

Material und Methoden

Material

Blutprodukte

- Die Plasmen zur Entwicklung der Präparationstechniken wurden durch das Institut für Transfusionsmedizin der Charité aus Eigenblutspenden mit kurzfristig abgelaufenem Verfallsdatum bereitgestellt.
- Autologes Plasma für die klinische Anwendung zur Rekonstruktion humanen aurikulären Knorpels eines Patienten wurde durch die Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg hergestellt.

Chondrozyten

- Rippenknorpel zur Gewinnung humaner Chondrozyten wurde durch die Klinik für Plastisch-Rekonstruktive Chirurgie der Universität Freiburg entnommen.

Chemikalien und Reagenzien

- RPMI-1640 Medium (Biochrom KG, Berlin)
- Hanks Medium (Biochrom KG, Berlin)
- Kollagenase Type CLS II (Biochrom KG, Berlin)
- FCS der Charge 228 U (Biochrom KG, Berlin)
- EDTA- Trypsin (Biochrom KG, Berlin)
- PBS (Biochrom KG, Berlin)
- Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG, Berlin)
- Antikoagulanzen CPD – 50 (Haemonetics SA, Nyon, Switzerland)
- DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia Biotech AB, Freiburg)
- Kollagenase P (Boehringer Mannheim)
- Hyaluronidase Typ II (Sigma-Aldrich GmbH Steinheim)

- Trypanblau (Sigma- Aldrich, GmbH Steinheim)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck Kg Darmstadt)
- Natriumchlorid (Merck Kg Darmstadt)
- Kalziumchlorid (Merck Kg Darmstadt)
- Calciumchlorid (Merck Kg Darmstadt)
- Aprotinin (Antagosan) (Hoechst Marion Roussel)
- Innovin (Dade Behring)
- Glucose
- Glycin
- Aqua Bidest

Geräte

- Plasmapheresemaschine MCS 3p (Haemonetics)
- Zentrifuge Gs – 6R, Rotor 6H 38, Beckmann Frankfurt
- Kühlschrank
- Tiefkühlschrank (-20C)
- Tiefkühlschrank (-70C)
- Shell Freezer
- Wärmekammer, Heraeus, Osterode
- CO2-Begasungsbrutschrank, Heraeus, Osterode
- Laminar-Flow-Bank, antair BSK
- Mikroskop, Leica Typ DMIL
- Magnetrührer, Variomac H+P Labortechniksystem München

Verbrauchsmaterialien

- Chromatographiesäulen, Econo- column (Bio-Rad, Richmond C:A USA)
- Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden)
- Petrischalen (Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden)
- Zentrifugengefäße (Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden)
- Cell-Streamer (Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden)
- Well-Platten (Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden)
- 0,2 µm Spritzvorsatzfilter Schleicher und Schüll

- Skalpelle, Bard Parker, Becton Dickson
- Spinnerflaschen, Wheaton, USA
- Nylonnetz(250µm), Reichelt Chemietechnik, Heidelberg
- Hämozytometer, Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg
- Falcon Röhrchen(50ml), Falcon, Heidelberg
- Serologische Pipetten, Falcon, Heidelberg
- 24 well Platte, Falcon, Heidelberg
- Petrischalen, Cellstar, Greiner Labortechnik, Nürtingen
- Nahtmaterial, Seralon, Ethicon, Hamburg
- Pipettierhilfe, Accu-jet, Brand, Wertheim
- Gewebekulturflaschen, Nunc, Brand Products
- Einmal-Spritzen, Braun Melsungen
- Einmal-Kanülen, Braun Melsungen
- Einmal-Spritzenvorsatzfilter, Schleicher und Schuell
- Sterile Spitzen, Eppendorf
- Handschuhe, Mikrotouch, Johnson & Johnson, USA

Methoden

Gewinnung autologer Plasmabestandteile

Maschinelle Plasmagewinnung

Die maschinelle Gewinnung von Plasma erfolgt durch Verbindung des liegenden Spenders an eine Blutspendemaschine. Nach Punktion einer Vene leitet diese Maschine durch Venenstauung und Saugwirkung natives Vollblut des Spenders in ein Schlauch- und Beutelsystem. Zunächst wird das Blut durch Beimengung eines Antikoagulanz (z.B. Citrat oder EDTA) ungerinnbar gemacht, dann werden durch automatisierte Zentrifugationsschritte in einer rotierenden Glocke die zellulären von den azellulären Bestandteilen getrennt. Wahlweise können die zellulären Bestandteile noch in der gleichen Sitzung retransfundiert oder in Beutel geleitet werden und für Operationen als Eigenblutspenden zur Verfügung stehen. Das Plasma wird im Anschluss bei -70°C schockgefrostet und kann dann bei -20°C bis zu sechs Monate gelagert werden.

Manuelle Plasmagewinnung

Die manuelle Gewinnung von Plasma wird durch Venenpunktion und Aufziehen in Antikoagulans enthaltende Spritzen bzw. Monovetten durchgeführt. Es folgt die Trennung der zellulären von den azellulären Bestandteilen durch Zentrifugation oder Sedimentation. Das Plasma wird dekantiert, die zellulären Bestandteile verworfen.

Präparation der Fibrinkleber

Präparation der Fibrinogenkomponente

Für die Präparation der Fibrinogenkomponente stehen eine ganze Reihe von Präzipitationsmethoden zur Verfügung. Präzipitationsverfahren nutzen die Löslichkeitsunterschiede, die bei definierten Bedingungen zwischen einzelnen Proteinen in einem Gemisch bestehen. Die Löslichkeit ist vor allem eine Funktion aus dem Verhältnis der hydrophilen und hydrophoben Gruppen im Proteinmolekül. Die in der Literatur am häufigsten berichteten Präzipitationsmethoden zur Isolierung

autologen Fibrinogens sind die Fällung durch Kryopräzipitation, Ethanol und Ammoniumsulfat. Möglich ist außerdem die Fällung durch Polyethylenglykol oder eine Isolation durch chromatographische Verfahren. Die Kryopräzipitationsmethode wurde hier ausgewählt da bei dieser dem Plasma keine Additiva hinzugefügt werden müssen und sie im Vergleich relativ unkompliziert zu handhaben ist. Bei den anderen Methoden muß das Fibrinogen im Anschluß wieder von den Additiva gereinigt werden und es besteht zusätzlich die Gefahr, daß Additiva oder deren Abbauprodukte eine Denaturierung von Proteinen bewirken oder unerwünschte Wirkungen auf Zellen und Transplantat zur Folge haben könnten.

Kryopräzipitation

Fibrinogen wird bei dieser Methode durch Erwärmen und anschließende Zentrifugation aus tiefgefrorenem Plasma gewonnen. Nach langsamem Auftauen im Kühlschrank bei 4°C über 12 Stunden fällt Fibrinogen als weißer flockiger Niederschlag aus. Dieser Niederschlag wird dann in der Kühlzentrifuge bei 1600g in 10 min bei 4°C vom Plasma getrennt. Der Plasmaüberstand wird dekantiert, bzw mit der Pipette vom Präzipitat abgenommen.

Das Präzipitat wird erneut im Wasserbad erwärmt und durch mehrmaliges aufziehen und ablassen in einer Spritze mit längerer Kanüle homogenisiert, um dann vollständig in die Spritze als Applikationseinheit aufgenommen zu werden. Diese leicht visköse Komponente stellt die erste, fibrinogenreiche Komponente des Klebers dar. Die Fraktion kann erneut eingefroren und so über mehrere Monate gelagert werden.

Präparation der Thrombinkomponente

Isolation des Prothrombinkomplexes (PBSB)

Die Anreicherung des Prothrombins, der Vorstufe des Thrombins erfolgt durch eine modifizierte Methode (Heystek, Maier-van der Zande et al. 1975) mittels Ionenaustauschchromatographie. Der Plasmaüberstand aus der Fibrinogengewinnung wird über 45 min mit Sephadex A 50 bei Zimmertemperatur inkubiert. In dieser Zeit binden die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X aufgrund ihrer

negativ geladenen Gammacarboxylgruppen an den Ionenaustauscher. Im nächsten Schritt wird das Restplasma durch Filtration oder Dekantieren vom mit Gerinnungsfaktoren geladenen Sephadex A-50 getrennt. Dann erfolgt die Reinigung des Sephadex A-50 durch einen 0,2 molaren Waschpuffer und anschließend die Ablösung der des sogenannten Prothrombinkomplexes (PBSB) durch einen 2,0 molaren Elutionspuffer. Nach Trennen des Elutionspuffers vom Ionenaustauscher erhält man ein PBSB Konzentrat in der Menge des eingesetzten Elutionspuffer welches Prothrombin in einer vielfachen Konzentration von nativem Plasma enthält.

Entsalzung des Prothrombinkonzentrates

Entsalzung durch Gelchromatographie

Der Salzgehalt des Eluates aus Elutionspuffer und den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X wurde durch Bindung des Salzes mittels Gelchromatographie verringert. Das Eluat durchlief hierfür unter sterilen Bedingungen eine mit Sephadex G-25 gepackte Säule und wurde anschließend in einem Falcon Tube gesammelt.

Aktivierung des Prothrombinkomplexes

Addition von Ca^{++} als Cofaktor der Gerinnung

Ein obligater Cofaktor der Gerinnung ist Calcium, durch vollständige Bindung des Calciums durch ein Antikoagulanzen wie Citrat oder EDTA wird die Ungerinnbarkeit des Plasmas erreicht. Dieser muß daher zur Reaktivierung wieder in ausreichender Menge hinzugefügt werden.

Aktivierung an negativ geladenen Obeflächen

Glas besitzt negativ geladene Oberflächen an denen der Initialschritt der intravaskulären Gerinnung des intrinsischen Systems eingeleitet werden kann. Dieser Kontakt aktiviert die Blutgerinnungskaskade die hier zu einer Spaltung von Prothrombin zu Thrombin führt.

Aktivierung durch rekombinantes Thromboplastin

Eine wirksame und schnelle Methode der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin stellt die Addition von rekombinantem Thromboplastin (Innovin®) dar. Dem gewonnenen und entsalzten Prothrombinkomplexkonzentrat werden mit einer Eppendorff Pipette 1 ul Innovin pro ml Konzentrat hinzugefügt.

Konservierung der Thrombinkomponente

Durch die Zugabe von Stabilisatoren kann die relativ empfindliche Thrombinkomponente haltbar gemacht werden. In Lösung verliert Thrombin bei Zimmertemperatur sehr schnell an Aktivität. Bei einer Halbwertszeit von 41-72h zerfällt Thrombin vergleichsweise schnell in seine inaktiven Bestandteile. Als Stabilisatoren bieten sich Glucose, Glycin, Asparginat und einige weitere Enzyme an, wie sie in der Patentschrift von (Tanaka, Miyano et al. 1990) in verschiedenen Konzentrationsreihen beschrieben werden.

Analyse des Fibrinogens, Prothrombins und Thrombins

Bestimmung der Fibrinogenkonzentration

Der Fibrinogengehalt wurde über die Änderung der Viskosität der Probe und einer Kalibrierungskurve ermittelt, wobei die Probe mit einer Standardthrombinlösung in einer Konzentration von $70 \text{ NIH} \cdot \text{ml}^{-1}$ zur Koagulation gebracht wurde.

Bestimmung des Prothrombingehaltes

Der Prothrombingehalt wurde über die Prothrombinzeit gemessen. Dabei wurde entsprechendes Mangelplasma mit der Probe versetzt, Innovin, eine Thrombokinase im Überschuß zugegeben und der Verlauf der Gerinnung über die Änderung der Viskosität des Plasmas ermittelt. Eine Normkurve, die mit verdünntem Plasma und dem verwendeten Thromboplastin, hier Innovin, von Gesunden gemessen wurde, diente zur Umrechnung der gemessenen Zeit in Prozent der normalen Gerinnungsaktivität. Die Prothrombinzeit mit Innovin und Normalplasma beträgt 22 Sekunden.

Bestimmung der Thrombinaktivität

Zur Bestimmung von Thrombin wurde 50 µl der Probe mit 25 µl des chromogenen Substrats und 75 µl des TRIS-TX Puffers (50 mmol * L⁻¹ Tris-HCL, 0,1 % Triton X) versetzt. Nach Ablauf von 0, 15, 30 und 60 Minuten wurde die Absorption bei 405 nm gemessen und die Konzentration über eine Eichkurve, die mit derselben Methode und Standard Thrombin aufgenommen wurde, ermittelt. Die Konzentration wird in NIH * ml⁻¹ angegeben, wobei eine Einheit als diejenige Aktivität definiert ist, die in 0,0853 mg des ersten internationalen Standards von humanem Thrombin enthalten ist.

Zellkulturtechnik, Herstellung und Kultur von Transplantaten

Medium für die Isolation von Chondrozyten (Enzymlösung)

30ml RPMI-Medium + 10% Rabbit Serum + P/S

1mg/ml Collagenase P

0,1mg/ml Hyaluronidase

0,1mg/ml Collagenase II

Medium für die Proliferation von Chondrozyten

RPMI-Medium 1640 (1x) mit

10% (50 ml) Humanserum

5ml Penicillin/Streptomycin

Nystatin (Spatelspitze)

Medium zur Kultur von Tranplantaten

Ham`s F12-Medium mit

5% (25 ml) Humanserum

Prolin 70mg/l

Glutamin 10 ml/500ml (steril filtriert)

5 ml Penicillin/Streptomycin auf 500 ml

5 ml Hepes/500 ml

5 ml Ascorbinsäure

Isolation von Chondrozyten aus der Knorpelmatrix

Der native Knorpel wird erst für 30 Sekunden mit Ethanol, dann mit steriler Hank's Lösung gewaschen. Danach erfolgt in der Petrischale mit dem Skalpell die Zerteilung des Knorpels in der etwa 1 mm³ Stücke. Der so zerkleinerte Knorpel wird in eine Spinnerflasche mit Isolationsmedium gegeben und im Brutschrank auf dem Magnetrührer bei niedriger Umdrehung für 16 h verdaut. Anschließend wird das Medium mit den isolierten Zellen in einer Pipette aufgenommen und über einen Cell Strainer, der nicht verdaute Matrixanteile zurückhält in ein Falconröhrchen gegeben. Dann folgt die Zentrifugation und das Abnehmen des Isolationsmediums. Nach der Auszählung der vitalen Zellen, werden diese in Proliferationsmedium aufgenommen und auf Kulturflaschen verteilt.

Proliferation der Chondrozyten

Jeweils eine Anzahl von 5 Mio. Zellen wurde mit 25ml RPMI-Medium suspendiert und in Kulturflaschen (175ml Nunc) ausgesät. Die Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Gasaustausch mit der Umgebung wurde durch 1/2 Drehung des Deckels der Flasche ermöglicht. Alle 2 Tage wurden 3/4 des Mediums gewechselt, um so einerseits der Übersäuerung des Mediums vorzubeugen und andererseits einige der von den Chondrozyten produzierten Wachstumsfaktoren und Botenstoffe in der Kulturflasche zu belassen.

Passagieren und Ernten kultivierter Chondrozyten

Das Medium in der Kulturflasche wurde mit einer Pipette abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS gespült. Trypsin/EDTA- Lösung wurde zur Lösung des Zellverbandes in die Kulturflasche gegeben. Diese blieb 5 min im Brutschrank. Unter dem Mikroskop konnte jetzt die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche beobachtet werden. Sollten sich nicht alle Zellen vom Boden gelöst haben, wurde dies durch leichtes Klopfen erreicht. Die Trypsinierung wurde nun sofort mit einer entsprechenden Menge RPMIMedium 10% Rabbit Serum + P/S gestoppt und der Inhalt der Flasche mittels einer Pipette homogenisiert und in ein Röhrchen zur Zentrifugation überführt. Diese erfolgt bei 1800 U/min und 25-30°C. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert und das Pellet in 5 ml RPMIMedium

resuspendiert, um die Zellzahl zu bestimmen. Die Zellen wurden entsprechend auf neue Kulturflaschen verteilt. Sie wurden 2 x passagiert, bis sie in eine Vlieskultur eingebracht wurden. Pro Kulturflasche erhielt man bis zu 10×10^6 Zellen.

Zählen der Chondrozyten

20µl der Chondrozyten-RPMI-Suspension wurden in einem Eppendorf-Gefäß mit 20µl Trypanblau verdünnt und gefärbt. Die Anzahl der Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel entwickelt: Anzahl der in 16 Feldern vorhandenen Zellen x multipliziert mit der Verdünnung durch das RPMI-Medium (Faktor 10), der Verdünnung durch das Trypanblau (Faktor 2) und der durch die technischen Vorgaben der Neubauer-Zählkammer bedingten Konstanten.

$$\text{ermittelte Zellzahl} = A \times 2 \times V \times 10^4$$

A = Mittelwert der Zellzahlen in den großen mittleren Quadraten
2 = Verdünnungsfaktor Trypanblau-Zellsuspension
V = Volumen der Zellsuspension
 $\times 10^4$ = Neubauer-Faktor

Präparation geformter Transplantate aus Chondrozyten und Fibrin

Die Zellsuspension wird in einem Falconröhrchen in einem Verhältnis von 25 Mio Zellen pro Milliliter Fibrinogen aufgenommen und mit einer Eppendorfpipette ohne Entstehung von Blasen homogenisiert. Anschließend wird die Fibrinogen-Zellsuspension erneut in der Fibrinogenspritze aufgenommen und diese wieder in die Applikationseinheit mit der Doppelspritze eingesetzt.

Nach Aufstecken einer stumpfen Kanüle auf die Applikationseinheit wird diese an den Zuführkanal der Silikonform angesetzt und die Suspension langsam ohne Entstehung von Blasen in die Form gedrückt. Die Fibrinogen-Zellsuspension wird während des Einbringens der Suspension in der Spitze der Applikationseinheit mit der Thrombinkomponente durchmischt. Die befüllte Silikonform wird dann für 25 min zur Auspolymerisierung des Fibrins in den Brutschrank gelegt. Anschließend wird

das Transplantat aus der Form geholt, es besitzt nun eine ausreichende Festigkeit für die in-vitro Kultur.

In vitro Kultivierung von Transplantaten

Die Transplantate werden zur Matrixbildung im Brutschrank in-vitro kultiviert. Die Dauer der in-vitro Kultivierung wird durch den jeweiligen Versuchsansatz bestimmt. Während dieser Zeit wird eigene Zellmatrix synthetisiert und temporäre Matrix (in diesem Fall Fibrin) resorbiert.

Manueller Austausch des Mediums

Die in-vitro Kultur kann je nach Größe in einer Petrischale oder Wellplatte in der die Transplantate vollständig mit Medium benetzt werden durchgeführt werden. Der Mediumwechsel erfolgt nach Verbrauch, zu Erkennen am Farbumschlag des Indikators. Zu Beginn befinden sich die Zellen noch in der Proliferationsphase und verbrauchen deshalb mehr Medium, so daß ein mehrmaliges Wechseln am Tag notwendig sein kann. Durch die dreidimensionale Anordnung und Ummantelung mit der temporären Matrix (Fibrin, Fibrin/Vlies) ändern die Zellen ihren Stoffwechsel und der Mediumverbrauch verringert sich. Nach 3-4 Tagen genügt ein einmal täglicher Wechsel des Mediums und nach 7-8 Tagen ein Wechsel alle zwei Tage. Das Medium kann auch jeweils nur zu einem Teil ausgetauscht werden um die Konzentration von möglicherweise synthetisierten Botenstoffen und Wachstumsfaktoren auf einem gewissen Niveau zu halten.

Kontinuierlich maschineller Austausch des Mediums

Eine weitere Möglichkeit stellt die Kultivierung der Transplantate in einer Kulturkammer dar. In der Kulturkammer werden die Zellen ebenfalls vollständig mit Medium benetzt. Der Austausch des Mediums erfolgt jedoch durch einen kontinuierlichen Mediumstrom, der die Transplantate mit frischen Nährstoffen versorgt und Produkte aus der Metabolisation abtransportiert. Die Durchflußgeschwindigkeit und Durchflusdauer kann eingestellt und an die Größe und den Mediumverbrauch des Transplantates angepasst werden (Sittinger, Schultz et al. 1997).