

Maya Niethard
Dr. med.

Differenzierungsverhalten humaner adulter Chondrozyten unter therapeutischen Gesichtspunkten

Geboren am 26.08.1977 in Heidelberg
Reifeprüfung am 25.06.1996 in Neckargemünd
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996/1997 bis WS 2003/2004
Physikum am 07.09.1998 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg und Darmstadt
Staatsexamen am 25.11.2003 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. Reinhard Wallich

Diese Arbeit sollte den Einfluss der Kultivierungsmöglichkeiten humaner Chondrozyten in einer 3-dimensionalen Kollagenmatrix auf die Fähigkeit zur Rekonstruktion hyalinen Knorpels untersuchen und gleichzeitig ein geeignetes Analyseverfahren mittels diagnostischer Marker zur Qualitätssicherung der Zellen definieren. Für den Einsatz des „tissue engineering“ in der Praxis ist es vonnöten, die Kulturbedingungen der für eine Transplantation gedachten Chondrozyten zu standardisieren und eine routinemäßige Qualitätssicherung durchzuführen. Um eine Vergleichbarkeit von Studienergebnissen aus der Literatur zu gewährleisten, muss das Patientengut nach bestimmten Kriterien ausgewählt werden.

Die Tabelle 1 zeigt die klinische Situation für die Transplantation einer 3-dimensionalen Matrix (*)), sowie für die ACT (**)). Die Übersicht macht durch ihre Lücken deutlich, dass sich die meisten Studien nicht an der klinischen Situation orientieren. Unsere Studie ist ein erster Ansatz, diese Lücke für transplantierbare Matrices zu füllen.

Aus dem Vergleich der Daten der Knorpelzellen über verschiedene Passagestufen (P00-P4) und den P0-Zellen 3-dimensional sowie 2-dimensional ist ersichtlich, dass aufgrund der zunehmenden Expression von Kollagen 1 und der zurückgehenden Expression von Kollagen 2, die Zellen in einem frühen Stadium, d. h. als P0-Zellen, in Kultur zu bringen sind. Um gute Ergebnisse zu erzielen, müssen diese Zellen zu einem frühen Zeitpunkt, möglichst unter 2 Wochen, der weiteren Verarbeitung zugänglich gemacht werden.

Die in dieser Studie ausnahmslos aus arthrotischen Gelenken verwandten humanen Chondrozyten zeigten trotz ihrer Veränderungen ein gutes Wachstumsverhalten, was als Grundvoraussetzung für die Versuchsreihe anzusehen war. Große inter- sowie intrakulturelle Variabilitäten hinsichtlich Proliferation sowie Expression der verschiedenen Marker des Knorpelmetabolismus machten die große Individualität bei humanen Zellen deutlich. Von den untersuchten Markern Kollagen 1, Kollagen 2, MIA und Aggrecan konnten wir für die beiden letztgenannten die in der Literatur angeführte Eigenschaft als diagnostische Marker für Chondrozytenqualität nicht bestätigen.

Eine minimal-invasive Diagnostik durch eine ELISA-Aufarbeitung von Kulturmedienüberständen für die Marker MIA oder GAG stellte sich nicht als individuell sensitiver Parameter für die Chondrozytenqualität heraus. Dieser einfache und kostengünstige Weg steht somit nicht als routinemäßige Qualitätskontrolle zur Verfügung.

Die Analyse im LightCycler wird mit den Eigenschaften der Präzision, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit den Anforderungen an eine in der Praxis anzuwendende, routinemäßige Qualitätskontrolle gerecht. Der Ansatz, die Zellen in einem 3-dimensionalen Kollagenkissen zu kultivieren ist erfolgsversprechend. Bei arthrotisch veränderten Zellen reicht dies jedoch allein nicht aus, da es zu einer Dedifferenzierung der Zellen führt. Der für eine Transplantation und die Neubildung hyalinen Knorpels ausschlaggebende chondrozytenspezifische Phänotyp geht verloren.

Dennoch bietet die 3-dimensionale Kollagen 1-Matrix hinsichtlich ihrer Eigenschaften (Verfügbarkeit, homogene Zellverteilung, Stabilität) und Verarbeitungsmöglichkeiten gegenüber anderen Transplantationsverfahren, wie der ACT oder anderen 3-dimensionalen Strukturen, entscheidende Vorteile.

Mit einer laufenden klinischen Studie wird auf den hier erarbeiteten Grundlagen aufgebaut. Dazu gehören die Entnahme minimaler Chondrozytenmengen, kurzzeitige, möglichst unpassagierte Kultivierung, Einbettung in eine 3D-Matrix sowie schonendes Einsetzen in einen definierten Knorpeldefekt.

Große Hoffnungen liegen außerdem im Feld der Gen-Stimulation (z. B. genaktivierte Matrices), mit deren Hilfe die Kultivierungsbedingungen soweit optimiert werden sollen, dass der Phänotyp der Chondrozyten über den gesamten Kultivierungsabschnitt erhalten bleiben soll.

Aus den angeführten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Kultivierung humaner Chondrozyten in einer 3-dimensionalen Matrix allein nicht ausreicht, um eine Dedifferenzierung der Zellen zu verhindern. Des Weiteren ist es notwendig, die Kultivierungsmethoden humaner Chondrozyten zu standardisieren und einer Qualitätssicherung zugänglich zu machen.