

1. Einleitung

Mit der Methode des Tissue Engineerings besteht die Möglichkeit, für Patienten mit kongenital, traumatisch oder tumorresektionsbedingten Defekten aus körpereigenen Zellen im Labor autologen Gewebeersatz herzustellen. Dazu werden sowohl spezifische differenzierte Zellen des zu ersetzenden Gewebes als auch undifferenzierte Zellen verwendet. So können multipotente Zellen des Knochenmarks oder des Periosts die Regeneration mesenchymaler Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskel, Sehne, Band oder Stroma bewirken (1-5). Besonders in der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie besteht durch den Mangel an Substanz eine große Nachfrage nach Ersatzgewebe, welches kosmetisch den Anspruch hat, dem ursprünglichen Organ (Ohrmuschel, Nasenknorpel) nahezu identisch zu sein.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung von autologen Ohrchondrozyten-Transplantaten beim Schwein, die dorsal subkutan implantiert werden und mit den Untersuchungen der entzündlichen Reaktionen des Organismus auf das transplantierte Gewebe. Im Gegensatz zu Gelenktransplantaten stellt diese Form der Implantation eine deutlich stärkere immunologische Exposition dar. Um eine Transplantatprotektion zu erzielen, wird eine Immunmodulation durch den Einsatz von Glukokortikoiden angestrebt. Voraussetzung für die Herstellung eines dreidimensionalen, implantierbaren Zellgewebes ist eine ausreichende Zellzahl, um das benötigte Gewebavolumen mit der gewebetypischen Zelldichte auszufüllen.

2. Schrifttum

2.1 Tissue Engineering

2.1.1 Definition

Den Begriff Tissue Engineering verwendeten erstmals 1987 Vertreter der US-amerikanischen National Science Foundation (NSF) in Washington, DC. Ein Jahr später auf der ersten Konferenz zum Tissue Engineering in Lake Tahoe in Kalifornien wurde folgende Definition geprägt: „Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkungen von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“ (6).

2.1.2 Prinzip

Hinter dem Tissue Engineering verbirgt sich „Zell und Gewebetechnik“ oder „Gewebeonstruktion“, die die Kultivierung und Vermehrung lebender Zellen von Mensch und Tier außerhalb des Organismus im Labor (*in vitro*) beinhaltet (6). Das Tissue Engineering ist ein Verfahren, bei dem die Materialeigenschaften von synthetischen Komponenten so verändert werden, dass es möglich wird, Aggregate von dissoziierten Zellen in Empfängerorganismen einzubringen, woraus schließlich neues funktionelles Gewebe entstehen kann. Es wird dem Patienten eine autologe Gewebeprobe entnommen, die Zellen werden isoliert, vermehrt und nach Verkapselung der Zellen in biologischen Komponenten mit synthetischen, biokompatiblen, biodegradierbaren Polymeren vereinigt und gegebenenfalls nach Hinzusetzen von Differenzierungsfaktoren dreidimensionale Konstrukte hergestellt, die nachfolgend wieder in den Organismus des Patienten implantiert werden (Abbildung 1).

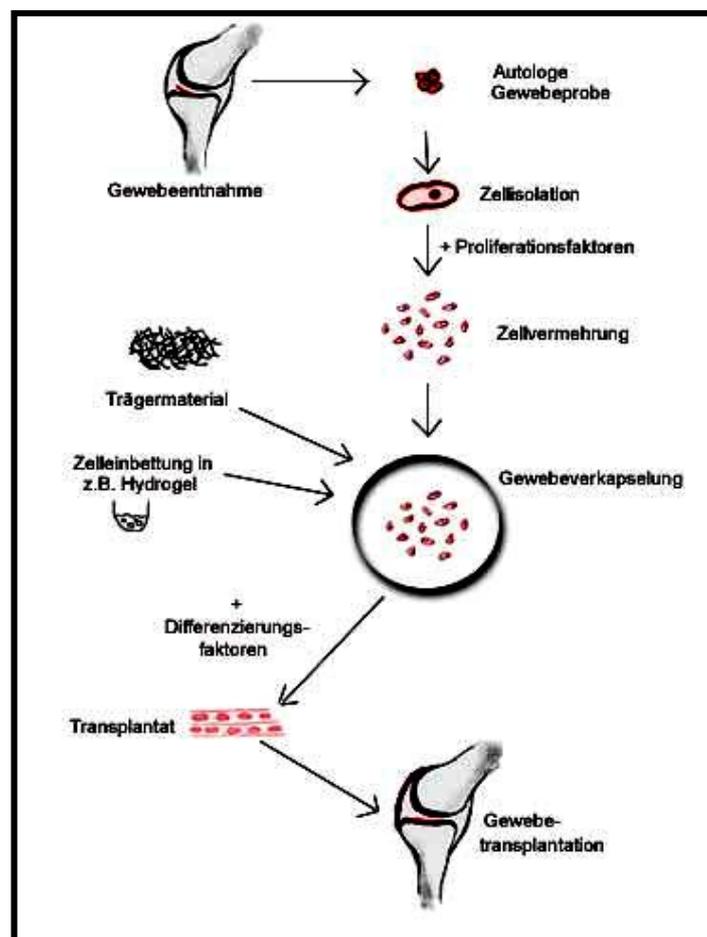


Abbildung 1: Prinzip des Tissue Engineerings (Quelle: Arbeitsgruppe TE der Charité Berlin)

Beim Tissue Engineering folgender Studie wird dem Spender Knorpelgewebe entnommen, die Zellen werden enzymatisch isoliert und in einer Monolayer-Kultur vermehrt (7, 8). Bei Erreichen einer ausreichend hohen Zellzahl werden die Chondrozyten in eine dreidimensionale Anordnung überführt, indem sie auf ein synthetisches, biokompatibles, biodegradierbares Trägermaterial gebracht werden (9-11). Anschließend wird dieses Konstrukt dem Knorpelspender reimplantiert (12, 13). Voraussetzung für einen langfristigen operativen Erfolg ist die Aufrechterhaltung der Funktion der reimplantierten Knorpelzellen. Der elastische adulte Ohrknorpel besteht aus kaum teilungsfähigen Chondrozyten und einer durch sie exprimierten knorpelspezifischen Matrix, deren Hauptbestandteil Kollagen Typ II und eine amorphe Grundsubstanz ist, die sich neben den Proteoglykanen aus Glykoproteinen und interstitieller Flüssigkeit zusammensetzt.

2.1.3 De – und Redifferenzierung der Chondrozyten *in vitro*

Nachdem die Zellen im ersten Schritt des Tissue Engineerings isoliert worden sind, büßen sie im weiteren Laufe der Amplifizierung ihre spezifischen Eigenschaften ein (7, 14). Zugunsten der Erhöhung der Teilungsfähigkeit verlieren sie zunehmend die Fähigkeit, Knorpelmatrix zu produzieren. Dieser Vorgang des Verlusts des knorpelspezifischen Phänotyps wird als Dedifferenzierung bezeichnet (15). Dabei findet ein Wechsel der Kollagenproduktion von Typ II zu Typ I und III sowie Fibronectin statt und die Zellen ändern ihren kugelig-ovalen Phänotyp in den einer spindelförmigen fibroblastoiden Zellmorphologie (16, 17).

Die Induktion einer Redifferenzierung stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um eine dem nativen Knorpel ähnelnde Struktur zu erlangen. 1982 wurde dieses erstmals von Benya et al. beschrieben, der Kaninchen-Chondrozyten zwei Wochen lang kultivierte (18). Dieses Phänomen konnte auch bei humanen Knorpelzellen nachgewiesen werden (19). Für eine gewebetypische Differenzierung ist eine geeignete Gewebeunterlage nötig, die eine optimale Zellverankerung ermöglicht (20-22). Besonders gute Erfolge konnten bei der Verankerung der Zellen auf Filterunterlagen, Vliesen, bioabbaubaren polymeren oder schwammartigen Matrices erzielt werden (23, 24). Auf diese Weise kann dem sich ausbildenden neuen Gewebe eine definierte Wachstums- und Ausbreitungsrichtung vorgegeben werden. Eine Differenzierung kann noch zusätzlich durch die Zugabe von löslichen Differenzierungsfaktoren und Hormonen ins Kulturmedium verbessert werden (25, 26). Serum als Zusatz zu den Zellkulturmedien liefert Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze,

Spurenelemente sowie Puffer- (NaHCO_3) und Neutralisationssysteme, z.B. Albumin oder Immunglobuline (27, 28). Fetales Kälberserum (FCS) wird beim Schlachten der Muttertiere aus Blut von Feten im dritten bis siebten Trächtigkeitsmonat gewonnen. Es wird angenommen, dass beim natürlichen Gerinnungsvorgang von Thrombozyten einige für die Vermehrung der Zellen in Kultur scheinbar äußerst wichtige Wachstumsfaktoren in das Serum abgegeben werden (27). Bei einer Kultivierung der Zellen in Alginat, einem aus Braunalgen isolierten Polysaccharid, das in der Anwesenheit von Calcium polymerisiert, behalten die Zellen ihre differenzierte Erscheinungsform über viele Monate (29-31). Allerdings ist ihre Amplifizierungsrate von 30 % im Vergleich zur Monolayerkultur relativ gering (32).

2.1.4 Trägermaterialien

Geeignete Trägermaterialien sind die Voraussetzung dafür, Gewebe definierter Form aufzubauen. Die *in vitro* vermehrten Zellen erhalten somit eine Leitschiene, die deren Wachstumsrichtung und damit die Struktur des präformierten Ersatzgewebes vorgibt. Voraussetzung für einen Einsatz im medizinischen Bereich ist zunächst die Bioverträglichkeit und die Bioabbaubarkeit. Unter bioverträglichen Materialien versteht man Stoffe, die im Sinne der Toxizität, Cancerogenität und Mutagenität als unbedenklich gelten. Als bioabbaubar werden Stoffe bezeichnet, die im tierischen oder menschlichen Organismus Auflösungserscheinungen zeigen. Diese Faserauflösung kann entweder über enzymatische Abbaureaktionen oder durch Hydrolysereaktionen stattfinden. Hutmacher (33, 34) fasst die Anforderungen, die die Trägermaterialien erfüllen sollten, um einen erfolgreichen Einsatz in der Medizin zu finden, in vier Punkten zusammen:

- 1.) Das Biomaterial sollte dreidimensional sein und eine möglichst große innere Oberfläche haben, damit Voraussetzungen für Zellwachstum sowie Transport von Nährstoffen und metabolischen Abfallstoffen bestehen.
- 2.) Es sollte biokompatibel und bioresorbierbar sein und einem kontrollierten Degradationsprozess mit definierter Resorptionsrate unterliegen, die einen ausreichenden Zeitraum für das Zell- und Gewebewachstum *in vitro* und *in vivo* bietet.
- 3.) Die chemische Zusammensetzung sollte günstig sein, so dass Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung ungestört ablaufen können. Während des Degradationsprozesses dürfen keine toxischen Substanzen frei gesetzt werden.

4.) Die mechanischen Eigenschaften sollten aus funktionellen Gründen dem Umgebungsgewebe ähnlich sein und auch während der Degradationsphase ausreichend stabil bleiben.

Darüber hinaus sollten *in vivo* keine Reaktionen des umgebenden Gewebes im Sinne einer Kapselbildung, Einsprossung von Blutgefäßen oder Einwanderung von Entzündungszellen nachweisbar sein (35). Ist dieses der Fall, ist ein Verlust des Transplantats möglich. Die beim Degradationsprozess anfallenden Abbauprodukte sollen keinesfalls die Zellfunktion negativ beeinflussen (36).

Vielmehr sollen durch die Bedingungen der zellulären Mikroumgebung die Zellproliferation, der zelluläre Phänotyp und die Matrixsynthese positiv beeinflusst werden (37-40). Ferner sollten allogene und xenogene Zellen vor immunologischen Reaktionen geschützt werden (41, 42).

Ziel muss es sein, Trägermaterialien zu finden bzw. zu kombinieren, die eine höchstmögliche Zellvermehrungsrate gewährleisten bei gleichzeitiger Redifferenzierung der Zellen in Knorpelmatrix produzierende Chondrozyten.

2.1.4.1 Ethisorb®

Bei diesem Trägermaterial handelt es sich um eine dreidimensionale Anordnung zweier resorbierbarer Kunststoffe, die mittels Wärmebehandlung miteinander verklebt werden. Polyglactin (Vicryl®, Polyglykolid-Polylaktid), mit einem Schmelzpunkt bei ca. 200°C, und Poly-p-Dioxanon (PDS®), das bei einer Temperatur von ca. 100° C schmilzt, werden auf eine Temperatur > 100° C erhitzt. Als Folge erhält man ein Kopolymer-Vlies, dessen 12 µm dünnen Filamente durch die PDS-Schmelzen punktuell in ihrer Form fixiert werden beziehungsweise von dieser teilweise umschlossen werden. Die Schmelzen haben eine Größe von etwa 0,5 mm x 0,3 mm. Bei Implantationsuntersuchungen beobachtet man am 7. Tag nach Implantation bis in zentrale Bereiche hinein ein feinmaschiges Fibringespinnst, das aber nach 14 Tagen wieder abgebaut ist. Am Rand beginnt sich ein bindegewebige Durchbauung zu manifestieren. Fibroblasten bilden Kollagenfasern, die sich parallel der Vicryl-Filamente ausrichten. Nach ca. 21 Tagen zeigen diese Filamente erste feine, querverlaufende Risse. Vom 28. Tag an manifestiert sich eine Gewebereaktion auf das Transplantat: Die Vicryl®-Filamente sind gesäumt von Fremdkörperriesenzellen und einem kollagenen Netzwerk.

Außerdem durchziehen Blutgefäße das gesamte Vlies. Zunehmend wird der Faserverbund

brüchiger, am Tag 52 ist die Resorption der Polyglactin-Filamente abgeschlossen. Die entstandenen Hohlräume werden bindegewebig ausgefüllt. Um den 180. Tag nach Implantation ist auch die Resorption der zunehmend kleiner gewordenen PDS-Schmelzen abgeschlossen, womit auch die Fremdkörperreaktion erlischt.

Der Abbau des Polyglactins erfolgt durch Hydrolyse im Rahmen des Kohlenhydratstoffwechsels, bei Poly-p-Dioxanon erfolgt er durch Hydrolyse zu Kohlendioxid und Wasser (43).

Zusammenfassend erfüllt Ethisorb® folgende Voraussetzungen: Es ist resorbierbar, stabil und es kann vor Ort an die individuellen Bedürfnisse angepasst werden (44). Das Implantat ist schneidbar ohne Auffaserung der Schnittländer. Ferner besitzt es eine hohe Fadenausreißkraft und ermöglicht eine gute Nadelpenetration bei der Verwendung als chirurgisches Nahtmaterial. Ein Vorteil gegenüber nicht resorbierbaren Implantaten ist die erhebliche Verminderung der Infektionsgefahr (45).

Von zahlreichen Arbeitsgruppen fanden vielversprechende Versuche statt und es konnte eine Bildung von Knorpel *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (9, 46-57). Dieses Fasermaterial hat aber den Nachteil einer geringen Variabilität seines chemischen Aufbaus. Damit können auch Fasereigenschaften nur bedingt beeinflusst werden. Das chemische Einbringen von Medikamenten ist ebenfalls kaum möglich. Die Auflösung des Fasermaterials kann nur über enzymatische Abbaureaktionen von Kohlenstoffketten erfolgen. Dies limitiert das Einsatzgebiet der organischen Polymerfasern auf Körperregionen, welche die nötigen Enzyme aufweisen. Untersuchungen bezüglich der Bioverträglichkeit zeigen außerdem, dass Polylactatfasern aufgrund ihres sauren Charakters zu starken Reizungen und Entzündungen des umgebenden Gewebes führen können (12, 51, 58-60).

2.1.4.2 Kieselgelfaser

Seit einigen Jahren wird am Fraunhofer Institut für Silicatforschung in Würzburg ein neuartiges bioresorbierbares Fasermaterial auf Basis spinnbarer Kieselsole hergestellt, verbessert und auf seine medizinischen Eigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Auf molekularer Ebene bestehen die Fasern aus Siloxanen und Silanolen, die durch Kondensationsreaktionen unterschiedliche Verbindungen wie Tri-, Penta- und Oktamere bilden können, die sowohl aliphatisch, zyklisch oder käfigartig sein können. Diese

Verbindungen enthalten OH-Gruppen und bilden über Wasserstoffbrückenbindungen ein supramolekulares Netzwerk aus, welches für die *in vivo* Resorption entscheidend sein dürfte. Die spinnbaren Kieselsole werden unter Verwendung von löslichen Vorstufen, die in ein homogenes Sol, d.h. in eine kolloidale Lösung, überführt werden, gebildet. Durch Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen erfolgt eine zunehmende Verfestigung des Sols bis schließlich ein spinnbarer Zustand erreicht wird. Nach dem Verspinnen verfestigen sich die Fasern zu einem Gel. Dieser sogenannte Sol-Gel-Prozeß ermöglicht die Herstellung amorpher Gel-Fasern. Als Ausgangssubstanzen finden Tetraethoxosilan, Ethanol und Wasser und als saurer Katalysator darüber hinaus Salpetersäure Anwendung, die zunächst für mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt werden. In einem zweiten Schritt wird Ethanol verdampft, es entsteht ein zähflüssiges Sol. Dieses durchläuft als drittes einen Reifeprozess, der mehrere Stunden bis Monate dauern kann (abhängig vom Ethanolgehalt), bis ein spinnbares Material entstanden ist. Das hochzähe Kieselgel wird unter inerten, standardisierten Bedingungen durch Düsen extrudiert, gesponnen und aufgewickelt. Die Fasern werden daraufhin in manchen Fällen in einer Ethanol gesättigten Atmosphäre gelagert, um zu verhindern, dass das empfindliche Wasser-/Ethanol-Gleichgewicht durch Hydrolyse bzw. Kondensation gestört wird und die Fasern ihre Eigenschaften ändern, beispielsweise verspröden. Die resultierende Faser ist rundlich bis oval und hat eine Querschnittsfläche zwischen 150 und 400 μm^2 . Der Faserdurchmesser variiert zwischen 10 μm und 30 μm . Degradationstests fanden in physiologischen Lösungen statt. Der Degradationsgrad wurde bestimmt aus dem Verlust von Siliciumdioxid und wird angegeben in der Abnahme der Querschnittsgröße pro Tag. Die Degradationsrate dieses Fasertyps beträgt zwischen 10 und 100 nm vom Faserradius pro Tag. Die mechanische Zugfestigkeit mancher Fasern beträgt bis zu 300 MPa und liegt damit deutlich über herkömmlichen Polylaktid-Polyglykolid-Fasern. Weitere Untersuchungen erfolgten an Maus-Fibroblasten-Zelllinien, die zusammen mit der Kieselgelfaser kultiviert wurden. Es konnte eine Anlagerung der Zellen an die Fasern beobachtet werden. Die Zytotoxizität wurde mittels eines MTT-Tests bestimmt (61). Die Ergebnisse widersprechen nicht einer Anwendung im medizinischen Bereich. Bei subkutaner Implantation von Fasern in Mäuse konnten keine bzw. minimale Entzündungserscheinungen beobachtet werden (unveröffentlichte Studie).

2.1.4.3 Fibrinkleber

Seit 1975 wird die Fibrinverklebung zur operativen Wundversorgung im klinischen Bereich eingesetzt. Bei der Verwendung des Fibrins in der Chirurgie macht man sich die letzte Phase der Blutgerinnung zu nutze. Fibrinogen ist neben Thrombin und vielen weiteren Proteinen ein Bestandteil der Blutgerinnungskaskade. Bei einer Verletzung von Blutgefäßen muss es zu einem schnellen Verschluss kommen, um den Verlust einer großen Blutmenge zu verhindern. Dazu setzen an der verletzten Stelle betroffene Zellen Kininogen und Kallikrein frei, die frühe Proteine der Blutgerinnung aktivieren, die wiederum nachgeschaltete Proteine aktivieren. Das aktivierte Protein Va schließlich bewirkt die Aktivierung von Prothrombin in Thrombin, das seinerseits die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin nach sich zieht, das schließlich ein quervernetztes Fibringerinnsel bildet, einen Blutpfropf, der das verletzte Blutgefäß lokal abdichtet. Im Tissue Engineering wird der gelartige-feste Zustand des Fibrins genutzt, um die Zellen in natürlicher Weise in einer dreidimensionalen Struktur zu fixieren.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich mit dem Fibrinkleber beschäftigt und als Trägermaterial im Tissue Engineering erfolgreich eingesetzt (10, 62-66). Nach Homminga et al. ist allerdings die alleinige Verwendung von Fibrin aufgrund der schnellen Dedifferenzierung der Chondrozyten nicht möglich (62). Daher sollte es mit andern Trägermaterialien wie beispielsweise Alginat oder biokompatiblen Polymervliesen kombiniert werden.

2.1.4.4 Weitere Trägermaterialien

Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer Trägermaterialien, die im Rahmen des Tissue Engineerings Verwendung finden. Gelartige Substanzen wie Agarose (67, 68) oder Alginat (29, 32, 69-72) Kollagengele (73-76), Polypropylenoxid bzw. Polyethylenoxid (77-79) und Materialien auf Hyaluronsäurebasis (36, 80-85) sind grundsätzlich gut geeignet. Zudem stehen noch weitere biodegradierbare Polymere zur Verfügung, wie z.B. Polyester (68, 87) und Kombinationen aus verschiedenen Materialien (88).

Eine Verknüpfung verschiedener Trägermaterialien ist ebenfalls möglich.

Gelartige Substanzen allein bieten jedoch nur eine geringe mechanische Stabilität, um Knorpelgewebe in einer definierten, vorgeformten Struktur zu bilden. Eine mechanische Stabilität ist für die chirurgische Praktikabilität jedoch von Wichtigkeit (33). Agarose ist zwar etwas stabiler und fördert die Redifferenzierung der Zellen, beinhaltet aber den Nachteil, *in*

vivo entzündliche Reaktionen hervorzurufen. Eine Eignung für Transplantationszwecke wird angezweifelt (18, 52, 89). Die Verwendung von Alginat ist für den Erhalt der Differenzierung der Chondrozyten optimal, jedoch durch fehlende Biodegradierbarkeit und eingeschränkte Biokompatibilität für die Knorpeltransplantation und damit die *in vivo*-Anwendung nicht geeignet (31).

2.1.5 Historie der Transplantationschirurgie und der Zellkulturtechnik

Die ersten Versuche zum Gewebeersatz beim Menschen stammen aus dem 17. Jahrhundert, wobei das Gewebematerial vorwiegend von Hunden, Hühnern oder Rindern stammte. Aus dem 18. und späten 19. Jahrhundert gibt es Berichte über Transplantationen endokrinen oder ovariellen Gewebes. In der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts haben Mediziner Haut vom Oberschenkel für die Durchführung einer Rhinoplastik zur Nasenkorrektur verwendet. Die erste experimentelle Nierentransplantation wurde 1902 von dem Österreicher Emerich Ullmann bei einem Hund durchgeführt. Er transplantierte dieses Organ in den Bereich des Nackens des Tieres. Im selben Jahr verpflanzte er eine Hundeniere in eine Ziege. 1947 führte David M. Hume in Boston die erste Nierentransplantation an einer jungen Frau durch. Jedoch waren alle durchgeführten Transplantationen aufgrund von Abstoßungsreaktionen erfolglos. Im Jahr 1954 glückte die erste Nierentransplantation, als Spender und Empfänger eineiige Zwillinge waren. Somit war klar, dass Gewebsidentität nur bei homozygoten Zwillingen zu erreichen war und erfolgreiche Transplantationen nur durch eine Unterdrückung der Abstoßungsreaktionen möglich werden konnten. Der britische Zoologe Sir Brian Medawar erkannte 1942 als erster die Bedeutung des retikulo-endothelialen Systems als auch die der Lymphozyten, denen er im Falle einer zweiten Abstoßung den Namen „immunkompetente Zellen“ gab. 1952 erkannte Jean Dausset den menschlichen Histokompatibilitätskomplex. In den darauffolgenden Jahren wurde immer klarer, dass sich durch Unterdrückung der Immunantwort eine Transplantatabstoßung verhindern lässt. Erste Erfolge verzeichnete man mit Azathioprin und Steroiden (90). Auf der Suche nach einem neuen Antibiotikum stieß man auf Pilzkulturen, die die später so genannten Cyclosporine produzierten. Diese rufen bei Lymphozyten eine ca. 300 mal stärkere Hemmung hervor als bei andere Zelllinien.

Schon vor über 100 Jahren gab es erste *in vitro* Versuche zur Gewebekultur. So berichtete 1897 der Schwede Carl Aug. Ljunggren auf einem Kongress in Moskau von gezielten Versuchen einer Kultivierung von Hautfragmenten über einen längeren Zeitraum (2 Tage bis zu 6 Monate). Als Kulturmedium diente ihm abpunktierte Aszitesflüssigkeit (91). Einen Teil der

Hautstücke überpflanzte Ljunggren auf granulierende Wunden. Histologisch konnte er sogar nach deren Entfernung den Heilungsverlauf studieren. Die Etablierung der experimentellen Zellforschung gelang dem Embryologen Ross Granville Harrison, der 1907 seine Ergebnisse zur Nervenfasierzüchtung aus isoliertem neuronalem Geweben von Froschembryonen publizierte (92). Für den deutschsprachigen Raum sollte Rhoda Erdmann (Abbildung 2) eine herausragende Bedeutung für die Verbreitung der Zell- und Gewebekulturen spielen, die ab 1919 eine eigene Abteilung für experimentelle Zellforschung an der Berliner Charité aufbauen konnte (93). Sie gelangte nach Machtübernahme durch die Nationalsozialisten zunehmend unter politischen Druck und wurde schließlich Anfang 1934 entlassen.



Abbildung 2: Rhoda Erdmann (1870 – 1935).
Wegbereiterin der Zell- und Gewebekultur (94)

In den 60er Jahren produzierten mehrere Arbeitsgruppen nach Explantation von Einzelzellen die ersten Zellschichten. Die ersten industriell gefertigten bioabbaubaren Fasern als Zellträgergerüst konnten 1967 aus Polyglykolsäure hergestellt werden (60). In der Mitte der sechziger Jahre wurden erstmals Chondrozyten erfolgreich isoliert (95) und viele Versuche unternommen, neuen Gelenkknorpel zu züchten (74, 96, 97). 1975 gelang den Forschern J.G. Rheinwals und H. Green mit einer neuen Methode die Vermehrung von humanen Hautzellen außerhalb des Körpers. Bis zur klinischen Anwendung dauerte es nun nicht mehr lange: 1981 erhielten schwer verbrannte Patienten erstmals Hauttransplantate, die aus autologen Zellen gezüchtet worden waren. Das bekannte, durch die Medien gegangene Bild einer Nacktmaus, der auf dem Rücken ein Ohr wuchs, entstand während der Studien, die Ende der neunziger Jahre durchgeführt wurden. Isolierte hyaline Knorpelzellen vom Rind waren auf ein

biodegradierbares Polymervlies gebracht worden, das einer immuninkompetenten Maus subkutan implantiert wurde. Nach Explantation 12 Wochen später konnte eine Knorpelformation nachgewiesen werden (98).

2.2 Der Knorpel

Man kann drei verschiedene Knorpelarten unterscheiden: den hyalinen Knorpel (Gelenk-, Rippen- und Nasenknorpel, in den Epiphysenfugen, Trachealspangen und in der Wand der großen und mittleren Bronchien), den elastischen Knorpel (Ohr- und Kehlkopfknorpel, in der Wand der kleinsten Bronchien) und den Faserknorpel (Symphysen- und Bandscheibenknorpel, Gelenkknorpel des Kiefergelenks). Außer dem Gelenkknorpel ist jedes Knorpelstück von der Knorpelhaut, dem Perichondrium, überzogen (99, 100).

2.2.1 Zusammensetzung des Knorpelgewebes

Aus embryonalem (mesenchymalem) Bindegewebe kann sich das Knorpelgewebe differenzieren. Dabei kugeln sich die Mesenchymzellen ab und werden zu Chondroblasten, den knorpelbildenden Zellen, die um sich herum eine kapselartige Hülle produzieren mit Einlagerungen von Kollagenen und Proteoglykanen. Die so entstandenen kugelartigen Gebilde zusammen mit ihren zirkulären Faserwickelungen sind die strukturelle Grundlage des Knorpelgewebes. Sie bilden eine funktionelle Einheit, das Chondron. Meist liegen mehrere Zellen in einer Knorpelhöhle, der so genannten Lakune, die von einem faserarmen, reichlich Proteoglykane enthaltenden Knorpelhof umgeben ist, der alle Zellen eines Chondrons mit ihren Lakunen umschließt. Außerhalb der Knorpelhöfe liegt die noch schwächer angefärbte Interterritorialsubstanz. Sie enthält große Mengen an Chondroitinsulfat, durch welches die kollagenen Fasersysteme des Knorpels „maskiert“ sind: Fasern und Grundsubstanz können optisch nicht unterschieden werden, weil Fibrillen und Grundsubstanz die gleiche Lichtbrechung haben (99). Diese amorphe Grundsubstanz setzt sich neben den Proteoglykanen (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat) aus Glykoproteinen und interstitieller Flüssigkeit zusammen. Die Proteoglykane enthalten einen Proteinkern, der mit zahllosen Glykosaminoglykan-Seitenketten verbunden ist. Diese setzen sich ihrerseits aus sich wiederholenden

Disacchariden zusammen.

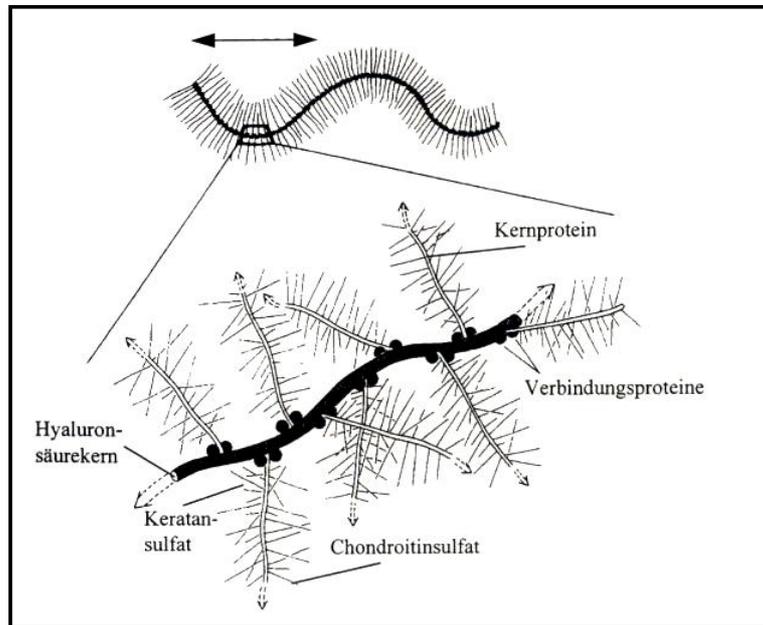


Abbildung 3: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der Knorpelmatrix. Hyaluronsäure ist über spezielle Verbindungsproteine mit den Kernproteinen der Proteoglykane verbunden, deren Seitenketten hauptsächlich aus Chondroitinsulfat bestehen (nach Alberts, 1986).

Diese spezifischen Knorpelglykosamine mit ihren Proteinträgern werden von den Knorpelzellen selbst produziert und reichern sich in der Umgebung der Chondrone an. Durch die ständige Neubildung von Fasern und Knorpelgrundsubstanz im Innern des Knorpels rücken die Chondrone während der Entwicklung zunehmend auseinander. Mit dem weiteren Wachstum differenzieren sich die Chondroblasten zu reifen Knorpelzellen, den Chondrozyten.

2.2.1.1 Das Perichondrium

Die Knorpelhaut, eine straffe, geflechtartige Bindegewebsschicht, bedeckt jedes Knorpelstück mit Ausnahme des artikulären Knorpels. Sie enthält neben elastischen Fasern auch Blutgefäße und Nerven. Vom Perichondrium ausgehend reichen kollagene Fibrillenbündel in die Interzellulärsubstanz des Knorpels hinein. Zwischen ihm und der eigentlichen Knorpelsubstanz besteht ein fließender Übergang.

2.2.1.2 Der hyaline Knorpel

Hyaliner Knorpel erscheint im frischen Zustand weißlich-bläulich, in dünnen Schichten ist er durchscheinend (hyalin). Die Interzellulärsubstanz scheint bei Betrachtung im gewöhnlichen Licht homogen und völlig strukturlos zu sein, da Fibrillen und Grundsubstanz die gleiche Lichtbrechung haben. Im polarisierten Licht sieht man dann die in der Interterritorialsubstanz sich kreuzende Kollagenbündel, die von einem Perichondrium zum anderen ziehen, wobei sie die Chondrone umgehen. Diese bilden druckelastische Körper zwischen den Fasersystemen (99).

Die Chondrone des hyalinen Knorpels enthalten mehrere sphärisch oder elipsoidale geformte Zellen. Der Zellkern ist meist kugelförmig und locker strukturiert. Hyaliner Knorpel lässt sich histologisch in vier Zonen unterteilen: die oberflächliche Tangentialzone, die Zellen und tangential gerichtete Kollagenfasern enthält, die Übergangszone mit Chondrozyten und verschieden gelagerten Kollagenfasern, die tieferliegende Radiärzone, in der die Knorpelzellen senkrecht ausgerichtet sind und die Kollagenfasern radiär verlaufen und schließlich basal die Verkalkungszone, die aus zum Teil weit degenerierten Chondrozyten und mineralisiertem Knorpel besteht (100, 103). Das aus Hydroxyprolin, Prolin und Glycin bestehende Kollagen verleiht dieser Knorpelart seine Zug- und Druckfestigkeit.

2.2.1.3 Der elastische Knorpel

Betrachtet man elastischen Knorpel makroskopisch, erscheint dieser leicht gelblich und trüb. Die Chondrozyten unterscheiden sich nicht von denen des hyalinen Knorpels, kommen jedoch vor allem isoliert vor. Die Chondrone sind selten mehrzellig und unregelmäßiger verteilt als beim hyalinen Knorpel. In seiner Interzellulärsubstanz existieren auch kollagene Fasern, jedoch sind die elastischen Fasern für diesen Knorpel charakteristisch. Sie bestehen aus geknäulten Elastinmolekülen und bilden stark verquollene Netze und stehen mit dem Perichondrium in Verbindung (99, 100).

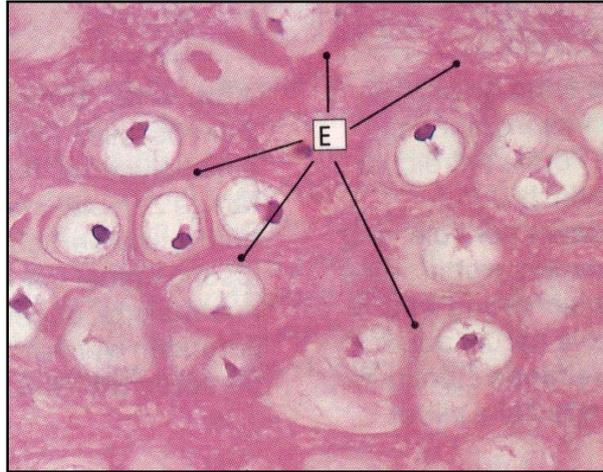


Abbildung 4: Elastischer Knorpel. Die elastischen Faserbündel (E) erscheinen als hellrot gefärbte, gebündelten Linien. HE-Färbung (101)

2.2.1.4 Der Faserknorpel

Der sehr widerstandsfähige Faserknorpel bildet sich aus, wenn ein straffes, entwicklungsfähiges Bindegewebe nicht nur durch Druck, sondern gleichzeitig auch durch wechselnden Zug belastet wird. Im histologischen Bild dominieren stark verflochtene kollagene Faserbündel, die nicht maskiert sind. Chondrozyten kommen weitaus spärlicher vor als bei den anderen Knorpelarten. Grundsubstanz ist nur in geringen Mengen vorhanden und besonders in der Umgebung der Knorpelzellen konzentriert. Die Knorpelzellen des Faserknorpels sind länglich bis oval und liegen vertaut zwischen den Faserbündeln. Zur Ausbildung größerer, rundlicher Chondrone kommt es nicht (99, 100).

2.2.2 Ernährung und Regeneration

Weil der Knorpel keine Blut- und Lymphgefäße besitzt, muss die Ernährung ausschließlich über Diffusion erfolgen. Diese erfolgt nach Dyce et al. (102) aus Synovia bzw. aus nahegelegenen Gefäßen. Alle Knorpelarten gehören zu den bradytrophen Geweben. Da die Chondrone im Laufe des Lebens immer weiter auseinanderrücken, werden die Diffusionswege länger, es kommt zu Stoffwechselstörungen, welche zu einem Verlust an spezifischen Proteoglykanen und Knorpelzellen führen können (100, 103). Knorpelgewebe hat nur ein geringes eigenes Reparaturpotenzial (104, 105). Eine Regeneration kann vom Perichondrium oder Periost in begrenztem Maße ausgehen. Dieses Vermögen ist bei Läsionen und chronisch-entzündlichen Prozessen schnell überschritten. Ein Wachstum mit Vermehrung der Zellen wie in der Embryonalentwicklung ist nicht möglich (106).

2.3 Die Transplantation

In der medizinischen Literatur und der klinischen Praxis werden folgende Transplantationsarten unterschieden: die autologe, die allogene oder homologe, die syngene und die xenogene Transplantation. Bei dem Transplantationsort unterscheidet man die isotope, die orthotope und die heterotope Transplantation.

Je größer die phylogenetische Distanz zwischen dem Spender und Empfänger, desto größer sind die immunologischen Einflüsse auf den Empfängerorganismus, da die Zahl der von einander abweichenden Antigenstrukturen zunehmen (107).

2.3.1 Transplantationsarten

2.3.1.1 Autologe Transplantation

Bei der autologen Transplantation sind der Spender und der Empfänger ein und das selbe Individuum - wie in der vorliegenden Arbeit: Ohrknorpel wird einem Schwein A entnommen, die Chondrozyten werden isoliert, amplifiziert und anschließend in Schwein A reimplantiert. Die Risiken einer Transplantatabstoßung oder übertragbarer Infektionskrankheiten entfallen praktisch völlig (108), da keine Fremddantigene eingebracht werden. Bei autologen Zellen, die *in vitro* amplifiziert wurden, kann jedoch trotzdem eine Immunreaktion ausgelöst werden.

2.3.1.2 Allogene/Homologe Transplantation

Eine Transplantation bezeichnet man als allogene oder homologe, wenn es sich bei dem Spender und Empfänger um Individuen der selben Spezies handelt (z.B. Schwein A → Schwein B). Unverträglichkeitsreaktionen und Infektionen mit völligem Verlust des Transplantats sind die Hauptprobleme bei der allogenen Transplantation.

Im Gegensatz zu anderen Geweben löst Knorpelgewebe nur geringe Abwehrreaktionen hervor. Daher wird es auch als „immunologisch privilegiertes“ Gewebe bezeichnet (109), weil eine Vaskularisierung des Gewebes fehlt und die Matrix eine Schutzfunktion darstellt. Die auf der Oberfläche der Chondrozyten gelegenen Antigene sind durch die Einbettung in die Knorpelmatrix dem Zugriff der Abwehrzellen entzogen. Eine Immunreaktion ist jedoch an Schnittkanten und in Autolysebezirken möglich (110, 111). Zudem gelten die Bestandteile der Knorpelmatrix als nicht-antigen (112).

2.3.1.3 Syngene Transplantation

Eine syngene Transplantation liegt vor, wenn man eine Verpflanzung zwischen zwei genetisch identischen Individuen vornimmt (z.B. bei eineiigen Zwillingen).

2.3.1.4 Xenogene Transplantation

Gehören Spender und Empfänger verschiedenen Spezies an, handelt es sich um eine xenogene Transplantation (z.B. Schwein → Mensch). Es ist möglich, die antigenen Eigenschaften der Transplantate durch Konservierung mit Glutaraldehyd und Beta-Strahlen wesentlich zu reduzieren. Die Resorptionserscheinungen und die Infektionsrate können jedoch sehr hoch sein und können in Folge zu einer Zerstörung des Transplantats führen (106).

2.3.2 Implantationslokalisationen

2.3.2.1 Heterotrope Transplantation

Spricht man von einer heterotropen Transplantation, meint man, dass Gewebe des Empfängers an eine untypische Lokalisation beim Empfänger verpflanzt wird. In dieser Arbeit werden Ohrknorpelzellen dorsal am Rücken subkutan implantiert.

3.3.2.2 Isotrope und orthotrope Transplantation

Stimmt der Ort der Explantation mit dem der Implantation überein, spricht man von orthotroper Transplantation. Ist das transplantierte Gewebe zudem identisch mit dem explantierten, spricht man von isotroper Transplantation. In unserem Fall wollten wir überprüfen, ob die Lokalisation des Transplantates Einfluss auf die Resorptions- bzw. Entzündungserscheinungen hat. Wir reimplantierten sowohl ein natives Knorpelstück im Bereich der Ohrbasis als auch im Schulterbereich subkutan.

2.4 Pathologie im Transplantationsgeschehen

2.4.1 Entzündungsreaktion

2.4.1.1 Definition und Ursachen

Die Entzündung lässt sich definieren als Summe der morphologischen und biochemischen Reaktionen des Gefäßbindegewebes, die durch verschiedenartige Schädlichkeiten ausgelöst werden (113). Wenn Zellen oder andere Gewebebestandteile geschädigt werden, erfolgt in ihrem Bereich eine Reihe von kennzeichnenden Reaktionen. Dabei besteht eine regelhafte Verkettung zwischen der Reizintensität und dem Ausmaß der Gewebsreaktion. So können schwere und schwerste Schädigungen Gewebsuntergang (Nekrose) zur Folge haben, der irreparabel ist oder durch reparative Vorgänge wieder ausgeglichen werden kann. Mittelschwere Reize verursachen Gewebsreaktionen, durch die der Organismus versucht, das schädigende Agens zu vernichten oder zumindest seine Ausbreitung zu begrenzen. Eine Entzündung ist immer ein lokal begrenztes Geschehen. Die Ursachen sind vielfältig. Belebte Organismen wie Bakterien und Pilze spielen ebenso eine Rolle wie allergene, physikalische und chemische Reize sowie Fremdkörper.

2.4.1.2 Morphologische Grundvorgänge und klinische Erscheinungen

Unmittelbar nach einer Gewebsschädigung erfolgt eine initiale Ischämie durch Vasokonstriktion, daraufhin erweitern sich Kapillaren und Venolen, es kommt zu einer aktiven Hyperämie. Die Durchlässigkeit der Gefäße für Blutflüssigkeit inklusive seinen Proteinen erhöht sich. Schließlich wandern weiße Blutzellen in das Gewebe aus, zunächst polymorphkernigen Leukozyten (Granulozyten), später überwiegen Monozyten und

Makrophagen und zuletzt Lymphozyten und Plasmazellen. Chemotaktisch gelangen sie zum geschädigten Gewebe. Die Granulozyten beginnen mit der Phagozytose der Gewebstrümmer und Bakterien. Ein leukozytenreiches Exsudat entsteht (Eiter). Lymphozyten setzen Antikörper frei. Die im Gewebe befindlichen T-Lymphozyten sind für zellgebundene Immunreaktionen besonders bei spezifischen Prozessen von Wichtigkeit. Zu ihren Funktionen gehören aber auch die Invasion und Zerstörung von Transplantaten und Tumorgewebe. Plasmazellen finden sich zusammen mit den Lymphozyten eher im Randbereich der Entzündung, welche die B-Lymphozyten freisetzen. Bei fortschreitender Entzündung vermehren sich eingewanderte Makrophagen, Fibroblasten und Fibrozyten mit Neubildung von kollagenen und elastischen Fasern. Eosinophile Granulozyten in großer Zahl finden sich im Gewebe bei den parasitären und hyperergischen Entzündungen. Sie sind einerseits in der Lage zu phagozytieren und andererseits die Wirkung von Mastzellen und basophilen Granulozyten zu antagonisieren (Histamine, Leukotriene, Arachidonsäurederivate etc.) (114). Bei unspezifischen inflammatorischen Reaktionen erscheinen sie später als die Neutrophilen im Entzündungsbett, meistens erst, wenn die Heilungsphase begonnen hat. Im Gewebe überleben sie mehrere Tage. Bei der Entzündung treten Fibroblasten in geringen Prozentsätzen bereits nach wenigen Tagen, bei der chronischen Verlaufsform jedoch in größerem Umfang zu späteren Zeiten in Aktion (Abbildung 5). Zusätzlich kommt es zur Sprossung von Kapillaren. Das entstandene Gewebe wird als Granulationsgewebe bezeichnet (113). Hört die schädigende Wirkung auf, verschwinden die Entzündungszellen, die neu gebildeten kollagenen Fasern jedoch bleiben erhalten. Dieses Bindegewebe bezeichnet man als Narbe.

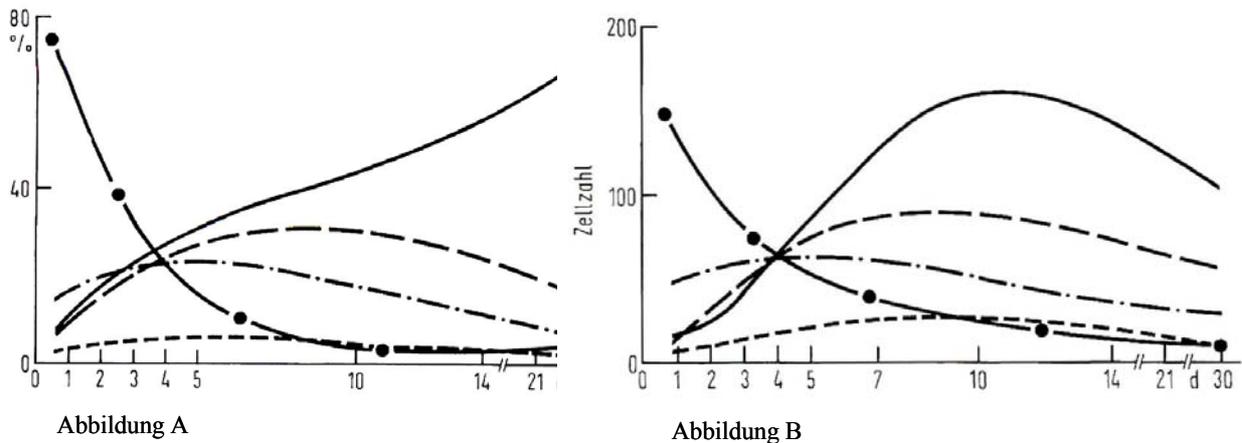


Abbildung 5, A,B: Entzündungszellen in einem Granulationsgewebe bei komplikationsloser Wundheilung innerhalb eines vierwöchigen Zeitintervalls. Fibroblasten/-zyten — , Leukozyten •—•, Monozyten --, Makrophagen --- , Lymphozyten/Plasmazellen --- . A: Die prozentuale Verteilung der Zellen; B: Änderung der Dichte der Entzündungszellen. Verminderung des entzündlichen Infiltrats bereits nach 10 Tagen. (Quelle: Helpap (1983), Die lokale Gewebsverbrennung, Springer)

Die klinischen Erscheinungen der Entzündung, die so genannten Kardinalsymptome, sind Calor (Erwärmung), Rubor (Rötung), Tumor (Umfangvermehrung), Dolor (Schmerz) und Functio laesa (Beeinträchtigung der Leistung). Die wichtigsten für die klinische Diagnostik genutzten Phänomene sind Fieber, Leukozytose und eine veränderte Zusammensetzung der Plasmaproteine (114).

2.4.1.3 Einflüsse auf den Ablauf der entzündlichen Reaktion

Trotz der grundsätzlichen Gesetzmäßigkeiten im Ablauf der entzündlichen Reaktion, die in Kapitel 2.4.1.2 beschrieben sind, können das morphologische Bild, das Ausmaß des Gewebsschadens und die Folgen der Entzündung durch eine Reihe von Faktoren modifiziert werden. Dabei spielen einerseits die Eigenschaften, die Menge sowie Dauer der Einwirkung eine Rolle. So sind die Pathogenität von Viren, das Invasionsvermögen von bestimmten Mikroorganismen, die spezifische Wirkungsweise mancher Erreger (z.B. bewirken pyogene Bakterien wie Staphylokokken eine besonders ausgeprägte Emigration von neutrophilen Granulozyten, deren proteolytische Aktivität zu herdförmigen Gewebseinschmelzungen führt) von ausschlaggebender Wichtigkeit für das morphologische und klinische Bild einer Entzündung. Auch die Dauer eines schwach wirkenden Agens kann das Krankheitsbild verschlechtern.

Andererseits sind auch das Reaktionsvermögen und die Abwehrkräfte des betroffenen

Organismus von Bedeutung (113). Ebenso hat es Auswirkungen, wenn die allgemeine Widerstandskraft herabgesetzt oder die Immunität geschwächt ist bzw. Stoffwechselkrankheiten vorliegen. Auch die Lokalisation der schädigenden Einwirkung spielt eine entscheidende Rolle (z.B. Festigkeit und Dichte, Vaskularisation des betroffenen Gewebes).

2.4.1.4 Fremdkörperreaktion

Gelangen körperfremde Stoffe von außen in den Organismus, so lösen sie je nach ihrer Größe, Gestalt und chemischen Beschaffenheit verschiedene Abwehrreaktionen aus, die von der einfachen Phagozytose bis zur exsudativen und/oder proliferativen Entzündung reichen. Dabei ist bei der chronischen, durch Fremdkörper ausgelösten, proliferativen Entzündung die Bildung von entzündlichen Granulomen und die Transformation der Monozyten/Makrophagen in Epitheloid- und Riesenzellen sehr charakteristisch. Man spricht von einem „Fremdkörpergranulationsgewebe“ oder „Fremdkörpergranulom“.

2.4.1.5 Zeitlicher Verlauf der Entzündung

Die Einteilung der Entzündungen richtet sich im Allgemeinen nach dem zeitlichen Auftreten einer entsprechenden Symptomatik. Die histopathologische Diagnose ergibt häufig eine abweichende zeitliche Zuordnung.

Die perakute Entzündung beginnt sehr plötzlich, zeigt nur einen wenige Tage dauernden Verlauf und endet meist tödlich. Ist die Inflammation akut, sind die fünf Kardinalsymptome ausgeprägt. Auch sie beginnt plötzlich geht aber nach Elimination der Noxe in Heilung über. Eine subakute Entzündung stellt eine nur ungenau zu definierende Verlaufsform zwischen akuter und chronischer Verlaufsform da. Ist die Entzündung chronisch, müssen zwei Verlaufsformen unterschieden werden. Eine sekundär-chronische Entzündung geht aus einer nicht heilenden akuten hervor, wenn das schädigende Agens nicht entfernt werden kann. Bei der zweiten Form wird eine akute Entzündung zunächst nicht wahr genommen, der Beginn ist schleichend. Diese so genannte primär-chronische Entzündung geht dann über in eine fortschreitend schwerer werdende Entzündung, die chronisch-progrediente. Wenn immer wieder Schübe auftreten, handelt es sich um eine chronisch-rezidivierende entzündliche Reaktion (114).

2.4.1.6 Heilung der akuten Entzündung

Sobald das entzündliche Agens zu wirken aufhört, verschwinden auch die Kardinalsymptome der Entzündung. Ausgewanderte neutrophile Granulozyten und Erythrozyten verfallen dem Untergang, sie gehen im Gewebe zugrunde. Ein Teil der Trümmer wird von Monozyten phagozytiert und mit der Lymphe abtransportiert. So verschwinden die neutrophilen Granulozyten mitunter schon innerhalb weniger Tage aus dem Entzündungsherd. Eosinophile Granulozyten hingegen halten sich wesentlich länger im Gewebe. Monozyten wandeln sich in Histiozyten und Fibroblasten um, die nicht mehr von ortsständigen Bindegewebszellen zu unterscheiden sind. Die Lymphozyten, die als letztes im Bereich der akuten Entzündung erscheinen, überdauern am längsten.

2.4.1.7 Heilung der chronisch proliferativen Entzündung

Bei Verschwinden des Reizes wird das Granulationsgewebe zellärmer und faserreicher. Die Zahl der Infiltratzellen, wie Monozyten, Plasmazellen und Lymphozyten nimmt ab (Abbildung 5), die Gefäße bilden sich zurück, so dass schließlich die Stelle des Granulationsgewebes fast ganz von kollagenem Bindegewebe eingenommen wird. Eine Narbe ist entstanden. Sie ist in der Regel blaß-weißlich und fest, das Gewebe ist naturgemäß funktionell minderwertig.

Falls jedoch keine Nekrosen entstehen und das Exsudat resorbiert wird, erfolgt eine vollkommene Wiederherstellung der normalen Strukturen.

2.4.1.8 Besonderheiten der kutanen Wundheilung

Die Phasen der kutanen Wundheilung zeichnen sich aus durch eine typische Chronologie. Zunächst kommt es zu einer exsudativen Phase (Tag 1-3), die abgelöst wird durch eine proliferative Phase (ab Tag 4). Abschließend erfolgt die Reparationsphase (ab Tag 8). Bei jeder Wundheilung kommt es zu einer physiologischen Wundentzündung. Die ist kein Zeichen einer Infektion, sondern wesentliches Merkmal der exsudativen Phase der Entzündung (115). Eine Wunde gilt dann als infiziert, wenn die Keimzahl von 100.000/Gramm Gewebe überschritten wird. Wunden mit Bakterienzahlen unterhalb dieser Grenze heilen meistens rasch ohne Infektion ab. Fremdkörper dienen Keimen als biologische Nährmedien und fördern oder unterhalten eine Wundinfektion, die dann sekundär eine Heilungsstörung verursacht (116).

2.4.2 Transplantatabstoßung

In der Humanmedizin sind Transplantatabstoßungsreaktionen in Zusammenhang mit Verpflanzung von Organen beschrieben worden, bei denen man drei verschiedene Typen unterscheiden kann.

2.4.2.1 Transplantatabstoßung vom hyperakuten Typ

Organtransplantationen zwischen phylogenetisch weit entfernten Spezies führen innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden zur hyperakuten Abstoßung. Die histopathologischen Merkmale sind gekennzeichnet durch Hämorrhagien, Ödeme, Thrombozytenaggregationen und schwere Endothelzellschäden (117). Meist ist eine mononukleäre Zellinfiltration zu beobachten, wobei Chemokine und korrespondierende Leukozytenrezeptoren eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des inflammatorischen Prozesses spielen (118, 119). Hauptangriffsziel des Empfänger-Immunsystems sind die Endothelzellen des Xenografts. Bei einer immunhistologischen Aufarbeitung sind Komplement- und Antikörperablagerungen auf den Endothelzellen nachzuweisen. Die Komplementaktivierung über den klassischen Weg ist entscheidend für die Entwicklung der hyperakuten Abstoßungsreaktion (107).

2.4.2.2 Transplantatabstoßung vom akuten Typ

Die akute Abstoßungsreaktion im Rahmen einer Xenograft-Implantation kann in den ersten Tagen oder Wochen nach der Transplantation auftreten. Endothelzellschaden, Schwellung, Ischämie und diffuse Thrombose sind Kennzeichen für diesen Abstoßungstyp. Gelegentlich beobachtet man eine Infiltration aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (120). Mehrere Untersuchungen unterstützen die These, dass das Auftreten von xenoreaktiven Antikörpern verantwortlich für die Abstoßung ist (121-123). Die Komplementaktivierung scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (124-126). Die akute Abstoßungsreaktion stellt die häufigste Form der Abstoßung dar und ist bei rechtzeitigem medikamentösen Einsatz in ca. 80 % der Fälle reversibel.

2.4.2.3 Transplantatabstoßung vom chronischen Typ

Vor allem natürliche Killerzellen und T-Lymphozyten scheinen an der chronischen Abstoßungsreaktion beteiligt zu sein (107). Wochen bis Jahre nach der Transplantation kann es zur Abstoßung kommen. Klinisch zeigt sich eine langsam zunehmende, weitgehend therapieresistente und kontinuierliche Verschlechterung der Transplantatfunktion.

2.4.3 Immunmodulatoren

Um eine Transplantatabstoßung von Organen zu verhindern, werden in der Humanmedizin Immunsuppressiva eingesetzt, wenn es sich dabei nicht um eine Verpflanzung von Organen zwischen eineiigen und somit genetisch identischen Zwillingen handelt. Die Grundlage dieser Therapie bilden Kortikosteroide, zytotoxische Medikamente und Cyclosporin.

2.4.3.1 Glukokortikoide

Cortisol ist das Hauptprodukt der Nebennierenrinde, das im Blut zu 80% an Transcortin, ein alpha-Globulin, gebunden wird. Die beiden synthetischen Abkömmlinge Prednison und Prednisolon finden aufgrund ihres glukokortikoiden Effekts die häufigste Anwendung in der Transplantatprotektion. Die Wirkung der Kortikoide besteht darin, dass überschießende Entzündungsreaktionen sinnvoll unterdrückt werden, ohne das spezifische Immunsystem klinisch manifest zu subprimieren (127). Die Glukokortikoide nehmen direkt Einfluss auf die Protein- und Enzymsynthese. Die induzierten Enzymtranskriptionen beeinflussen u.a. die Entzündungs- und Immunreaktion. So wird die Synthese bzw. Freisetzung von Zytokinen gehemmt. Ferner wird die Phagozytoseaktivität vermindert und sowohl die Antigen-Antikörperbindung als auch die Komplementaktivierung beeinflusst (128).

Die Wirkungen einer Glukokortikoidtherapie sind (129-131):

- ◆ Hemmung des Zutritts von Leukozyten zum Entzündungsgebiet
- ◆ Interferenz mit den Funktionen der Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen
- ◆ Unterdrückung von Produktion und Wirkungen humoraler Entzündungsfaktoren
- ◆ Verminderung der lokalen Kapillarpermeabilität und Vasodilatation
- ◆ Verminderung der Leukozytenadhäsion am Endothel
- ◆ Verminderung der Leukozytenchemotaxis und -migration
- ◆ Hemmung der Synthese bzw. Freisetzung von Zytokinen (Il 1 und 2, TNF, PAF)
- ◆ Hemmung der Prostaglandinsynthese und der Zyklooxygenase
- ◆ Hemmung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen und Granulozyten
- ◆ Hemmung der Makrophagenbakterizidie

Dabei hängt die Eintrittsgeschwindigkeit und Dauer der Glukokortikoid-Wirkung von der Dosierung ab. Auch die zirkadiane Rhythmik ist bei der Erstellung eines Behandlungsschemas zu berücksichtigen. Nachts erfolgt physiologischerweise eine verminderte Cortisolsekretion aus der Nebennierenrinde, wobei das Maximum des Wirkspiegels am Morgen erreicht wird. (Ausnahme Hund). Bei Krankheit und Stress kann die Rhythmik weitgehend aufgehoben sein (132); (133).

In den Abendstunden ist eine höhere therapeutische Wirksamkeit wahrscheinlich. Bei Therapie sinkt die Zahl der Cortisol-Rezeptoren drastisch herab (auf 40 % und weniger).

Auch in der Tiermedizin findet v.a. bei Hund und Katze eine immunsuppressive Therapie (z.B. bei Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes) statt (134). Dazu bekommen die Tiere initial 1,0 mg Prediso(lo)n pro kg KGW appliziert, woraufhin die Dosis ausschleichend (stufenweise Reduktion bis auf 0,1 mg pro kg KGW pro Tag) über einen längeren Zeitraum verabreicht wird (Tabelle 1). Nach Ungemach sollte eine Langzeit-

Glukokortikoid-Therapie oral durchgeführt werden (135).

Tabelle 1: Therapie-Schema bei immunvermittelten Krankheiten (134)

| | mg/kg Prednison | Abstand (h) | Dauer (d) |
|-----------------|-----------------|-------------|-----------|
| Initialdosis | 1,0 | 12 | 10 - 28 |
| Erhaltungsdosis | 0,75 | 12 | 10 - 28 |
| | 0,5 | 12 | 10 - 28 |
| | 0,25 | 12 | 10 - 28 |
| | 0,25 | 24 | 10 - 28 |
| Ausschleichen | 0,25/0,5 | 48 | 21 |

Nebenwirkungen bei dauerhafter Steroidgabe können Stoffwechselstörungen, Hautveränderungen, zentralnervöse, kardiovaskuläre und renale Störungen sowie die Schwächung des Immunsystems sein (136).

2.4.3.2 Zytotoxische Medikamente

Das zytotoxische Arzneimittel Azathioprin ist ein Imidazolderivat des 6-Mercaptopurins. In der Leber erfolgt die Umwandlung in aktive Metabolite, die eine ausgeprägte Hemmung der Purin-de-Novo-, RNA- und DNA-Synthese in den Zellen bewirken. Dadurch erfolgt sekundär eine Hemmung der Proteinsynthese und somit werden stimulierende Zellen, wie z.B. Immunoblasten, gehemmt. Dieses Medikament wird in der Humanmedizin in einer Dosierung von 1-3 mg pro kg KGW oral oder intravenös verabreicht. Häufigste unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind eine gesteigerte Infektionsanfälligkeit, Knochenmarksuppression, Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie, gastrointestinale Komplikationen (Lebersyntheseeinschränkung) und Spermiogeneseeinschränkungen.

2.4.3.3 Cyclosporin A

Cyclosporin A ist ein zyklisches Polypeptid, das sich aus der Sequenz von 11 Aminosäuren zusammensetzt. Der wesentliche Effekt besteht in der Hemmung der Interleukin-2-Synthese in den antigenstimulierten T-Zellen. Darüber hinaus wird auch die Synthese von Interleukin 1 und Interferon Gamma blockiert (137, 138). Ein zytosolischer Rezeptor (Cyclophilin) wurde

als das Enzym Prolin-cis-trans-Isomerase identifiziert. Als molekularer Mechanismus der Wirkung werden eine Beeinflussung der Transkription von mRNA für z.B. Interleukin 2 oder die Blockierung der Signaltransduktion durch den Antigenrezeptor diskutiert. Zu 99% wird das Cyclosporin in der Leber durch das Cytochrom-P-450 metabolisiert. Die wichtigste Nebenwirkung ist die Nephrotoxizität. Weiterhin kann eine Senkung der glomerulären Filtrationsrate und somit eine Hypertension auftreten. Andere Nebenwirkungen sind Leberenzym erhöhungen, Hyperkoagulopathien, Tremor, Depression und eine Osteoporose.

2.4.3.4 Poly- und monoklonale Antikörper

Antiseren und gegen T-Zellen gerichtete monoklonale Antikörper wurden in der Humanmedizin zur Prophylaxe der Abstoßungsreaktion entwickelt und sind wirkungsvoller als Kortikosteroide, aber teilweise mit schweren Nebenwirkungen behaftet. Sie wurden erfolgreich zur Behandlung der akuten Abstoßungsreaktion verwendet.

3. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

An der Charité in Berlin sollte in der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Rheumatologie, AG Tissue Engineering, eine Maßnahme entwickelt werden zur Transplantatprotektion von subkutan implantierten autologen, aurikulären Knorpelzellen in einem immunkompetenten höheren Säugetier.

Spezielles Ziel war es, Ohrchondrozyten vom Schwein *in vitro* zu amplifizieren und vergleichend auf zwei verschiedene Trägermaterialien zu geben. Nach Implantation sollten die Transplantate in einem eng gefassten Zeitfenster (Tag 3, Tag 8, Tag 16 und Tag 31) wieder explantiert und in Bezug auf inflammatorische Reaktionen histologisch untersucht werden.