

Einleitung

Tissue Engineering

Ziel des Tissue Engineering ist es, biologische Ersatzgewebe zu entwickeln, um Gewebefunktionen wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern. In der Regel werden hierfür zunächst kleine Proben des entsprechenden Gewebes entnommen. Nach Trennung von der umgebenden Matrix werden die Zellen dann in-vitro vermehrt und nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl mit geeigneten Biomaterialien zu einem vorläufigen Ersatzgewebe angeordnet. Die Biomaterialien übernehmen so für eine bestimmte Zeit die Aufgaben des extrazellulären Gewebeanteils. Aus diesem Grund werden vorwiegend solche Biomaterialien verwendet die biodegradierbar sind und parallel zu Neubildung der eigenen Zellmatrix abgebaut werden. Hierbei wird deutlich dass es sich nach Vereinigung der vermehrten Zellen mit einem Biomaterial noch nicht um ein vollwertiges Gewebe handelt. Die dreidimensional angeordneten Zellen müssen in-vitro und/oder in-vivo erst zu einem Ersatzgewebe heranreifen. Während der Vermehrungsphase der Zellen in Monolayerkultur kommt es meist zu einer Dedifferenzierung der Zellen, d.h. zu einer Änderung der Morphologie und des Stoffwechsels. Sie entwickeln sich dann hin zu einem eher fibroblastenartigen Erscheinungsbild und verlieren dabei einen Teil ihrer gewebetypischen Eigenschaften. Die dreidimensionale Anordnung mit Hilfe von Biomaterialien ist dann für Zellen der entscheidende Impuls zu redifferenzieren und ihre gewebetypischen Funktionen wieder aufzunehmen.

Tissue Engineering von Knorpelgewebe für die plastisch rekonstruktive Chirurgie

Aufbau von Knorpelgewebe

Knorpelgewebe besteht aus Chondrocyten und seinen Interzellulärsubstanzen, die auch als Matrix bezeichnet werden. In der Literatur wird zwischen drei Knorpelarten, dem hyalinen, dem elastischen und dem Faserknorpel unterschieden. Die Matrix besteht hauptsächlich aus kollagenen und elastischen Fasern, und einer Grundsubstanz, welche besonders reich an sulfatierten Glycosaminoglycanen und Proteoglykanen ist. Die Grundsubstanz und die Fasern verleihen der extrazellulären Matrix ihre typischen physikochemischen Eigenschaften. Dazu gehören die Gewährleistung einer reibungslosen Gelenkfläche, wie auch die Fähigkeit

mechanischen Kräften ohne Deformation zu widerstehen und impulsartige Kräfte zu absorbieren. Knorpelgewebe ist in begrenztem Umfang vorübergehend verformbar und vermag je nach physiko-chemischer Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz Druck- und/oder Zugbelastungen zu kompensieren. Es wirkt also insgesamt stoßdämpfend und elastisch. Beim Erwachsenen besitzt der Knorpel weder Blut-, noch Lymphgefäße oder Nerven. Je nach morphologischen Charakteristika der Interzellulärsubstanz unterscheidet man zwischen hyalinem, elastischem und Faserknorpel.

Hyaliner Knorpel kommt am häufigsten vor, er hat keine Gefäße und ist mit Ausnahme von Gelenkknorpel von einem Perichondrium umgeben. Das Perichondrium hat ein äußeres Stratum fibrosum und ein inneres Stratum chondrogenicum. Hyaliner Knorpel besteht aus Chondrozyten mit einem Territorium und einem Interterritorium. Er kommt im embryonalen Skelett (Primordialskelett), in den Gelenken, in der Rippe und in den luftleitenden Wegen (Nase, Trachea, Bronchien), sowie im Kehlkopf (Schild- und Ringknorpel) vor. Er ist funktionell vorwiegend auf Druckbeanspruchung ausgelegt und im lebensfrischen Zustand bläulich-weiß und durchscheinend. Form und Anordnung der Knorpelzellen sind veränderlich. In der Knorpelperipherie dominieren einzeln liegende, längsovale Zellen, im Knorpelzentrum durchweg Gruppen rundlicher Zellen. Seine Interzellulärsubstanz erscheint homogen, da die eingelagerten Fasern lichtmikroskopisch nicht ohne weiteres sichtbar sind, sie sind "maskiert". Die Oberfläche des hyalinen Knorpels wird, die von Gelenkknorpel ausgenommen, von der Knorpelhaut, dem Perichondrium bedeckt. Es ist fest mit dem Knorpel verbunden und stellt sein appositionelles Wachstum sowie seine Stoffwechselfversorgung sicher.

Der elastische Knorpel enthält mehr Zellen als extrazelluläre Matrix. Der Knorpel ist auch aus Chondronen aufgebaut und man findet außerdem elastische Fasern und kollagene Fasern vom Typ II, man findet ihn in der Ohrmuschel, in der Ohrtrumpete, in der Epiglottis und den kleinsten Bronchien. Er ist vorwiegend an Stellen an denen außer Druckkompensation auch Biegsamkeit, also Elastizität erforderlich ist. Folglich ist der elastische Knorpel ähnlich gestaltet wie der hyaline. Lebensfrisch sieht der elastische Knorpel je nach Menge der eingelagerten elastischen Fasern mehr oder weniger intensiv gelblich aus. An der Oberfläche ist der elastische Knorpel ebenfalls

vom Perichondrium überzogen. Die Knorpelhaut ist gleichermaßen verantwortlich für das appositionelle Wachstum, für die Ernährung sowie die Verankerung des Knorpels in seiner Umgebung.

Faserknorpel hat kein Perichondrium, die Chondrozyten sind von einem schmalen basophilen Hof umgeben. Die Extrazellulärmatrix besteht aus kollagenen Fasern Typ I und Grundsubstanz. Faserknorpel kommt vor allem in den Zwischenwirbelscheiben, den Menisci des Knies, in der Mandibula, im sternoklavikulären Gelenk und in der Symphyse vor. Er wird auch als "fibröser Knorpel" oder "Bindegewebsknorpel" bezeichnet. Faserknorpel entwickelt sich aus straffem Bindegewebe, wenn es nicht nur auf Druck, sondern auch auf wechselnden Zug beansprucht wird. Faserknorpel ist vergleichsweise zellarm. Seine Zellen (Chondrozyten) leiten sich von Fibroblasten ab. Sie verteilen sich säulenartig einzeln oder in Gruppen in der Interzellulärsubstanz. Die Interzellulärsubstanz besteht, ähnlich wie im straffen Bindegewebe aus wenig Grundsubstanz und aus sehr vielen, kräftigen kollagenen Fasern vom Typ I. Ein Perichondrium fehlt dem Faserknorpel.

Alle drei Knorpeltypen entstehen aus den Mesenchymzellen. Diese differenzieren sich zu den Chondroblasten, welche sich teilen und die extrazelluläre Matrix sezernieren (appositionelles Wachstum). Bald schon werden sie von dieser umgeben und finden sich in einer sogenannten Lakune wieder, in welcher sie ihre Syntheseaktivität fortsetzen und sich noch einige Male teilen (interstitielles Wachstum). Dieses interstitielle Wachstum ist nur möglich, so lange die Grundsubstanz noch nicht zu fest ist. Später wächst der Knorpel nur noch durch appositionelles Wachstum. Nachdem sich der einzelne Chondroblast selber eingeschlossen hat, spricht man vom Chondrozyten. Die Gruppe von Zellen, welche bei der interstitiellen Teilung des Chondrozyten entsteht, wird isogene Knorpelzellengruppe genannt. Dieser Begriff weist auf die gemeinsame Abstammung dieser Zellgruppe von einer einzigen Zelle (dem ursprünglichen Chondroblasten) hin. Die Region, welche die isogene Knorpelzellen umgibt, zeichnet sich durch eine verstärkte Basophilie aus und färbt sich auf Präparaten dunkler. Man spricht von einem Territorium. Isogene Knorpelzellen und Territorium bezeichnet man als Chondron dazwischen liegt die Interterritorialzone.

Rekonstruktion von Knorpelgewebe in der plastischen Chirurgie

In der rekonstruktiven Chirurgie kommen zur Wiederherstellung von Form und Funktion neben avitalen, allogenen Werkstoffmaterialien (Romo, Fozo et al. 2000), individuell an die anatomischen Verhältnisse angepasste, vitale Gewebetransplantate zum Einsatz. Insbesondere im Kopf-Hals-Bereich findet man eine Vielzahl komplex geformter Strukturen, wie das Ohr, die Nase, den Kehlkopf und die Trachea. Die individuell stark differierende und komplexe Formgebung dieser Strukturen stellt hohe Anforderungen an das für eine Rekonstruktion ausgewählte Transplantat. Kleinere Defekte lassen sich nahezu problemlos mit dem zur Verfügung stehenden körpereigenen Knorpelreservoir autogen rekonstruieren (Rettinger 1992; Hartig, Esclamado et al. 1994). Bei der Rekonstruktion größerer Defekte stößt man jedoch schnell an die Grenzen der Verfügbarkeit. Ein weiteres Problem neben der Verfügbarkeit stellt die Formung und Stabilität der autogen entnommenen Knorpeltransplantate dar (Williams, Romo et al. 1997). Bis heute steht sowohl für die Ohrrekonstruktion, als auch für die Trachearekonstruktion kein den funktionellen und kosmetischen Anforderungen Rechnung tragendes optimales Rekonstruktionsverfahren zur Verfügung (Weerda 1979; Weerda and Schumann 1980; Nagata 1994; Nagata 1995). Bei der Rekonstruktion von Ohrmuschelteildefekten kann man zwischen zwei Hauptkategorien unterscheiden, den zirkumferenzreduzierenden Techniken bei denen gesundes Gewebe entfernt wird und welche kleinere und assymetrische Ohren zur Folge haben, und die Techniken bei denen angestrebt wird das Volumen durch die Interposition von Transplantaten oder Lappen oder auch beidem zu erhalten (Brent 1978; Brent and Byrd 1983). Wenn der primäre Verschluss eines posttraumatischen Defektes nicht möglich ist, ist die Methode der Wahl üblicherweise der Ersatz des Defektes durch autologes vitales Gewebe (Kobus, Szczyt et al. 2002). Die begrenzte Menge von autologem Knorpel, die Tatsache, daß er schwierig zufrieden stellend zu Formen ist, sowie das Entstehen eines Hebedefektes kann eine akzeptable Lösung bei manchen Patienten schwierig machen.

Rippenknorpel zu entnehmen zu formen und die feine Architektur eines menschlichen Ohres wiederzugeben braucht sehr viel chirurgische Erfahrung (Brent 1999). Den Ersatz eines ganzen Ohres betreffend gibt es nur wenige Chirurgen, die zuverlässig eine akzeptable und detaillierte Ohrform am Ende des mehrstufigen chirurgischen Konzeptes erreichen (Romo, Fozo et al. 2000). Die Schwierigkeit der

Rekonstruktion ganzer Ohrmuscheln aus autologem Rippenknorpel drückt sich auch in der Vielzahl der beschriebenen Techniken aus (Rettinger 1992; Nagata 1994; Kobus, Szczyt et al. 2002; Weerda 2003; Weerda 2003). Keine dieser Techniken kann das gesamte Ohrstützgerüst aus einem in sich zusammenhängenden autogenen Knorpelstück herstellen. Die Rekonstruktion erfolgt durch die Kombination zweier Rippenfragmente zu einem ohrähnlichen Stützgerüst. Dies kann zu Instabilität und kosmetisch unbefriedigenden Ergebnissen führen (Tanzer 1978; Kobus, Szczyt et al. 2002). Ebenso verhält es sich mit der Rekonstruktion von Trachealdefekten (Weerda 1979). Kein körpereigenes Knorpelreservoir bietet eine Knorpelstruktur, mit der sich ein zusammenhängender Trachealring rekonstruieren ließe. Eine Alternative zu den momentan zur Verfügung stehenden Methoden stellt daher möglicherweise in Zukunft das Tissue Engineering künstlichen Gewebes aus körpereigenen Zellen dar (Ting, Sims et al. 1998; Haisch, Klaring et al. 2002, Walgenbach, Voigt et al. 2001; Haisch, Klaring et al. 2002))

Aktueller Stand des Tissue Engineering von Knorpelgewebe in der Plastisch Rekonstruktiven Chirurgie

Mitte der neunziger Jahre etablierte das um die Welt gegangene Bild eines menschlichen Ohres auf dem Rücken einer Maus das Tissue Engineering in der Öffentlichkeit als eigenständigen wissenschaftlichen Zweig (Shieh, Terada et al. 2004). Zuvor wurde es vor allem als Grenzbereich zwischen Biomaterialtechnik, Zellbiologie und Medizin wahrgenommen. Noch immer stellt die Züchtung einer menschlichen Ohrmuschel eine der herausragenden Visionen des Tissue Engineering dar (Westreich, Kaufman et al. 2004).

Zuvor war zu Beginn der achtziger Jahre gezeigt worden, dass in Monolayer vermehrte und dedifferenzierte Chondrozyten nach Suspension in Agarosegel in der Lage sind zu redifferenzieren und wieder knorpeltypische Matrix zu exprimieren (Benya and Shaffer 1982). Etwa zehn Jahre später wurden erstmals autologe, in-vitro vermehrte und in Fibrinkleber suspendierte Chondrozyten erfolgreich zur Behandlung von Kniegelenksdefekten klinisch eingesetzt (Peterson, Minas et al. 2000).

Seit dem gibt es eine Vielzahl von Ansätzen Knorpelzellen nicht nur als Zellsuspension in der wiederherstellenden Gelenkschirurgie einzusetzen sondern auch geformte dreidimensionale Transplantate für die plastisch rekonstruktive Chirurgie zu züchten (Haisch, Schultz et al. 1996; Ting, Sims et al. 1998; Haisch, Klaring et al. 2002; Kamil, Kojima et al. 2003). Chondrozyten unterschiedlichster

Herkunft wurden hierfür in-vitro und in-vivo mit verschiedenen Biomaterialien getestet. Die einzelnen Versuche sind nicht ohne weiteres miteinander zu vergleichen, da das Proliferationsverhalten der Chondrozyten und die Fähigkeit eine den Anforderungen entsprechende Knorpelmatrix synthetisieren zu können von einer ganzen Reihe von Faktoren abhängig ist. So gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Entnahmeorten, d.h. ob es sich um Ohr-, Nasenseptum-, Rippen- oder Gelenksknorpel handelt (Tay, Farhadi et al. 2004), Unterschiede zwischen Gewebespendern verschiedenen Alters (Rotter, Bonassar et al. 2001) und den Knorpelarten unterschiedlicher Spezies. Als weitere wesentliche Punkte sind zu beachten, ob die Zellen vermehrt worden sind oder als Primärkultur zur Herstellung eines Transplantates verwendet wurden (Schulze-Tanzil, de Souza et al. 2002) und auch in welchem Tier (Albu, Bratucu et al. 1979) und an welchem Implantationsort (ten Koppel, van Osch et al. 2001; Westreich, Kaufman et al. 2004) die Transplantate zur Anwendung kamen. Auch Umgebungseinflüsse, wie Immunreaktionen, Wundheilung und Gefäßversorgung spielen eine ganz wesentliche Rolle (Haisch, Groger et al. 2000; Haisch, Wanjura et al. 2004). Darüber hinaus ist die Zelldichte (Mauck, Seyhan et al. 2002) der Transplantate von Bedeutung und wie lange die Transplantate in vitro in Kultur gehalten wurden, bevor sie implantiert wurden (Nixon, Sams et al. 1993). Für den klinischen Einsatz autologer Zellen ist die Redifferenzierung der Knorpelzellen nach Proliferation in-vitro von besonderer Bedeutung (Schulze-Tanzil, de Souza et al. 2002). Sie sollte möglichst in vitro eingeleitet und in vivo gesichert werden, um die Bildung von für die Geweberekonstruktion minderwertigem Faserknorpel zu verhindern. Da das Problem der begrenzten Verfügbarkeit von körpereigenem Knorpel mit Hilfe des Tissue Engineerings durch Vermehrung der Zellen in vitro gelöst werden soll, werden Faktoren untersucht, mit denen die Proliferationsrate gesteigert werden kann (van Osch, Mandl et al. 2002). Die Vermehrung in Monolayer geht jedoch mit einem Verlust der Differenzierung der Knorpelzellen zu eher fibroblastenähnlichen Zellen einher (Benya and Shaffer 1982). Die Redifferenzierung wird durch dreidimensionale Anordnung eingeleitet und durch geeignete Biomaterialien (Lahiji, Sohrabi et al. 2000) oder Faktoren wie BMP's (Sittinger, Perka et al. 1999; Frenkel, Saadeh et al. 2000) unterstützt. Durch die bisher durchgeführten Untersuchungen konnten wichtige Erkenntnisse über das Vermehrungs- und Redifferenzierungspotential von Knorpel unterschiedlicher Herkunft wie z.B. Knie (Richardson, Caterson et al. 1999), Ohr

(Rodriguez, Cao et al. 1999), Nase (Sittinger, Braunling et al. 1997), Rippe (Saadeh, Brent et al. 1999), und über das in vivo Verhalten der Transplantate in verschiedenen Tiermodellen gesammelt werden (Cao, Rodriguez et al. 1998; Kamil, Vacanti et al. 2004; Westreich, Kaufman et al. 2004). Nach vielversprechenden grundlegenden Untersuchungen in der Nacktmaus wurde versucht diese Modelle auf immunkompetente Tiere, wie Kaninchen, Schweine oder Pferde zu übertragen. Dort trat jedoch die im Ansatz in der Nacktmaus beobachtete Größenreduktion und bindegewebige Infiltration noch verstärkt auf (Cao, Rodriguez et al. 1998). Ermutigende klinische Therapieerfolge bei Patienten mit Gelenkknorpeldefekten (Peterson, Minas et al. 2000) konnten deshalb bisher nicht auf gezüchtetes dreidimensionales Gewebe für die plastisch-rekonstruktive Chirurgie übertragen werden (Haisch, Groger et al. 2004). Die derzeit bestehenden Probleme frei transplantierbares struktur- und formgebendes Gewebe zu entwickeln resultieren größtenteils aus immunologisch vermittelten Reaktionen denen die gezüchteten Gewebe im autologen Organismus gegenüberstehen (Haisch, Wanjura et al. 2004). Dies liegt an der noch nicht vollständig ausgebildeten eigenen Matrix, der anderen Transplantatumgebung, und den Fremdkörperreaktionen, die vor allem durch die bisher verwendeten Biomaterialien hervorgerufen werden (Cao, Rodriguez et al. 1998). Zellinfiltrationen, fibröse Gewebeveränderungen und Transplantatschrumpfungen sind deshalb oft die Folge (Haisch, Groger et al. 2000). Sowohl die im Rahmen der normalen Wundheilung auftretenden Reaktionen als auch die Immunantworten auf einige Biomaterialien führen zu Formveränderungen oder partiellen Resorption der Implantate mit Auswirkungen auf deren funktionelle und morphologische Eigenschaften (Cao, Rodriguez et al. 1998). Das Einwachsen von Fibroblasten und Gefäßen ruft eine Minderung der Qualität hervor, da so eher bindegewebiger als elastischer oder hyaliner Knorpel entsteht (Haisch, Wanjura et al. 2004). Wahrscheinlich besitzen sogar Chondrozyten selbst ein antigenes Potential (Bujia, Alsalameh et al. 1994). Die Oberflächenstrukturen der Knorpelzellen werden im gesunden Organismus normalerweise durch die Knorpelmatrix und das Perichondrium ausreichend vor Kontakt mit dem Immunsystem geschützt. Dem im Labor hergestellten Knorpel fehlt dieser Schutz bei Implantation jedoch, da meist noch nicht genügend eigene Matrix produziert wurde und ihn auch kein natürliches Perichondrium umgibt. Diese Reaktionen, die isoliert nur geringe Auswirkungen zeigen, scheinen sich zu addieren und gegenseitig zu verstärken (de Tulio, Okamoto

et al. 1992). Durch verschiedene Ansätze ist deshalb mittlerweile versucht worden die Bildung der Knorpelmatrix zu beschleunigen und damit die Stabilität der Transplantate zu erhöhen. Zum Teil ist es im Tierversuch gelungen die Infiltration von gezüchtetem Knorpel durch Bindegewebe durch Immunmodulation mit Cortison positiv zu beeinflussen, gleichzeitig führte das Cortison jedoch auch zu einer Induktion zur Bildung von trabekulärem Knochen innerhalb der Transplantate (Haisch, Wanjura et al. 2004). Es ist weiterhin versucht worden die Matrixbildung durch biomechanische Stimulation anzuregen, aber obwohl man weiß, dass gepulster Ultraschall niedriger Intensität die Chondrogenese in-vitro beschleunigt zeigte dieses Vorgehen keinerlei unterstützenden Effekt auf die Gewebereifung in vivo (Duda, Kliche et al. 2004). Andere Studien zeigten dahingegen, dass die Verkapselung mit einem artifiziellem Perichondrium aus einer semipermeablen Polyelektrolyt Membran einen ausreichenden Schutz gegen resorptive Prozesse bieten kann (Haisch, Groger et al. 2004). Die Membranverkapselung der Transplantate durch Natriumcellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid stellt somit einen ersten erfolgversprechenden Ansatz dar, diesem Problem zu begegnen. Bisher konnte gezeigt werden, daß die Kapsel die Transplantate vor Resorption schützt und trotz der Membran eine ausreichende Ernährung gewährleistet (Haisch, Groger et al. 2000). Anhand der elektronenmikroskopischen und histologischen Auswertung konnten außerdem wichtige Erkenntnisse über die fibroblastischen Infiltrationsprozesse gesammelt werden. Durch eine definierte Porengröße, soll außerdem eine verbesserte Matrixakkumulation und damit eine schnellere in vivo Ausreifung durch Ansammlung von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen erreicht werden. Obwohl die Transplantate durch die Kapsel gut vor immunologischen Reaktionen und fibroblastischen Einwachungen geschützt werden konnten, rief auch die Kapsel selbst an der gewebeständigen Seite eine leichte Immunreaktion und Fibroblastenwachstum hervor (Haisch, Groger et al. 2000).

Bei speziellen Indikationen, wie sie in ersten Publikationen erwähnt werden, sind Formstabilität und knorpeltypische Eigenschaften weniger wichtig. Hier reicht zum Teil das Entstehen eines festen, leicht elastischen Bindegewebes (Lee, Vacanti et al. 2000). So wurden zur Korrektur des vesiko-ureteralen Reflux bei Kindern im Labor gezüchtete, autologe Chondrozyten unter die Harnleitermündung injiziert. Durch das entstehende knorpelartige Gewebe wird der Winkel des Harnleiters verändert und

das Lumen soweit verengt, daß es der retrograde Urinfluß in die Nieren verhindert wird (Kershen, Fefer et al. 2000). Obwohl es bereits gelungen ist Ersatzknorpel herzustellen, dessen biomechanische Eigenschaften dem von Nasenseptumknorpel entsprechen (Duda, Haisch et al. 2000), bleibt die Anwendung in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie, die auch auf die Form des zu rekonstruierenden Gewebes angewiesen ist, wegen der beschriebenen Umgebungseinflüsse noch kritisch (Weerda 2003; Shieh, Terada et al. 2004). Darüber hinaus hat man es in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie, anders als in der Gelenkschirurgie in der Regel mit Defekten zu tun die neben Knorpel zusätzlich noch andere Gewebe betreffen, wie z.B. Haut oder Respirationsepithel (Hartig, Esclamado et al. 1994; Weerda 2003). Während bei Defekten der Ohrmuschel oder dem Nasenseptum vor allem kosmetische Gesichtspunkte eine Rolle spielen, die für Patienten mit erheblichen Einbußen in der Lebensqualität verbunden sein können sind bei Verlust von Teilen der Trachea oder dem Larynxskelett so zentrale Funktionen wie Atmung und Stimme betroffen. Insgesamt konnten in den letzten Jahren in der Herstellung von Ersatzknorpel große Fortschritte erzielt werden. Kulturbedingungen, wie Medien, Wachstumsfaktoren und Einbettmaterialien wurden soweit optimiert, daß sich Zellen vermehren, dreidimensional anordnen und zu matrixbildenden Zellen redifferenzieren lassen. Einige Modelle wurden auf immunkompetente Tiere übertragen und befinden sich in nicht knorpeltypischen Anwendungen in klinischen Pilotstudien. Frei transplantierbarer Knorpel für die plastisch rekonstruktive Chirurgie ist bisher vor allem wegen immunologischer und aus der Wundheilung stammender Reaktionen noch nicht verfügbar gewesen.

Die Matrix im Tissue Engineering von Knorpelgewebe

Biomaterialien als Matrix im Tissue Engineering

Wichtige grundlegende Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Suche nach den optimalen Biomaterialien. Um Chondrozyten nach Kultivierung in Monolayer wieder in eine dreidimensionale Struktur bringen zu können, werden Biomaterialien benötigt, die biokompatibel sind und vom Körper abgebaut und ausgeschieden werden können. Eine ganze Reihe von Stoffen, wie z.B. Agarose, Alginat, Fibrin, Hyaluronsäure, Kollagene, Polymerstrukturen aus Ploylaktid, Polylaktid und Polyethylen sind hierfür sowohl in-vitro als auch in-vivo getestet worden

(Hutmacher, Goh et al. 2001). Biologische Materialien bieten oft den Vorteil keine oder nur geringe Fremdkörperreaktionen hervorzurufen, während synthetisch hergestellte Stoffe leichter mit standardisierten Qualitätsmerkmalen hergestellt werden können (Cao, Rodriguez et al. 1998). Viele der bisher getesteten Materialien haben günstige Eigenschaften, unterliegen aber auch Einschränkungen. Agarose beispielsweise ermöglicht eine homogene Zellverteilung und ist mit gleichbleibender Qualität herstellbar (Rotter, Aigner et al. 1998), ist jedoch auch leicht brüchig, weniger gut zu handhaben und bisher noch nicht abschließend auf Biokompatibilität getestet (Kao, Rose et al. 1999; Bosch, Lennertz et al. 2000). Sehr gute Ergebnisse konnten mit resorbierbaren Vliesstrukturen aus Polyglykolid und Polylaktid erzielt werden (Sittinger, Bujia et al. 1996). Diese Polymervliesstrukturen bieten eine ausreichende dreidimensionale Stabilität bei gleichzeitig guten Ernährungsbedingungen während der Kulturphase. Als nachteilig erwies sich jedoch eine inhomogene dreidimensionale Zellverteilung und die geringe Zellanhaftung an die Trägerstruktur (Bujia, Sittinger et al. 1995). Auch Kollagengele haben sich bewährt. So wurden bereits 1982 Versuche zur Differenzierung von in Kollagengelen eingebetteten Chondrocyten aus Kükenembryos mit Erfolg durchgeführt (Yasui, Osawa et al. 1982). In vergleichenden Untersuchungen zum Verhalten von Chondrocyten in Collagen- und Alginatgelen hat sich darüber hinaus gezeigt, dass Zellen in Kollagengelen zwar signifikant höhere Zuwachsraten hinsichtlich ihrer Zellzahl hatten, jedoch die in Alginat gewachsenen Chondrocyten mehr Proteoglykane bildeten (van Susante, Buma et al. 1995). Hyaluronsäure als natürlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix ist biokompatibel und bioresorbierbar, und kann durch ihre hohe Wasserspeicherkapazität einen dem Knorpel ähnlichen Gewebeturgor simulieren. Hyaluronsäure induziert die Redifferenzierung in vitro amplifizierter Chondrozyten und gewährleistet eine gute Zellverteilung und Aggregation in den Transplantaten. Durch ihre geringe Viskosität kann mit Hyaluronsäure als alleinige Matrix für Chondrozyten jedoch kein formstabiles Transplantat hergestellt werden (Gerard, Catuogno et al. 2005).

Bei einigen der getesteten Biomaterialien, die in-vitro und im Nacktmausmodell viel versprechende Ergebnisse in Bezug auf Knorpelbildung zeigten, kam es im immunkompetenten Tiermodell jedoch zu zum Teil heftigen Immun- und Entzündungsreaktionen, die zu einer teilweisen oder völligen Zerstörung der Transplantate führte (Cao, Rodriguez et al. 1998).

Ganz allgemein unterscheiden kann man zwischen Biomaterialien die in-vitro bereits in der gewünschten Form vorliegen und solchen die in den entsprechenden Defekt injiziert werden und erst nach Applikation in in-vivo aushärten (Elisseeff 2004). Von den injizierbaren Biomaterialien, scheint das zu den Polyethylenen zählende Pluronics auch im immunkompetenten Tier zu vergleichsweise geringen Immun- und Entzündungsreaktionen zu führen (Cao, Rodriguez et al. 1998). Bei einigen Transplantaten kam es jedoch zu zentralen bindegewebigen Umbauten, da offenbar der Austausch von Stoffwechselprodukten ab einer gewissen Transplantatstärke hier nicht mehr optimal ist (Saim, Cao et al. 2000). In Zukunft werden sich daher durch die Kombination aus zwei oder mehr Biomaterialien möglicherweise die besten Ergebnisse erzielen lassen, indem sich die besonderen Eigenschaften verschiedener Stoffe günstig addieren (Perka, Spitzer et al. 2000).

Eigenschaften der Fibrinmatrix

Fibrin ist als physiologische Substanz uneingeschränkt biokompatibel, problemlos vom Körper abbaubar und erfüllt damit bereits zwei wesentliche Voraussetzungen für eine Verwendung als Matrix im Tissue Engineering. Durch die Variation der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration können die biomechanischen Eigenschaften variiert und entsprechenden Erfordernissen angepasst werden. Nach Initiierung des Polymerisationsprozesses ist das Transplantat noch eine gewisse Zeit flexibel, was eine sehr gute Formbarkeit ermöglicht und sogar eine direkte Injektion in den entsprechenden Defekt erlaubt. Die Geschwindigkeit des Polymerisationsprozesses kann durch die Thrombinkonzentration reguliert werden. So dauert dieser bei Thrombinkonzentrationen über 20 NIH/ml nur wenige Sekunden, kann jedoch bei niedrigen Konzentrationen unter 4 NIH/ml auf Minuten bis zu einer Stunde ausgedehnt werden. Die endgültige Festigkeit wird erst nach vollständiger Ausbildung der Faktor XIII vermittelten Quervernetzungen nach etwa 24h erreicht. Durch die zunächst gelartige Beschaffenheit kann eine sehr gute Durchmischung und hohe Homogenität der Zellen innerhalb des Trägermaterials erreicht werden. Den eingebetteten Zellen ist innerhalb der Fibrinmatrix der Austausch von Stoffwechselprodukten möglich, was die Versorgung mit Nährstoffen, sowie den Abtransport von Abbauprodukten ermöglicht.

Das polymerisierte Fibrin ergibt eine elastische Matrix, die bis zu einem gewissen Grad auch Druck-, Scher- und Biegekräfte aufnehmen kann und welche im Vergleich zu anderen Biomaterialien nicht brüchig und sehr gut zu handhaben ist. Die

biomechanische Grundstabilität hängt von der Fibrinogenkonzentration ab, die bei etwa 40mg/ml ihr Maximum erreicht. Die endgültige Festigkeit kann durch den Anteil an Faktor XIII vermittelten Quervernetzungen noch gesteigert und angepasst werden. Die Grundvoraussetzungen für Formstabilität in einer in-vitro Kultur sind damit gegeben. Der längerfristige Erhalt der Form hängt von der Degradationsgeschwindigkeit, d.h. in diesem Fall von der Fibrinolyse ab, diese kann durch die Zugabe von Antifibrinolytika, wie Aprotinin, Tranhexam- oder ϵ -Aminocaprinsäure sowohl in-vitro als auch in-vivo hinausgezögert werden (Pipan, Glasheen et al. 1992). Als Blutungen stillendes und Wunden verschließendes Agens fördert Fibrin das Einsprossen von Fibroblasten. Diese Eigenschaft hat bei der Verwendung als Matrix im Tissue Engineering einen eher ungünstigen Einfluss da so bindegewebige Einwachsungen, die das Transplantat in der Qualität mindern oder sogar zerstören können, gefördert werden. Durch die Beimengung von Tranhexamsäure kann jedoch auch dieser Einfluss abgeschwächt werden (Meinhart, Fussenegger et al. 1999).

Anwendungsbeispiele der Fibrinmatrix im Tissue Engineering

Wegen der vielen für eine Matrix günstigen Eigenschaften und insbesondere wegen der hervorragenden Biokompatibilität ist Fibrin zu einer der am meisten verwendeten Matrices im Tissue Engineering geworden. So werden im Tissue Engineering von Knorpelgewebe sowohl speziell geformte dreidimensionale Transplantate (Haisch, Klaring et al. 2002) als auch „injizierbarer Knorpel“ mittels der Fibrinmatrix hergestellt (Westreich, Kaufman et al. 2004). Neben dem Einsatz zur Generierung von Knorpelgewebe, wird es im Tissue Engineering von Knochen (Karp, Sarraf et al. 2004; Westreich, Kaufman et al. 2004), Haut (Bannasch, Fohn et al. 2003; Kopp, Jeschke et al. 2004), Gefäßen (Aper, Teebken et al. 2004; Mol, van Lieshout et al. 2005), Muskelgewebe (Beier, Kneser et al. 2004), Leber (Sun, Chan et al. 2004), Nerven (Lee, Yu et al. 2003; Galla, Vedecnik et al. 2004); Fett (Borges, Mueller et al. 2003), Harnblasenschleimhaut (Schoeller, Lille et al. 2001; Moriya, Kakizaki et al. 2003) und Hornhaut (Han, Schwab et al. 2002) eingesetzt.

Die Fibrinmatrix im Tissue Engineering von Knorpelgewebe

In einem ersten Ansatz Fibrin als Matrix zur Regeneration von Knorpeldefekten zu verwenden, wurden zerkleinerte Knorpelstücke in einem Kniegelenksdefekt im Kaninchen eingebracht, nach 40 Wochen Implantation in-vivo, zeigte sich im Gegensatz zu unbehandelten Defekten die Bildung von hyalinem Knorpelgewebe (Albrecht, Roessner et al. 1983), in einem nächsten Schritt wurden aus Knorpelmatrix isolierte Chondrozyten kaninen Ursprungs in Fibrin eingebettet und über einen Zeitraum von sieben Tagen in-vitro kultiviert. Es konnte so gezeigt werden das Chondrozyten in Fibrin proliferieren und beginnen eine Zellmatrix auszubilden. (Homminga, Buma et al. 1993). Um Initial eine höhere biomechnische Festigkeit zu erreichen wurden humane Chondrocyten in Fibrinkleber und eine Gerüststruktur aus Polyglykolid- polylaktid- Copolymervliesen (Ethicon®) eingebettet. Diese Konstrukte wurden mit Transplantaten die in Fibrin allein kultiviert wurden verglichen. Dabei zeigten sich nach einer Kulturzeit von 6 Wochen in-vitro bei der histologischen Auswertung beider verwendeter Materialien in Bezug auf Bildung von Knorpelmatrix vergleichbare Ergebnisse (Haisch, Schultz et al. 1996). In autolog hergestelltem Fibrin synthetisierten equine Chondrozyten bei in-vitro Untersuchungen signifikante mehr Knorpelmatrix als in kommerziellem Fibrin aus gepooltem Plasma (Fortier, Brofman et al. 1998). Auch in einem weiteren Vergleich zeigte sich eine Überlegenheit von autolog hergestelltem Fibrinogen gegenüber handelsüblichen Fibrinkleberpräparaten in Bezug auf Zellmorphologie, Vitalität und Migrationsrate (Gille J 2003). Nach Implantation in Fibrin eingebetteter boviner Chondrocyten in den Rückenbereich von immundefizienten Nacktmäusen, konnten auch nach in-vivo Kultur von 6 und 12 Wochen histologisch Knorpelmatrix, sowie Kollagene nachgewiesen werden, makroskopisch ähnelte dieser Neoknorpel nativem Knorpelgewebe (Sims, Butler et al. 1998). Vergleichbare Ergebnisse konnten in einem folgenden Versuchsansatz mit aus Rippenknorpel isolierten humanen Chondrozyten in Nacktmäusen erzielt werden (Ting, Sims et al. 1998). Mit in Fibrin eingebetteten, porcinen Chondrozyten konnten bei einer Konzentration von 40 Millionen Zellen pro Milliliter nach 6 und 12 wöchiger Implantation in Nacktmäuse bei der histologischen Auswertung, sowie Bestimmung von Glykosaminoglykanen, Kollagen II und Messung des DNA Gehaltes, die besten Ergebnisse erzielt werden. In der Kontrollgruppe in der Chondrozyten allein implantiert wurden bildete sich zwar ebenfalls Knorpelgewebe, jedoch entstanden Proben in deutlich geringerer Größe

(Silverman, Passaretti et al. 1999). Transplantate aus Fibrin und humanem Chondrozyten des Nasenseptums wurden für vier Wochen in-vitro mit und ohne Aprotinin bzw. Tranhexamsäure als Fibrinolyseinhibitoren kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die mit Fibrinolyseinhibitoren kultivierten Transplantate formstabil blieben, während bei Transplantate ohne Inhibitoren zum Teil Auflösungserscheinungen beobachtet wurden (Meinhart, Fussenegger et al. 1999). Nach 12 wöchiger Implantation in Nacktmäuse konnte für aus Chondrozyten, Fibrin und PGLA Vliesen hergestellter Neoknorpel bereits die biomechanische Festigkeit von Nasenseptumknorpel und etwa 30-50% der Festigkeit von Gelenksknorpel erreichen (Duda, Haisch et al. 2000); Transplantate aus Fibrin und porcinen Chondrozyten alleine konnten zwar mit der Länge der Implantationsdauer an Stabilität gewinnen, erreichten zuletzt jedoch nur etwa 30% des Biegsamkeitsmodus von nativem, porcinem Ohr- und Rippenknorpel (Roy, Kohles et al. 2004). Transplantate aus Fibrin und porcinen Chondrozyten wurden für 6 Wochen in Nacktmäuse implantiert, um das Redifferenzierungspotential von Chondrozyten um deren Fähigkeit zu untersuchen auch nach in Monolayerkultur Knorpelmatrix synthetisieren zu können. Hierbei wurde herausgefunden das porcine Chondrozyten lediglich als Primärkultur und nach einer Passage in der Lage sind Knorpelmatrix zu bilden (Passaretti, Silverman et al. 2001). Humane Chondrozyten aus Nasenseptumknorpel wurden mit Fibrin in Teilen einer Ohrmuschel nachempfundenen PGLA-PLLA Vliesen eingebracht. Nach Implantation von 6 und 12 Wochen in Nacktmäuse konnte die Bildung von Knorpelgewebe, sowie die Beibehaltung von Form und Größe nachgewiesen werden (Haisch, Klaring et al. 2002). Für die Herstellung von Compositegrafts wurden sowohl Keratinozyten (Neovius and Kratz 2003) als auch Respirationsepithel (Doolin, Strande et al. 2002) mit Chondrozyten kokultiviert. Das Ziel die Ausbildung einer stabilen Knorpelmatrix durch die Anwendung von Ultraschall (Duda, Kliche et al. 2004) und dynamischer Kompression (Hunter, Imler et al. 2002) zu beschleunigen konnte mit den in diesen Ansätzen gewählten Mitteln nicht erreicht werden. Der Einsatz einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren zur Beschleunigung und Optimierung der Matrixbildung bietet ein bisher kaum zu überschauendes Bild von Wirkungen, die darüber hinaus in-vitro und in-vivo zum Teil gegensätzliche Wirkungen gezeigt haben (Fortier, Lust et al. 1999; Kaps, Hoffmann et al. 2004; Goessler, Bugert et al. 2006). Nach Einbettung von porcinen Chondrozyten aus Ohr-, Rippen- und Gelenksknorpel in eine

Fibrinmatrix, fiel auf, daß Transplantate von Gelenkschondrozyten nach 12 wöchiger Implantation in Nacktmäuse an Größe und Gewicht abgenommen hatten, während die Transplantate aus aurikulären Chondrozyten an Masse zunahmen und die Transplantate aus Rippenknorpel über den beschriebenen Kulturzeitraum stabil blieben. Die biomechanischen Eigenschaften der so gezüchteten Transplantate aus Ohr- und Rippenknorpel, übertrafen in diesem Untersuchungsmodell die aus Gelenksknorpel gefertigten (Xu, Zaporozhan et al. 2004). Resorptive und fibröse Prozesse, die insbesondere bei Kombination der Fibrinmatrix mit PGLA-Vliesen auftraten, konnten zum Teil erfolgreich durch eine Membranverkapselung (Haisch, Groger et al. 2000) und Immunmodulation mit Cortison (Haisch, Wanjura et al. 2004) eingedämmt werden. Durch Untersuchungen in einem in-vitro Defekt Modell konnte nachgewiesen werden, daß die Anwesenheit von nativem Knorpel einen positiven Einfluß auf die Matrixbildung von in Fibrin eingebetteten Chondrozyten besitzt (Hunter and Levenston 2004). Zuletzt konnten Chondrozyten in einer Fibrinmatrix im Gegensatz zu mit anderen Biomaterialien gefertigten Transplantaten (Cao, Rodriguez et al. 1998) auch erfolgreich im immunkompetenten Tiermodell zu Ersatzknorpel heranreifen (Fussenegger, Meinhart et al. 2003; Westreich, Kaufman et al. 2004).

Vor- und Nachteile einer autologen Präparation der Fibrinmatrix im Vergleich zur Herstellung aus Fibrinklebern aus gepooltem Plasma

Funktionsweise von Fibrinklebern

Fibrinkleber machen sich den letzten Schritt der plasmatischen Blutgerinnung zu eigen. Fibrinogen wird hierbei bei Anwesenheit von Calcium-Ionen durch Thrombin zu Fibrinmonomeren gespalten. Die so entstandenen Fibrinmonomere lagern sich zu einem Fibrinpolymer zusammen, welches eine gelartige Substanz bildet. Dieses auch Fibrinclot genannte Gerinnsel erhält durch den aktivierten Faktor XIII noch weitere Quervernetzungen, welche die biomechanische Stabilität erhöhen. Die Konzentration des Fibrinogens bestimmt im Wesentlichen die Festigkeit des Gerinnsels, während die Thrombinkonzentration für die Geschwindigkeit des Polymerisationsprozesses verantwortlich ist.

Die Blutgerinnung

Die Blutgerinnung, die in Form einer Kaskadenreaktion abläuft, kann durch zwei unterschiedliche Auslöser initiiert werden. Man spricht vom extravaskulären oder extrinsischen System, wenn die Blutgerinnung durch Gewebeverletzungen ausgelöst wird. Dabei werden aus den betroffenen Gewebezellen Lipoproteine, die sogenannten Gewebsthromboplastine, freigesetzt. Diese Proteine verbinden sich mit dem Gerinnungsfaktor VII, auch Proconvertin genannt, der so entstandene Komplex aktiviert dann in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen den Faktor X, den Stuart-Prower-Faktor, welcher sich wiederum mit Plättchenfaktor III verbindet, der schließlich Prothrombin zu Thrombin konvertiert.

Die zweite Möglichkeit, die die Blutgerinnungskaskade in Gang setzen kann, findet sich im intravaskulären oder intrinsischen System. Dabei ist der Initialschritt der Kontakt von Faktor XII oder Hagemann-Faktor mit elektronegativen Materialien wie Kollagen oder in-vitro mit Glasoberflächen. Dieser Kontakt aktiviert, unter Beteiligung von Kininogen und Proteasen wie Kalikrein, den Faktor XII. Im Verlauf der Blutgerinnungskaskade kommt es zu weiteren Aktivierungen, die in der Bildung des Enzymkomplexes enden, der Prothrombin zu Thrombin umwandelt. Das intrinsische und das extrinsische System sind durch eine Reihe von Querverbindungen miteinander verknüpft, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Die letzten Schritte der Blutgerinnung, auf der die Wirkungsweise der Fibrinkleber beruht, werden in der folgenden Abbildung verdeutlicht:

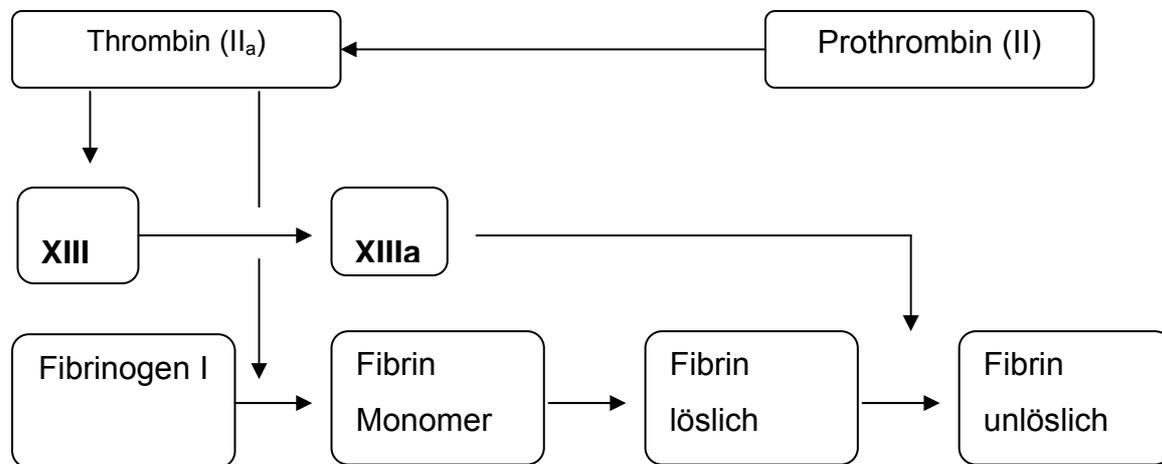


Abb.1 Die Bildung von Fibrin innerhalb der Blutgerinnungskaskade

Durch den Prothrombinaktivator- Enzymkomplex wird Thrombin von dem inaktiven Proenzym Prothrombin proteolytisch abgespalten. Das entstandene Thrombin spaltet aus dem Fibrinogendimer zwei Fibrinopeptide mit der Bezeichnung A & B ab, das Fibrinogen wird in seine Untereinheiten aufgetrennt. Diese entstandenen Fibrinmonomere lagern sich durch elektrostatische Anziehungskräfte parallel zu Polymerern aneinander. Der fibrinstabilisierende Faktor XIIIa, wurde ebenfalls durch Thrombin aktiviert. Dieser Faktor XIIIa katalysiert die Ausbildung kovalenter Bindungen der Fibrinmonomere unter Verwendung von Ca^{2+} -Ionen. Das Fibrin verfestigt sich daraufhin zu einem unlöslichen Komplex (Schmid und Thews, 1976).

Zur Entwicklungsgeschichte von Fibrinklebern

Die Fähigkeit von Fibrin Blutungen stillen zu können wurde erstmals zu Beginn des neunzehnten Jahrhunderts beschrieben (Bergel 1909) einige Jahre später wurde es dann therapeutisch in Pulverform angewendet (Grey 1915; Harvey 1916).

In den vierziger Jahren wurde dann über die Verwendung als chirurgischer Klebstoff berichtet um im Tierexperiment Nervenenden aneinanderzufügen (Young and Medawar 1940) Um Hauttransplantate zu adaptieren wurde erstmals Fibrinogen in Kombination mit Thrombin eingesetzt (EP Conkrite 1944). Diese Klebstoffe hatten

jedoch aufgrund von geringen Fibrinogenkonzentrationen nur eine geringe Klebefestigkeit und erlangten deshalb keine große Verbreitung. Erst Anfang der siebziger Jahre lagen die Voraussetzungen für eine industrielle Aufbereitung mit höheren Fibrinogenkonzentrationen vor. Nach Veröffentlichung grundlegender Untersuchungen zur Verwendung als biologischer Klebstoff folgte eine erste klinische Anwendung (Matras, Dinges et al. 1972). In der Folge traten Fibrinkleber einen wahren Siegeszug durch die Medizin an. Heutzutage ist neben der Anwendung als Blutstillendes Agens die Fibrinklebung in nahezu jedem operativen Fach vertreten (Katzke, Pusalkar et al. 1983; Canonico 2003; Krzizok 2004). Darüber hinaus wird Fibrin als physiologische Matrix für die Freisetzung von Medikamenten eingesetzt und im Tissue Engineering zur Einbettung von Zellen verwendet. In den frühen achtziger Jahren war in Europa der erste kommerzielle Fibrinkleber aus gepooltem Plasma erhältlich, während in den USA seit 1978 wegen der Gefahr der Übertragung von Viruserkrankungen jeglicher Einsatz von Fibrinogen aus gepooltem Plasma durch die FDA untersagt wurde (Bove 1978). Hier waren die Anwender deshalb auf die Präparation von autologem oder von nur einem Spender stammendem Plasma angewiesen. Erst die Einführung von mehrstufigen Virusinaktivierungsverfahren und Nachweisverfahren, wie Nanofiltration, Pasteurisation und PCR-Testung sowie groß angelegte klinische Studien, welche den Nachweis von Wirksamkeit und Anwendungssicherheit erbrachten, erlauben in den USA seit 1998 die Anwendung von Fibrinklebern für die Blutstillung in der kardiopulmonalen Bypassoperationen, zur Behandlung von Milzverletzungen und zur Verklebung von Anastomosen bei temporären Colostomien (Mintz, Mayers et al. 2001).

Nebenwirkungen von Fibrinklebern aus gepooltem Plasma

Die Virusinaktivierungsverfahren zerstören zwar die meisten umhüllten und nicht umhüllten Viren wie Hepatitis B, Hepatitis C und HIV. Jedoch gibt es auch Viren wie den Parvovirus B19, der vor allem immunsupprimierte Patienten und schwangere Frauen befällt, der selbst diese mehrstufigen Virusinaktivierungsverfahren übersteht und für den die Übertragung durch Fibrinkleber bereits dokumentiert ist (Hino, Yamamura et al. 1999; Hino, Ishiko et al. 2000; Kawamura, Sawafuji et al. 2002; Tournoux, Karila-Cohen et al. 2004). Eine Möglichkeit den humanen B-19 Parvovirus zu inaktivieren stellt die Sterilisation mit Gammastrahlen dar, dies bewirkt jedoch auch eine Konformationsänderung des Fibrinogens und führt zu Einbußen in der Funktionsweise. Ende der achtziger Jahre wurde in den kommerziellen

Fibrinkleberpräparaten, bovines Thrombin durch humanes Thrombin ersetzt, da es gelegentlich nach wiederholter Anwendung von bovinem Thrombin zu schweren immunologischen Nebenwirkungen gekommen war. Zur Hemmung der Fibrinolyse ist Aprotinin als weiterer boviner Bestandteil in den meisten kommerziellen Fibrinklebern noch immer enthalten, obwohl auch hier über immunologische Reaktionen berichtet wurde (Orsel, Guillaume et al. 1997; Scheule, Beierlein et al. 1998; Scheule, Beierlein et al. 1998; Schlag and Seifert 1998; Scheule, Beierlein et al. 1999; Beierlein, Scheule et al. 2000; Beierlein, Scheule et al. 2000; Oswald, Joly et al. 2003) und die Notwendigkeit von Fibrinolyseinhibitoren in Fibrinklebern durchaus kontrovers diskutiert wird (Kheirabadi, Pearson et al. 2002; Krishnan, Vijayan Lal et al. 2003). Als Alternative zu bovinem Aprotinin wird auch Tranexamsäure, oder Epsilon-Aminocaprinsäure verwendet, Tranexamsäure kann jedoch bei Anwendungen im Kontakt zum ZNS zu schwerwiegenden Krampfanfällen führen (Furtmuller, Schlag et al. 2002; Schlag, Hopf et al. 2002). Während Tranexamsäure bereits die Plasminogenaktivierung hemmt, wirkt Aprotinin als Inhibitor von Plasmin (Pipan, Glasheen et al. 1992). Möglicherweise werden in Zukunft die Gefahren die mit der Verwendung von Produkten aus gepooltem Plasma zusammenhängen durch die Gewinnung von rekombinanten Gerinnungsfaktoren keine Rolle mehr spielen (Butler, van Cott et al. 1997).

Präparation autologer Fibrinkleber

Trotz der mittlerweile relativ hohen Anwendersicherheit von Fibrinklebern aus gepooltem Plasma haben die nicht auszuschließende Möglichkeit Viren zu übertragen aber auch Kostenüberlegungen zur Entwicklung von autologen Klebersystemen geführt. Insbesondere in den USA, nachdem Produkte mit Fibrinogen aus gepooltem Plasma, wegen der Gefahr der Übertragung von Viruserkrankungen 1978 (Bove 1978) generell vom Markt genommen wurden. Aber obwohl diese Produkte 1998 durch die FDA erneut zugelassen wurden, werden noch immer Eigenpräparationen in erheblichem Umfang durchgeführt. In der Literatur wird eine Vielzahl von Präparationstechniken beschrieben. Diese reichen von der Verwendung von Vollplasma (Dresdale, Rose et al. 1985), über plättchenarmes fresh frozen plasma bis zu intraoperativ gewonnenem Plasma durch Cell Saver (Oz, Jeevanandam et al. 1992). Neben der unterschiedlichen der Gewinnung des Ausgangsmaterials werden verschiedene Methoden verwendet um daraus dann

Fibrinogenkonzentrate herzustellen (Gammon, Avery et al. 1998). Erfolgreiche Methoden sind die Präzipitation mittels Ammoniumsulfat (Siedentop, Harris et al. 1986; Durham, Willatt et al. 1987); Ethanol (Kjaergard, Weis-Fogh et al. 1992), Polyethylenglykol (Epstein, Weisman et al. 1986; Weisman, Torsiglieri et al. 1987) und verschiedene Techniken der Kryopräzipitation (Casali, Rodeghiero et al. 1992). Es herrscht keine Einigkeit darüber mit welcher Methode die höchste Fibrinogenkonzentration zu erreichen ist. Einige Studien belegen die Überlegenheit der Präzipitation durch Ammoniumsulfat (Siedentop, Harris et al. 1986; Silver, Wang et al. 1995); andere konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Laitakari and Luotonen 1989; Park, Siedentop et al. 1997). Die Unterschiede der erreichten Fibrinogenkonzentrationen überraschen nicht, wenn man die unterschiedliche Fibrinogenkonzentration im Spenderplasma, unterschiedliche Mengen und Konzentrationen der Präzipitationsagentien und unterschiedliche Methoden der späteren Festigkeitsmessung bedenkt. Unabhängig von der verwendeten Methode hängt die Höhe der erreichten Fibrinogenkonzentrate von der Fibrinogenkonzentration im verwendeten Plasma ab (Park and Cha 1993). Die Fibrinogenkonzentrationen erreichen in den einzelnen Untersuchungen Werte zwischen 13 und 78 mg/ml (Dahlstrom, Weis-Fogh et al. 1992; Park and Cha 1993; Kjaergard, Axelsen et al. 1995). Auch wenn die Präparation mit exogenen Agenzien die Herstellungszeit verringert, sind die Einflüsse und Risiken der verwendeten Präzipitationsmittel nicht vollständig geklärt. Zum Beispiel kann die Ethanolmethode zu einer erhöhten Alkoholkonzentration im Konzentrat führen und eine vorzeitige Gerinnung verursachen oder zu einer reduzierten Faktor XIII Aktivität führen (Sierra 1993). Die gebräuchlichste Methode ist daher immer noch die Präparation mittels Kryopräzipitation aus Gefrierfrischplasma (Dresdale, Rose et al. 1985). Patienten kann durch Plasmapherese sehr schonend bis zu 600ml Plasma entnommen werden. Da die Erythrozyten noch in der gleichen Sitzung zurücktransfundiert werden, ist das Verfahren sehr gut verträglich.

Vorteile der autologen Fibrinogenpräparation

Ist das Fibrinogen durch Kryopräzipitation hergestellt worden, erhält der Patient mit der Fibrinogenkomponente ausschließlich autologes Material. Immunologische Reaktionen sowie die Übertragung von Viruserkrankungen können so sicher ausgeschlossen werden. Werden größere Mengen an Fibrinogen benötigt können

sie durch die autologe Präparation darüber hinaus auch kostengünstiger hergestellt werden als kommerzieller Fibrinkleber (Mintz, Mayers et al. 2001), insbesondere wenn bei dem Patienten neben dem Fibrinogen auch anderer Plasmapbestandteile, wie Erythrozytenkonzentrate oder fresh frozen plasma benötigt werden.

Das Tissue Engineering betreffend fördern autologe Fibringlele im Vergleich zu Produkten aus gepooltem Plasma offenbar auch in einem stärkeren Maße die Differenzierung von Chondrozyten (Fortier, Brofman et al. 1998; Gille J 2003). Autolog hergestelltes Fibrinogen enthält vermutlich autologe Wachstumsfaktoren, wie z. B. TGF- β . Da der Patient nur körpereigenes Material erhält und somit keine Virusinaktivierungsverfahren angewendet werden müssen, bleiben diese Faktoren wahrscheinlich besser erhalten. Außerdem ermöglicht dieses Verfahren für die Forschung und Tiermedizin artspezifische autologe Plasmakomponenten und Fibringlele wie z.B. Pferde oder Schweine oder Hunde herzustellen.

Nachteile der autologen Fibrinogenpräparation

Da die Fibrinogenkonzentration der autologen Fibrinkleber immer von der Fibrinogenkonzentration des Spenderplasmas abhängt ist sie nur schwer im Voraus zu berechnen und liegt in der Regel unter der von kommerziellen Produkten. Die von der Fibrinogenkonzentration abhängige Klebefestigkeit ist jedoch nur bei bestimmten Anwendungen von entscheidender Bedeutung und kann im Tissue Engineering wie auch bei der Anwendung als Hämosstatikum vernachlässigt werden. Insgesamt sind die Verfahren zur Herstellung der autologen Fibrinkleber jedoch zeit- und arbeitsaufwändig und setzen geschultes Personal voraus. Das autologe Fibrinogen wird vom Körper problemlos toleriert. Da jedoch in der Vergangenheit kein Verfahren zur Präparationen von autologem Thrombin zur Verfügung stand, wurde für die Polymerisation in der Regel bovines Thrombin verwendet. Bei der Verwendung von bovinem Thrombin kam es vereinzelt zu schweren und schwersten immunologischen Nebenwirkungen, die in einigen Fällen sogar zum Tode führten (Berguer, Staerkel et al. 1991; Berruyer, Amiral et al. 1993; Muntean, Zenz et al. 1997).

Komplikationen nach Anwendung von bovinem Thrombin

Bereits frühzeitig konnten durch klinische Beobachtungen eindeutige Zusammenhänge zwischen allergischer Sensibilisierung und der Anwendung von bovinem Thrombin aufgezeigt werden (Enzmann 1982). Insgesamt entwickeln wahrscheinlich etwa 10% der Patienten Antikörper nach Anwendung von Präparaten aus bovinem Thrombin, auch wenn es bei nur einem relativ geringen Prozentsatz auch zu klinischen Komplikationen kommt. Die Wahrscheinlichkeit der Antikörperbildung erhöht sich jedoch bei wiederholter Anwendung um das achtfache im Vergleich zu Patienten die erstmalig behandelt werden (Dorion, Hamati et al. 1998). Parallel zur zunehmenden Anwendung von Fibrinklebern die bovines Thrombin enthalten hat sich daher auch Inzidenz der Bildung von Antikörpern drastisch erhöht (Banninger, Hardegger et al. 1993; Muntean, Zenz et al. 1997). Die Thrombinpräparate der meisten Anbieter enthalten auch bovinen Faktor V, Antikörper gegen verschiedene Epitope von Faktor V oder Thrombin konnten mittels ELISA ausfindig gemacht werden. In vivo können Antikörper gegen den Faktor V mit human Faktor V kreuzreagieren und einen Immunkomplex bilden der aus dem Kreislauf entfernt wird. Der Resultierende Mangel an Faktor V kann von ausreichender Stärke sein um eine Blutungsdiathese hervorzurufen (Zehnder and Leung 1990; Berruyer, Amiral et al. 1993; Spero 1993; Israels and Israels 1994; Israels and Leaker 1997; Muntean, Zenz et al. 1997). Antikörper die mit humanem Thrombin kreuzreagieren können auch eine Thrombose fördern indem sie die Inhibition von Thrombin durch Antithrombin III behindern (Lawson, Pennell et al. 1990; Ortel, Mercer et al. 2001). Innerhalb einer dreijährigen retrospektiven Studie konnten an einer einzigen Institution 16 Patienten mit Antikörpern gegen bovines Thrombin und/oder Faktor V identifiziert werden. In den meisten Fällen konnten Antikörper innerhalb von 1-2 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff entdeckt werden, in anderen Fällen dauerte es zwischen 13-52 Wochen (Banninger, Hardegger et al. 1993). Hier zeigte die durch Antikörper induzierte Koagulopathie in 6 Fällen Krankheitssymptome und führte in drei Fällen zum Tode, davon starben zwei Patienten an Blutungen und einer an disseminierter intravaskulärer Gerinnung. Offenbar spielen sowohl die Dosis als auch die Häufigkeit der Anwendung von bovinem Thrombin bei der Bildung von Antikörperen eine Rolle. Wobei eine unzureichende Dokumentation der Anwendung von bovinem Thrombin eine Rückverfolgung oft erschwert (Alving, Weinstein et al. 1995). Berichtet wurde auch über schwerwiegendem Blutdruckabfall nach lokaler

Anwendung von bovinem Thrombin mit einem Absacken des Blutdruckes etwa 20-30 Sekunden nach Applikation des Fibrinklebers in parenchymatose Organe bei Traumapatienten (Berguer, Staerkel et al. 1991). Wegen der hier genannten Nebenwirkungen wurde die bovinen Thrombin in den kommerziell erhältlichen Fibrinkleberpräparaten bereits vor Jahren durch humanes Thrombin ersetzt. In Deutschland wurden diese gänzlich vom Markt genommen. Anders in den USA, dort wird bovinen Thrombin weiterhin allein oder zusammen mit autologem Fibrinogen klinisch eingesetzt.