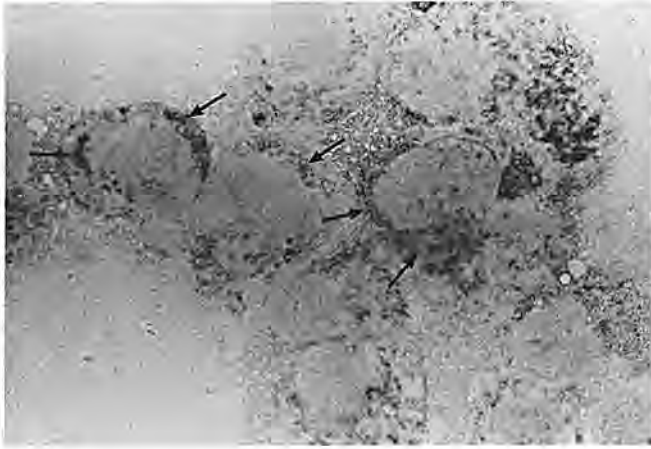
### Matrix-Synthese

Die Synthese von Proteoglykanen und Kollagenen wurde auf den Zytocentrifugenpräparaten und den Gefrierschnitten mit Hilfe der Azan-Färbung bzw. der Toluidin-Blau-Metachromasie bestimmt (1).

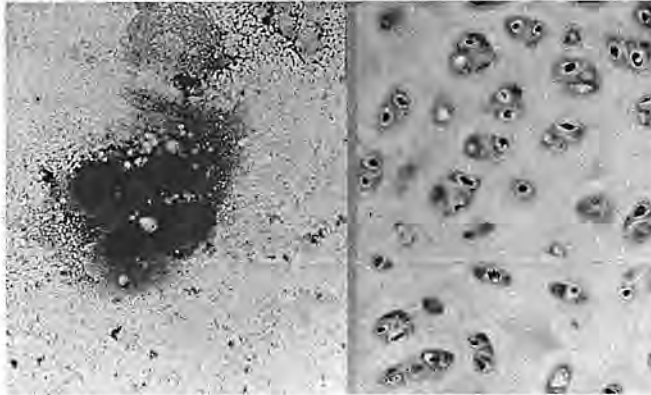
### Ergebnisse

Die isolierten Zellen zeigen hinsichtlich der Größe kleine Variationen mit einem runden oder leicht ovalen Kern und weisen Einschlüsse unterschiedlicher Größe im Zytoplasma auf. Die Zellen weisen während der gesamten Kulturzeit eine runde Konfiguration auf, wobei sich ausbreitende Zellkolonien beobachtet werden können (Abb. 2).

Während der gesamten Beobachtungszeit kann die Erhaltung des Chondrozyten-Phänotyps, d.h. die Expression von Kollagen-Typ-II und eine fehlende Expression von Kollagen-Typ-I durch die immunhistochemische Anfärbung bestätigt werden (Abb. 3). In der ersten Woche bilden sich einzelne runde Zellgruppen mit zwei oder mehr isogenen Zellen.



**Abb. 3** Lichtmikroskopische Aufnahme von Chondrozyten in Agar-Kultur. Alle Chondrozyten zeigen eine Expression von Kollagen-Typ-II (Pfeile). Gefrierschnitte, APAAP-Methode, Vergrößerung 100 x.



**Abb. 4** Lichtmikroskopische Aufnahme von Chondrozyten nach 15 (links) und 45 Tagen (rechts) in Kultur. Nach 15 Tagen kann deutlich eine perizelluläre Akkumulation von Kollagenen beobachtet werden. Nach 45 Tagen kann man de-novo gezüchteten Knorpel sehen. Gefrierschnitte. Links: Azan-Anfärbung, Vergrößerung 500 x. Rechts: Hämalaun-Färbung, Vergrößerung 200 x.

Nach Anfärbung der Zellen mit Toluidin-Blau bzw. Azan, wird eine perizelluläre Matrix sichtbar (Abb. 4). Nach sechs Wochen zeigt sich eine Knorpel-ähnliche histologische Struktur mit Chondronen und eine interterritoriale Matrix (Abb. 4). Während der gesamten Beobachtungszeit tritt weder eine bakterielle noch eine mykotische Infektion auf.

### Diskussion

Die Schaffung neuer Erkenntnisse über das Wachstum und die Differenzierung von Chondrozyten ist von essentieller Bedeutung für die Züchtung von vitalen Knorpeltransplantaten in der rekonstruktiven Chirurgie.

Die erste Vorbedingung hierfür ist, daß die gezüchteten Chondrozyten ihren differenzierten Phänotyp beibehalten. In früheren eigenen Arbeiten wurde daher eine Reihe von Zellkulturbedingungen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den differenzierten Phänotyp zu erhalten und sowohl die

Wachstumsrate als auch die Matrixsynthese von Chondrozyten zu fördern (6). Hierbei zeigte sich, daß nach der Gewinnung einer kleinen Anzahl von Knorpelzellen, z. B. aus Biopsieproben, diese sich im Monolayer vermehren und durch die Einbringung in Agar-Gel eine neue Matrix bilden können. Unter diesen Kulturbedingungen sind die Zellen nicht nur proliferationsfähig, sondern zeigen auch einen für Knorpel spezifischen Phänotyp (Expression von Kollagen-Typ-II) und produzieren schließlich eine extrazelluläre Matrix, die reich an Proteoglykanen und Kollagenen ist. Auf diese Art ist es möglich, ein solides Knorpelstück herzustellen. Falls die Herstellung des Knorpeltransplantats nicht unmittelbar notwendig ist, können die gewonnenen Zellen bis zum Gebrauch eingefroren werden (5). Die sich daraus ergebende Möglichkeit, große Mengen an differenzierten Chondrozyten aus einem kleinen Biopsiestück zu züchten, läßt diese Methode für die autologe Knorpeltransplantation besonders geeignet erscheinen.

Die Vorteile gegenüber normalen Kulturmethoden bestehen darin, daß der Zeit- und Personalaufwand sehr gering ist. Weiterhin sind keine großen Finanzinvestitionen nötig, da kein Brutschrank benötigt wird. Schließlich wird durch den Wegfall des Medium-Wechsels die Möglichkeit einer heterogenen Ernährung und das Auftreten von Infektionen vermieden. Durch die Perfusion wird sichergestellt, daß die innerhalb der Trägerstruktur (Agar) gelegenen Zellen ausreichend mit Nährlösung versorgt werden und daß diese Versorgung aufrechterhalten bleibt, wenn sich die interzelluläre Matrix zumindest teilweise aufgebaut hat.

Einige technische Einzelheiten sollen an dieser Stelle betont werden. Während der Vorbereitung der Agarosekulturen soll die Zellsuspension in Agarose möglichst bei 37 °C flüssig gehalten werden, um eine gute Vermischung zu ermöglichen. Für biochemische Studien der Eigenschaften dieser Kulturen kann die Trennung von Zellen und Agar durch Agarase erfolgen. Jedoch scheint für diese Kulturmethode die Immunhistochemie die geeignete Methode zu sein, da auf diese Art die spezifischen Zellen und ihre umgebende Matrix nach der Fixierung, Schnitthanfertigung und Anfärbung mikroskopisch untersucht werden können. Da Fibroblasten in Agar-Gel nicht wachsen (13), erlaubt diese Methode außerdem auch die Vermeidung einer Kontamination der Kulturen durch Fibroblasten aus dem Perichondrium.

Der schnelle Verlust des Knorpel-spezifischen Phänotyps, d. h. der schnelle Rückgang an Synthese von Kollagen-Typ-II und Beginn der Herstellung von Kollagen-Typ-I und -III (3, 16) stellen eine sehr wichtige Einschränkung der Amplifikationsphase dar. Jedoch konnten *Benya* u. *Schaffer* (4) zeigen, daß Chondrozyten von Kaninchen als dedifferenzierte Zellen in großer Menge gezüchtet werden können, um die Zellzahl zu vermehren und anschließend durch Einbringung in Agarose-Subkultur zu einer Reexpression ihres Chondrozyten-Phänotyps veranlaßt werden können.

Chondrozyten in unserem Kulturmodell lagerten eine extrazelluläre Matrix ab und entwickelten im Verlauf der Kulturzeit eine Knorpel-ähnliche histologische Architektur. Die Bildung einer umgebenden Matrix kann durch eine langsame Diffusion der Matrix-Moleküle durch das Agar-Gel erklärt werden. Die Bildung einer extrazellulären Matrix war zu Beginn schnell und nahm schließlich zunehmend ab, am ehesten wegen eines Matrix-abhängigen negativen Feedback-Mechanismus.

mus. Eine Vielzahl an wichtigen Variablen für eine ideale in-vitro-Züchtung von Knorpelgeweben bedarf noch der weiteren sorgfältigen Bearbeitung. Dies schließt die Entwicklung verbesserter reabsorbierbarer Trägersubstanzen, die die Zellfunktion unterstützen und die von Anfang an eine gewisse Festigkeit anbieten ein. Hier kämen verschiedene Biomaterialien in Frage, die nicht nur ein permissives Milieu für die Zellproliferation und Matrixherstellung anbieten könnten, sondern auch biokompatibel und reabsorbierbar sein sollten.

### Danksagung

Die Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-BU-755) gefördert.

### Literatur

- 1 *Arnold, M.*: Histochemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968)
- 2 *Aulhouse, A. L., M. Beck, E. Griffey, J. Sanford, K. Arden, M. A. Machado, W. A. Horton*: Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cel. Devel. Biol.* 25 (1989) 659–669
- 3 *Benya, P. D., S. Padilla, M. E. Nimmi*: Independent regulation of collagen types of chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15 (1978) 1313–1321
- 4 *Benya, P. D., J. D. Chaffer*: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cells* 30 (1982) 215–224
- 5 *Bujía, J., P. Pitzke, E. Wilmes, C. Hammer*: Culture and cryopreservation of chondrocytes from human cartilage: relevance for cartilage allografting in otolaryngology. *ORL* 54 (1992) 80–84
- 6 *Bujía, J., M. Sittinger, P. Pitzke, E. Wilmes, C. Hammer*: Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *ORL* 55 (1993) 347–351
- 7 *Bujía, J., P. Pitzke, E. Wilmes, C. Hammer, L. Gürtler*: Critical analysis of human immunodeficiency virus transmission using human cartilage allografts. *Eur. Arch. Otolaryngol.* 250 (1993) 55–58
- 8 *Bujía, J., H. Meyer, C. Hammer, E. Wilmes, L. Gürtler*: Human immunodeficiency virus cannot productively infect freshly cultured human cartilage cells. *ORL* 55 (1993) 222–225
- 9 *Gibson, T.*: Cartilage grafts. *Br. Med. Bul.* 21 (1965) 153–156
- 10 *Green, N. T.*: Articular cartilage repair. Behaviour of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting during tissue culture and subsequent allografting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 124 (1977) 237–250
- 11 *Hansen, A. L., B. K. Foster, G. Gibson, G. F. Binns, O. W. Wiebkin, J. J. Hopwood*: Growth-plate chondrocyte cultures for reimplantation into growth-plate defects in sheep. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 256 (1990) 286–298
- 12 *Hellmich, S.*: Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich. *HNO* 30 (1982) 140–144
- 13 *Horwitz, A., A. Dorfman*: The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension. *J. Cell. Biol.* 45 (1970) 434–438
- 14 *Kastenbauer, E. R.*: Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich. *HNO* 31 (1983) 371–380
- 15 *Kwan, M. K., S. L. Y. Woo, D. Amiel, J. B. Kleiner, F. P. Field, R. D. Coutts*: Neocartilage generated from rib perichondrium: a long term multidisciplinary evaluation. *Trans. 33rd Orthop. Res. Soc. Meeting* 12 (1987) 277
- 16 *Mayne, R., M. Vail, P. M. Mayne, E. J. Miller*: Changes in the type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1674–1678
- 17 *Mimath, W. W., U. Rudolph*: A compatible support system of cell culture in biomedical research. *Cyto Technology* 4 (1990) 1881–1889
- 18 *von der Mark, K.*: Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatology* 10 (1986) 272–315
- 19 *Wakitani, S., T. Kimura, A. Hirooka, T. Ochi, M. Yoneda, N. Yasui, H. Owaki, K. Ono*: Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J. Bone Joint Surg. (Br.)* 71 (1989) 74–80

Dr. Dr. Jesús Bujía

HNO-Klinik und Poliklinik  
Klinikum Großhadern  
Marchioninistraße 15  
81377 München