

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung eines rein  
autologen Fibrinklebers und dessen Anwendung im Tissue  
Engineering von Knorpelgewebe für die plastisch-  
rekonstruktive Chirurgie*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Loch  
aus München

Gutachter: 1. Priv. Doz. Dr. rer. nat. M. Sittinger  
2. Prof. Dr. Dr. med. N. Pallua  
3. Prof. Dr. med. M. Bloching

Datum der Promotion: 23.03.2007

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>5</b>
Curriculum Vitae .....	7
Danksagung .....	8
<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
Tissue Engineering .....	10
<b>Tissue Engineering von Knorpelgewebe für die plastisch rekonstruktive Chirurgie .....</b>	<b>10</b>
Aufbau von Knorpelgewebe .....	10
Rekonstruktion von Knorpelgewebe in der plastischen Chirurgie .....	13
Aktueller Stand des Tissue Engineering von Knorpelgewebe in der Plastisch Rekonstruktiven Chirurgie .....	14
<b>Die Matrix im Tissue Engineering von Knorpelgewebe .....</b>	<b>18</b>
Biomaterialien als Matrix im Tissue Engineering .....	18
Eigenschaften der Fibrinmatrix .....	20
Anwendungsbeispiele der Fibrinmatrix im Tissue Engineering .....	21
Die Fibrinmatrix im Tissue Engineering von Knorpelgewebe .....	22
Vor- und Nachteile einer autologen Präparation der Fibrinmatrix im Vergleich zur Herstellung aus Fibrinklebern aus gepooltem Plasma .....	24
Funktionsweise von Fibrinklebern .....	24
Die Blutgerinnung .....	25
Zur Entwicklungsgeschichte von Fibrinklebern .....	26
Nebenwirkungen von Fibrinklebern aus gepooltem Plasma .....	27
Präparation autologer Fibrinkleber .....	28
Vorteile der autologen Fibrinogenpräparation .....	29
Nachteile der autologen Fibrinogenpräparation .....	30
Komplikationen nach Anwendung von bovinem Thrombin .....	31
<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>Material .....</b>	<b>33</b>
Blutprodukte .....	33
Chondrozyten .....	33
Chemikalien und Reagenzien .....	33
Geräte .....	34
Verbrauchsmaterialien .....	34
<b>Methoden .....</b>	<b>36</b>
Gewinnung autologer Plasmabestandteile .....	36
Maschinelle Plasmagewinnung .....	36
Manuelle Plasmagewinnung .....	36
Präparation der Fibrinkleber .....	36
Präparation der Fibrinogenkomponente .....	36
Kryopräzipitation .....	37
Präparation der Thrombinkomponente .....	37
Isolation des Prothrombinkomplexes (PBSB) .....	37
Entsalzung des Prothrombinkonzentrates .....	38
Entsalzung durch Gelchromatographie .....	38
Aktivierung des Prothrombinkomplexes .....	38
Addition von Ca <sup>++</sup> als Cofaktor der Gerinnung .....	38
Aktivierung an negativ geladenen Obeflächen .....	38
Aktivierung durch rekombinantes Thromboplastin .....	39
Konservierung der Thrombinkomponente .....	39
Analyse des Fibrinogens, Prothrombins und Thrombins .....	39

Bestimmung der Fibrinogenkonzentration .....	39
Bestimmung des Prothrombingehaltes .....	39
Bestimmung der Thrombinaktivität.....	40
Zellkulturtechnik, Herstellung und Kultur von Transplantaten.....	40
Medium für die Isolation von Chondrozyten ( Enzymlyöung ).....	40
Medium für die Proliferation von Chondrozyten .....	40
Medium zur Kultur von Tranplantaten.....	40
Isolation von Chondrozyten aus der Knorpelmatrix .....	41
Proliferation der Chondrozyten .....	41
Passagieren und Ernten kultivierter Chondrozyten.....	41
Zählen der Chondrozyten .....	42
Präparation geformter Transplantate aus Chondrozyten und Fibrin .....	42
In vitro Kultivierung von Transplantaten .....	43
Manueller Austausch des Mediums.....	43
Kontinuierlich maschineller Austausch des Mediums.....	43
<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>Entwicklung der Präparationstechniken .....</b>	<b>44</b>
Beobachtungen zur Isolation der Fibrinogenkomponente.....	44
Geschlossenes System – Trennung im Plasmabeutel .....	44
Offenes System – Trennung in Falconröhrchen .....	45
Verfahrensentwicklung zur Präparation von autologem Thrombin .....	46
Entwicklung eines geschlossenen Einmalsets zur Thrombinpräparation .....	46
Konstruktion einer autoklavierbaren Präparationsvorrichtung .....	50
Vergleich der geschlossenen und offenen Herstellungsverfahren.....	53
Weitere Anpassung des Prozesses während der klinischen Präparation.....	53
Übersicht des gesamten Verfahrens .....	55
<b>Anwendung des autologen Fibrinklebers als Zellmatrix im Tissue Engineering zur Rekonstruktion eines Ohrmuscheldefektes am Patienten. ....</b>	<b>56</b>
<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>Methoden der Plasmagewinnung.....</b>	<b>62</b>
<b>Präparation der Fibrinogenkomponente .....</b>	<b>62</b>
<b>Entwicklung von Herstellungsverfahren zur Thrombingewinnung - offenes versus geschlossenes Systeme. ....</b>	<b>63</b>
<b>Aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der autologen Plasmaseparation .....</b>	<b>64</b>
Das CryoSeal®- System.....	64
Das Vivostat®- System.....	64
Gesamtkonzept einer Aufbereitung von autologem Plasma für das Tissue Engineering .....	64
<b>Verwendung der autologen Fibrinmatrix zur plastisch-rekonstruktiven Wiederherstellung eines Ohrmuscheldefektes mittels Tissue Engineering am Patienten .....</b>	<b>67</b>
<b>Neuere Ansätze zum Schutz von gezüchtetem Knorpel.....</b>	<b>69</b>
<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>72</b>
<b>LITERATUR .....</b>	<b>73</b>

## Zusammenfassung

Durch die Methoden des Tissue Engineerings wird versucht Zellen mit geeigneten Biomaterialien als Matrix zu verbinden um daraus Ersatzgewebe zu züchten. Wegen vieler für eine Matrix günstiger Eigenschaften und insbesondere wegen seiner hervorragenden Biokompatibilität ist Fibrin zu einer häufig verwendeten Matrix im Tissue Engineering geworden. Autologes Fibrinogen wurde bisher mit bovinem Thrombin zur Polymerisation gebracht, welches bei wiederholter Anwendung jedoch gelegentlich zu zum Teil schwersten immunologischen Nebenwirkungen und in einigen Fällen sogar zum Tode führte. Ziel dieser Untersuchung war es ein Verfahren zu entwickeln alle nötigen Komponenten autolog aus dem Plasma eines einzigen Patienten zu gewinnen.

Nach Fällung von Fibrinogen mittels Cryopräzipitation wurde Thrombin durch Ionenaustauschchromatographie aus etwa 200ml Plasma herausadsorbiert. Hierbei wurde Thrombin zunächst an Sephadex A-50 gebunden, dann mittels eines Salz Puffers eluiert und letztlich durch Sephadex G-50 von Salz gereinigt. Im Hinblick auf eine klinische Anwendbarkeit wurde hierfür der Prototyp eines Einmalsets entworfen, welcher die gesamte Präparation innerhalb eines geschlossenen Systems erlauben sollte. Die mit diesem Prototypen hergestellten Thrombinkonzentrate ergaben Werte mit einer sehr hohen Schwankungsbreite von 0,4 – 600 NIH, einem Mittelwert von 129,39 NIH und einer Standardabweichung von 244,47 NIH. Wegen der schlechten Reproduzierbarkeit der Thrombinaktivitäten wurde deshalb in einem weiteren Ansatz eine Präparationseinheit entwickelt, die eine bessere Kontrollierbarkeit der einzelnen Arbeitsschritte erlaubte. Die hiermit hergestellten Thrombinkonzentrate zeigten eine größere Homogenität der Thrombinaktivität mit Werten von 51,9 – 414 NIH, einem Mittelwert von 186,2 NIH und einer Standardabweichung von +/- 81,1 NIH/ml.

Durch das hier vorgestellte Verfahren konnte so erstmals ein Fibrinkleber aus rein autologen Komponenten hergestellt werden, welcher es ermöglichte sowohl immunologische Reaktionen als auch die Übertragung von Virusinfektionen sicher auszuschließen.

In einer ersten klinischen Anwendung wurde die Fibrinmatrix zur Rekonstruktion eines Ohrmuscheldefektes eingesetzt. Dem Patienten wurde hierfür Rippenknorpel entnommen, dessen Zellen in-vitro kultiviert und durch den Fibrinkleber und eine

nach epithetischen Verfahren hergestellte Gussform in eine präzise und defektanaloge Form gebracht wurden. Nach einer weiteren in-vitro Reifungsphase erfolgte die operative Einpassung des Transplantates.

Obwohl der Defekt mit dem Transplantat gut zu rekonstruieren war ließ die plastische Stabilität mit zunehmender postoperativer Dauer nach, so dass zu einem späteren Zeitpunkt die Ohrmuschel mit Conchaknorpel der Gegenseite verstärkt wurde. Die Erhaltung einer präzisen und bestimmten Form bleibt daher weiterhin die größte Herausforderung im Tissue Engineering von Knorpelgewebe für die plastisch-rekonstruktive Chirurgie. Insbesondere auf die in-vivo Integration von gezüchteten Transplantaten und den Schutz vor Reaktionen des umgebenden Gewebes sollte in Zukunft noch näher eingegangen werden.

## Curriculum Vitae

Alexander Loch

geb. am 08.09.1972 in München

### Tätigkeiten

seit  
01/2007

**Oberarzt**  
HNO Klinik und Poliklinik, Charité

12/2005

**Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde**

seit  
01/2001

**Wissenschaftlicher Mitarbeiter**  
HNO Klinik und Poliklinik, Charité

02/2004

**Visiting Resident**  
House Ear Insititute, Los Angeles, USA

10/2002

**Visiting Resident (auf Einladung)**  
Mayo Clinic, Rochester, USA

01/2002

**Approbation als Arzt (01.01.2002)**

01/2000  
12/2000

**Wissenschaftlicher Mitarbeiter**  
Tissue Engineering Labor, PD Dr. M. Sittinger  
Charité Campus Mitte

10/1996  
08/1998

**Freier Mitarbeiter**  
Multimedica – Health Online Service  
Medizinischer Internetdienst für Ärzte

10/1994  
09/1996

**Tutor im Institut für Soziale Medizin**  
Abteilung Medizinsoziologie und Historische Anthropologie  
Freie Universität Berlin

10/1994  
09/1997

**Übungsleiter Hochschulsport – FU Berlin**  
Selbstverteidigung für Anfänger und Fortgeschrittene

### Ausbildung

0/1998  
02/1999

*Praktisches Jahr*  
HNO Klinik und Poliklinik  
Charité Campus Mitte

02/1999  
06/1999

Innere Medizin (Nephrologie und Psychosomatik)  
Campus Virchow Klinikum

06/1999  
09/1999

Chirurgie, Hospital Metropolitano  
Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

10/1992  
11/1999

*Medizinstudium*  
Humboldt Universität zu Berlin und Freie Universität Berlin

04/1992  
10/1992

*Chemiestudium*  
(Freie Universität Berlin)

## ***Danksagung***

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr.rer.nat. Michael Sittinger und Dr.med. Andreas Haisch. Herrn PD Dr. M. Sittinger für die fachliche Betreuung der Laborarbeiten, für die Freiheit in der Themenwahl und für die Möglichkeit in einer kreativen Arbeitsgruppe mitwirken zu können. Herrn Dr. Andreas Haisch für die Anregung zum Thema und die klinische und motivierende Betreuung der Arbeit. Bei Herrn PD Dr. med. Axel Pruß bedanke ich mich für die Bereitstellung zahlreicher Plasmen und für die Möglichkeiten der Labornutzung in der Transfusionsmedizin, bei Frau Dr. med. Sabine Ziemer und Dr.med. Roland Hansen für die Hilfe bei der Messung der Gerinnungsfaktoren. Herr Dipl.Ing. Jan David hat bedeutend an der Entwicklung der Präparationsvorrichtungen mitgewirkt. Herr Prof. Dr.rer.nat Norbert Ulbrich hat wertvolle Hinweise für Reinigung der Proteinfractionen gegeben. Für die Möglichkeit an einem klinischen Einsatz des Tissue Engineerings in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie methodisch mitwirken zu können danke ich Herrn Dr.med. Dirk Schäfer und Herrn Prof. Dr.med. Björn Stark. Für die Unterstützung die Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen bin ich Herrn Prof. Dr. med. Volker Jahnke zu Dank verpflichtet. Für wichtige Hilfestellungen zur Bewältigung organisatorischer Probleme danke ich Frau Dr. rer.nat. Michaela Endres und Frau Johanna Golla. Besonders danke ich auch meiner Frau Veslea für die Schaffung von Freiräumen und die Anteilnahme sowie meinen Eltern Dr.med. Horst Loch und Adelheid Loch für die Begleitung auf dem Weg.

### **Erklärung an Eides statt**

Die Dissertation ist von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt worden. Auch in Teilen stellt sie keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, 17.Mai 2006

Alexander Loch