

Ergebnisse

Entwicklung der Präparationstechniken

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung eines autologen Fibrinklebers aus autologem Fibrinogen und autologem Thrombin, als Komponenten einer rein autologen Fibrinmatrix für das Tissue Engineering. Da sowohl für die Präparation des autologen Fibrinklebers als auch für die Zellkultur meist größere Mengen an Plasma, bzw. Serum benötigt werden, wurde für die Art der Blut- bzw. Plasmagewinnung die maschinelle Plasmapherese gewählt. Bei minimaler Komplikationsrate sind so auch mehrfache Plasmaspenden innerhalb weniger Wochen möglich. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung lassen sich durch diese Methode auch die Parameter Sterilität, Pyrogen- und Endotoxinfreiheit am sichersten einhalten. Bei der Entwicklung des Verfahrens zur Isolation der Fibrinogen- und Thrombinkomponente war deshalb im Hinblick auf eine klinische Anwendbarkeit zunächst versucht worden innerhalb eines geschlossenen Systems weiterzuarbeiten.

Beobachtungen zur Isolation der Fibrinogenkomponente

Aus der Vielzahl bekannter Methoden zur Herstellung eines Fibrinogenkonzentrates aus Blutplasma wurde die Kryopräzipitation ausgewählt. Neben der Fällungstechnik üben jedoch auch die Handhabung und der Ablauf der Arbeitsschritte zur Trennung des Präzipitates vom Plasmaüberstand Einfluss auf die Reinheit der beiden Komponenten aus. Die Beobachtungen aus den Vorgehensweisen der Verfahrensentwicklung sollen im Folgenden beschrieben werden.

Geschlossenes System – Trennung im Plasmabeutel

Bei der Trennung des Fibrinogens vom Plasmaüberstand im Plasmabeutel, wurde der Beutel mit frisch gefrorenem Plasma über 12 h bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut. Das präzipitierte Fibrinogen haftete zum größten Teil in Form eines Konglomerates von miteinander verbundenen Schlieren der Beutelwand an, der andere Teil

schwamm als flockiger Niederschlag im Beutel. Zur Trennung der beiden Phasen wurde ein zweiter Beutel an dem Schlauchende des Plasmabeutels steril angeschweißt und dann beutelnah mit Klemmen verschlossen. Zentrifugiert wurde in einer großen Kühlzentrifuge in deren Rotoreinsätzen beide Beutel Platz fanden mit 3600 U / min (~ 2800 g) bei 4°C. Die Plasmabeutel sollten nach Möglichkeit aufrecht eingelagert werden, damit sich am Boden das Präzipitat sammeln kann. Durch die Zentrifugalkraft wurde das Präzipitat zum Boden des Plasmabeutels gedrängt. Die Wand des elastischen Plasmabeutels gab jedoch auch dem Druck nach und schlug Falten in denen sich ebenfalls Präzipitat sammelte. Nach der Zentrifugation muß der Plasmaüberstand in einen zweiten Beutel überführt werden. Dies kann entweder manuell mit einer Federpresse oder maschinell durchgeführt werden. Beim Einlegen in die Federpresse wurden die Beutel geglättet und es kam vor, dass ein Teil des Fibrinogens sich vom Zentrifugat ablöste. Diese abgelösten Teile wurden dann zusammen mit dem Plasmaüberstand in den zweiten Beutel überführt und gingen damit der Fibrinogengewinnung verloren. Beim Überführen blieb außerdem ein Teil des Plasmaüberstandes im Beutel der nicht abgepresst werden konnte. Das Fibrinogenkonzentrat verflüssigte sich bei Zimmertemperatur und wurde dann in sterile Spitzen überführt und zur Lagerung erneut bei -20°C tiefgefroren. Der Reinheitsgrad der Fibrinogen- und Plasmakomponente hing bei dieser Methode wesentlich von der Übung und Geschicklichkeit der durchführenden Person ab, sodass eine saubere Trennung, mit hoher Fibrinkonzentration und weitestgehend fibrinogenfreiem Plasmaüberstand daher nur bedingt reproduzierbar war. In einem weiteren Ansatz wurde deshalb zugunsten einer besseren Reproduzierbarkeit sowie eines höheren Reinheitsgrades der Komponenten auf die Arbeit innerhalb eines geschlossenen Systems verzichtet.

Offenes System – Trennung in Falconröhrchen

Im offenen System wurden die Beutel mit dem frisch gefrorenen Plasma im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Nach vollständigem Auftauen wurde unter der Sterilbank das Schlauchende der Beutel mit einem sterilen Skalpell eröffnet und das Plasma in 50 ml Falconröhrchen überführt. Diese wurden erneut bei -70°C tiefgefroren und anschließend bei 4°C im Kühlschrank über 12 h aufgetaut. Im Falconröhrchen fiel das Fibrinogen als Niederschlag größerer weißer Flocken aus.

Dann erfolgte die Zentrifugation bei 3600 U / min (~ 2800 g) für 10 min bei 4°C. Unter der Sterilbank wurden dann die Falconröhrchen geöffnet und der Plasmaüberstand mit einer Pipette abgenommen und in einer sterilen Schottflasche gesammelt. Dieses Vorgehen erleichterte die Präparation ohne das Teile des Fibrinogenpellets sich lösen und in den Plasmaüberstand übertraten. Bei Raumtemperatur verflüssigte sich das Fibrinogenpellet innerhalb weniger Minuten, die flüssige Fibrinogenkomponente wurde dann in sterile Spritzen aufgenommen und erneut bei -20°C tiefgefroren.

Verfahrensentwicklung zur Präparation von autologem Thrombin

Die folgenden Verfahren beschreiben jeweils unterschiedliche Ansätze zur Gewinnung des autologen Thrombinkonzentrates. Ausgehend von etwa 200 ml Blutplasma wurde nach Abtrennen des Kryopräzipitates der Plasmaüberstand zur Isolation des Prothrombinkomplexes weiterverarbeitet.

Entwicklung eines geschlossenen Einmalsets zur Thrombinpräparation

Im anfänglichen Ansatz wurde die Entwicklung eines Prototypen bestehend aus einem Einmalset von in der Transfusionsmedizin üblichen Plasmabeuteln mit zwischengeschalteter Chromatographieeinheit verfolgt. Das Hauptanliegen dieser Lösung war ein Arbeiten innerhalb eines geschlossenen Systems zu ermöglichen und damit das Arbeiten unter der Sterilbank oder einem Reinraum überflüssig zu machen. Das Set umfasst alle Schritte zur Gewinnung des Thrombinkonzentrates und der gerinnungsfaktorarmen Plasmakomponente, aufbauend auf der Gewinnung von Fibrinogen im oben beschriebenen geschlossenen System. Nach Abtrennung des Kryopräzipitates und Überführen des Plasmaüberstandes in einen zweiten Beutel wurde dieser durch steriles Anschweißen an das entwickelte Set konnektiert.

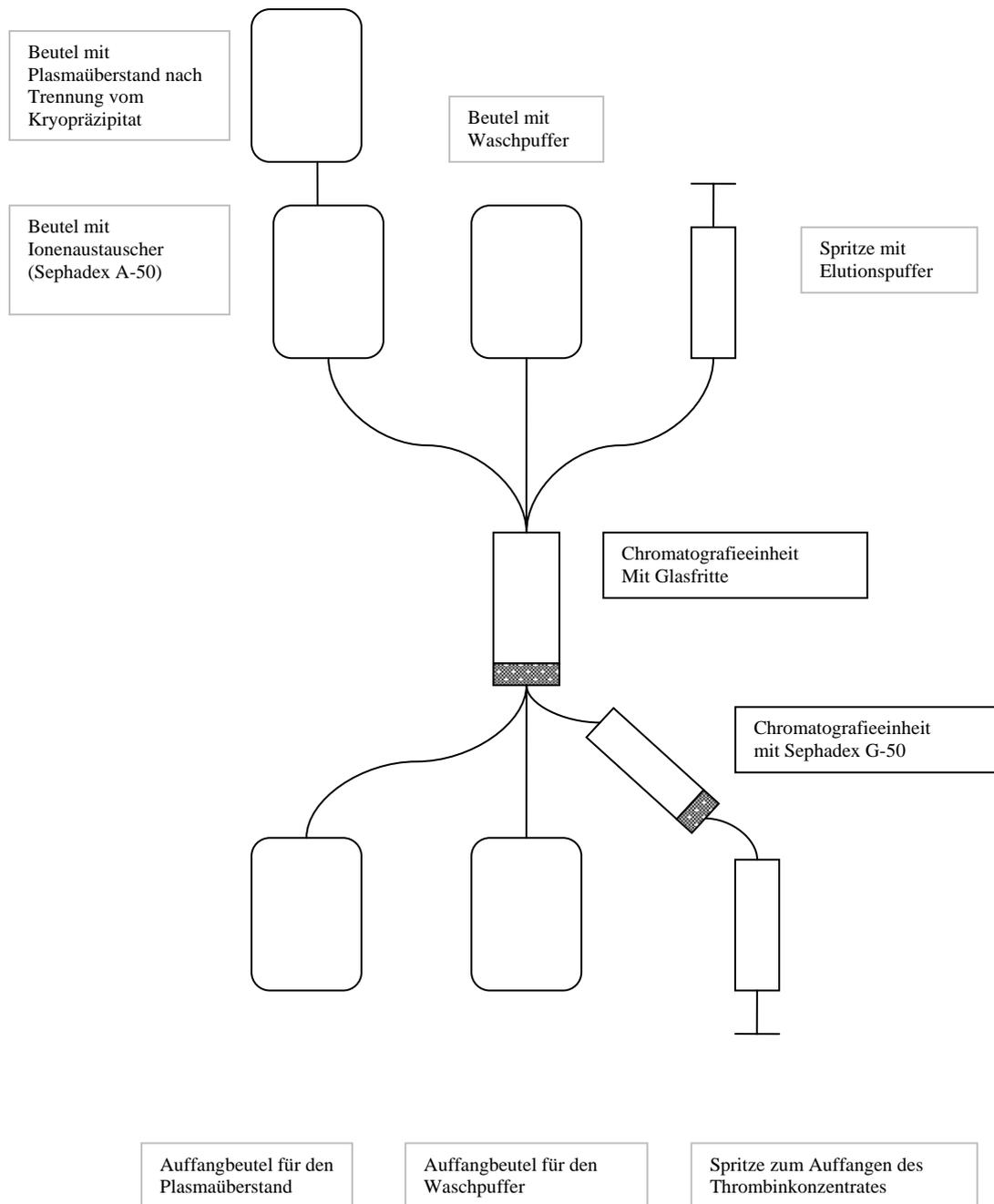


Abb.2 Skizze des Einmalsets zur Präparation im geschlossenen System.

Nach Konnektierung des Plasmaüberstandes an das Beutelset wurde der Verbindungsschlauch geöffnet und das Plasma lief in den mit 8ml Sephadex A-50 gefüllten Beutel. Dann wurde mittels einer Klemme der Rücklauf verschlossen. Auf einer Kippschaukel wurde innerhalb eines Zeitraumes von 45min bei Zimmertemperatur der größte Teil des Prothrombinkomplexes (PBSB) an Sephadex A-50 gebunden. Das Set wurde dann an einem Haken befestigt und Plasma und Sephadex-A50 liefen über die erste Chromatographieeinheit bestehend aus einem Glaszylinder mit Fritte. Durch Filtration wurden so Sephadex-A50 und der zweite Plasmaüberstand voneinander getrennt. Das Sephadex A-50 wurde über der Fritte zurückgehalten und packte sich innerhalb des Zylinders zu einer Säule. Das Restplasma wurde über den Dreiweghahn in einen leeren Beutel geleitet, dort gesammelt und dann verschlossen. Sobald sich über der Säule noch ein etwa 1 cm Hoher Plasmaspiegel befand wurde der Hahn geschlossen, um ein Austrocknen der Säule zu verhindern. Dann wurde die Verbindung zum Beutel mit dem Waschpuffer geöffnet. Der Waschpuffer durchlief die Chromatographieeinheit und reinigte dabei das Sephadex A-50 von anderen Plasmaproteinen. Wie der zweite Plasmaüberstand wurde er in einem eigenen Beutel aufgefangen und dieser mit einer Klemme verschlossen. Auch hier wurde der Hahn geschlossen, sobald sich nur noch ein etwa 1cm hoher Spiegel aus Waschpuffer über der Säule befand. Im Anschluss erfolgte die Applikation des Elutionspuffers. Dieser durchlief die Säule und verdrängte mit der hohen Salzkonzentration den PBSB-Komplex vom Ionenaustauscher (Sephadex A-50). Das hierbei entstehende PBSB-Konzentrat wurde zur Entsalzung in die zweite Chromatographieeinheit mit Sephadex G-25 geleitet. Dort wurde der Überschuss der Salzionen gebunden, die eine ungünstige Konformationsänderung auf das auszubildende Fibrinnetz bewirken könnten (De Cristofaro and Di Cera 1992). Die negativ geladene Glasoberfläche der Chromatographiesäule bewirkte zugleich die Aktivierung des Prothombins zu Thrombin. Das Konzentrat wurde in einer Spritze mit 0,5 ml einer 40mmol/ml CaCl-Lösung gesammelt. Die Spritze mit der Thrombinkomponente wurde dann steril verpackt und eingefroren.

Insgesamt wurden mit diesem Prototypen zehn Durchläufe getestet wobei folgende Konzentrationen gemessen wurden:

<i>Nr.</i>	<i>Thrombinaktivität in NIH</i>	<i>Fibrinogen in mg/ml</i>
1	0,4	13,6
2	0,7	9,09
3	0,6	25
4	0,7	4,29
5	0,4	21,75
6	0,5	7,88.
7	560	42,96
8	1,0	12,9
9	0,7	24,1
10	600	12,2

Die mit dem Einmalset 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/ml. Dabei hoben sich die beiden hohen Werte von 560 und 600 NIH sehr deutlich von den übrigen Werten zwischen 0,4 und 1 NIH ab. Die Fibrinogenkonzentration betrug im Mittel 17,4 mg/ml mit einer Standardabweichung von 11,4 mg/ml.

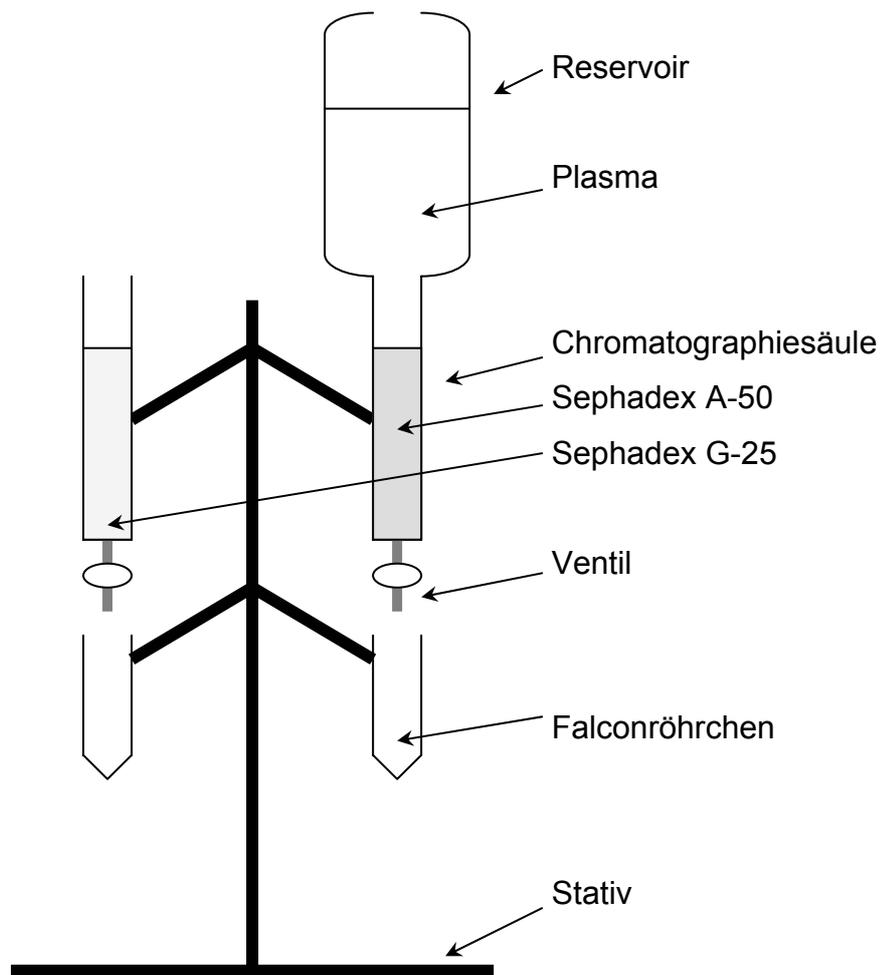
Das System erlaubte ein relativ komfortables Arbeiten in wenigen leicht zu handhabenden Arbeitsschritten außerhalb der Sterilbank. Nach der Adsorption der entsprechenden Gerinnungsfaktoren dauerte der ganze Vorgang jeweils etwa 90min. Der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt war hier die Trennung des Sephadex vom zweiten Plasmaüberstand. Es war zu beobachten, daß die Durchflusgeschwindigkeit mit der Menge des filtrierten Plasmas stetig abnahm. Während zu Beginn ein stetiger Plasmafluß in den Beutel zur Sammlung des Überstandes zu beobachten war konnte die Chromatographiesäule nach Durchfluß von etwa 2/3 der Plasmamenge nur noch Tropfenweise passiert werden. Desweiteren wurde beobachtet dass ein völlig horizontales Ausrichten des Systems durch einfaches Aufhängen nicht erreicht werden konnte. Dadurch bildeten sich

insbesondere beim Waschen und Eluieren in der Säule Durchflußkanäle die eine schnelle Durchflußgeschwindigkeit innerhalb dieser Kanäle und eine langsame durch den größten Teil des Ionenaustauschers zur Folge haben mussten. Es ist davon auszugehen, daß deshalb ein beträchtlicher Teil des PBSB Komplexes nicht ausgewaschen und im Eluat gesammelt werden konnte. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass in acht von zehn Proben eine nur sehr geringe Thrombinaktivität gemessen wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, daß es zwischen Herstellung und Messung zu einer Unterbrechung der Kühlkette kam und deshalb in einigen Proben Thrombin aufgrund seiner relativ kurzen Halbwertszeit bereits inaktiviert wurde. Auch bei der Thrombingewinnung wurde deshalb zugunsten einer gegenüber Umwelteinflüssen stabileren Versuchsumgebung das Arbeiten in einem geschlossenen System aufgegeben.

Konstruktion einer autoklavierbaren Präparationsvorrichtung

Ein weiterer Ansatz war deshalb die Entwicklung einer autoklavierbaren Glaskonstruktion. Diese sollte bei Arbeiten unter der Sterilbank standardisierte Bedingungen gewährleisten um die durch das System entstehende Fehlergröße zu minimieren.

Abb.3 Skizze der Präparationseinheit:



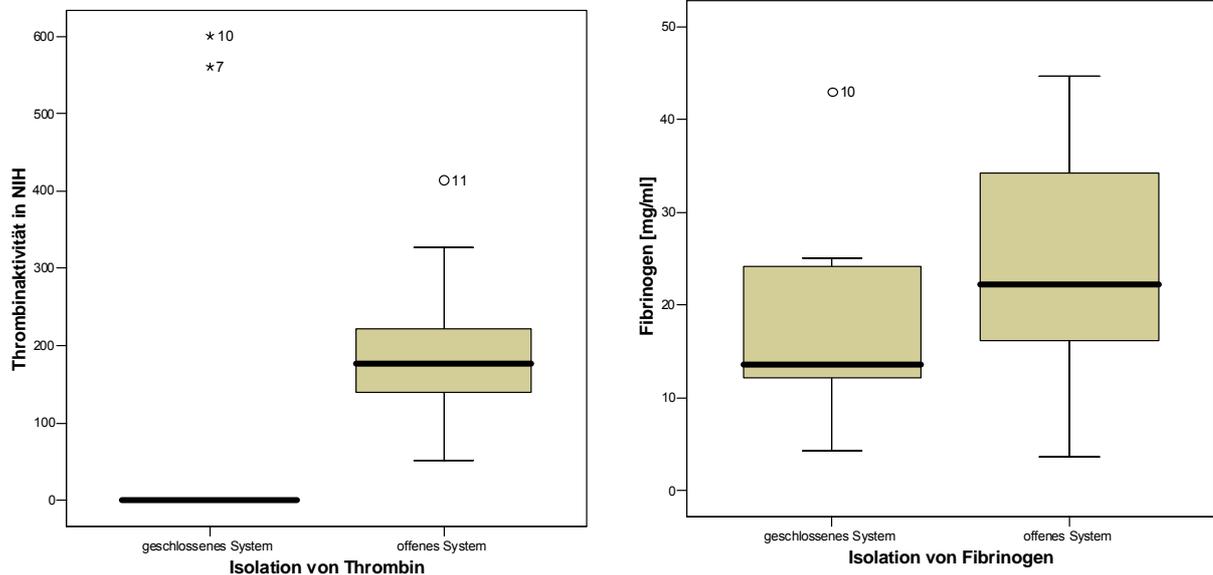
Mit der autoklavierbaren Präparationseinheit wurde das Ziel verfolgt reproduzierbarere Ergebnisse zu erzielen. Über einer Chromatographiesäule wurde ein Kolben mit einem Fassungsvermögen von 300ml befestigt. Nach Befüllen der Säule mit Sephadex A-50 wurde der Inhalt eines Beutels mit Plasmaüberstand (ca. 200ml) in den Kolben gefüllt. Anschließend durchlief das Überstandsplasma die Säule, so daß der PBSB-Komplex am Sephadex anbinden konnte. Das Restplasma wurde unter der Chromatographiesäule als Additiv für Nährmedien wieder aufgefangen. Nach Durchlaufen des gesamten Plasmas erfolgte die Reinigung der Säule mit Waschpuffer und letztlich die Ablösung des PBSB-Komplexes mit Elutionspuffer. Das PBSB-Konzentrat wurde dann über einer zweiten Säule mit Sephadex G-25 wiederum vom Salz befreit. Der an den negativ geladenen Glaswänden zu Thrombin aktivierte PBSB-Komplex wurde dann ebenfalls in einem Falconröhrchen aufgefangen, steril verpackt und eingefroren.

Ergebnisse aus der Präparation mit der autoklavierbaren Glaseinheit.

<i>Nr.</i>	<i>Thrombinaktivität in NIH</i>	<i>Fibrinogenkonzentration in mg/ml</i>
1	414,0	14,6
2	327,0	3,65
3	236,0	16,8
4	241,0	21,52
5	146,0	7,89
6	95,0	17,2
7	215,0	9,33
8	142,0	43,6
9	151,0	31,6
10	193,0	17,98
11	51,9	22,96
12	216,0	15,56
13	126,0	36,3
14	184,0	18,52
15	221,0	32
16	221,0	43
17	169,0	44,6
18	161,0	31,88
19	76,8	42,96
20	137,0	24,18

Die in der autoklavierbaren Präparationseinheit hergestellten Thrombinkonzentrate zeigten eine wesentlich größere Homogenität der Thrombinaktivität mit Werten von 51,9 – 414 NIH/ml. Das Volumen der Thrombinfraktion betrug 5,6 +/- 1,1ml, die Aktivität des autolog präparierten Thrombins betrug im Mittel 186,2 mit einer Standardabweichung von +/- 81,1 NIH/ml. Die Fibrinogenkonzentration betrug im Mittel 24,8 mg/ml mit einer Standardabweichung von 12,4 mg/ml.

Vergleich der geschlossenen und offenen Herstellungsverfahren



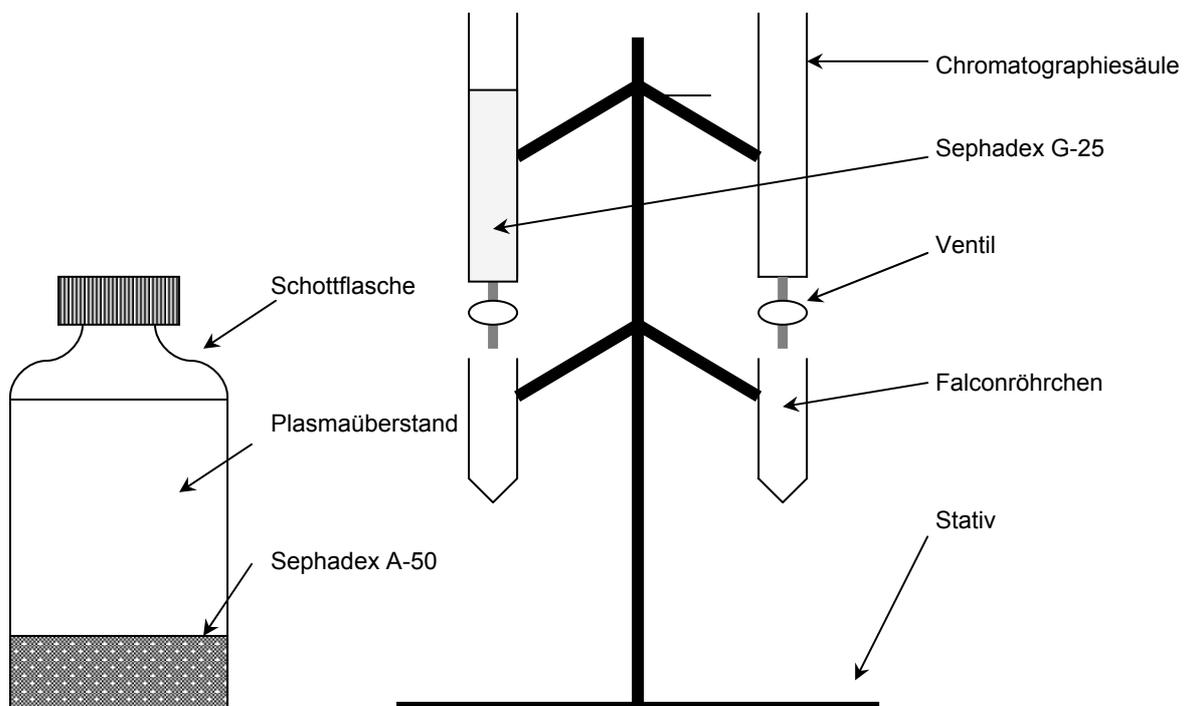
Im direkten Vergleich der beiden Verfahren zeigt sich eine höhere Ausbeute an Fibrinogen und Thrombin sowie eine homogenere Verteilung der Werte bei der Verwendung des offenen im Vergleich zum geschlossenen System. Im Mann – Whitney Test sind diese jedoch nur in Bezug auf Thrombin auch statistisch signifikant ($p= 0,018$). Im T-test für unverbundene Stichproben ergibt sich für Fibrinogen ein Wert von $p= 0,13$.

Weitere Anpassung des Prozesses während der klinischen Präparation

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung sollten einzelne Arbeitsschritte weiter rationalisiert werden, um eine Präparation in kürzerer Zeit zu ermöglichen. Insbesondere der sehr zeitaufwendige Schritt der Trennung des mit PBSB Komplex beladenen Sephadex A-50 vom Plasmaüberstand wurde deshalb erneut überdacht. Mit fortschreitender Durchlaufmenge nahm die Durchflussgeschwindigkeit stetig ab. Dies mag zum einen durch Zusammenpressen der Sephadexsäule durch das obenaufliegende Plasma verursacht worden sein zum anderen durch Restmengen von Fibrinogen die innerhalb der Säule auspolymerisierten und den Durchfluß verstopften. Eine wichtige Verbesserung hinsichtlich dieser Engstelle war das

Umstellen auf eine sogenannte Batch-Technik indem das Binden des Plasmaüberstandes an Sephadex-A50 in einer rotierenden sterilen Schottflasche stattfand. Im Anschluss wurde die Schottflasche für einige Minuten stehengelassen, so dass sich das Sephadex am Boden absetzen konnte, der zweite Plasmaüberstand wurde dann mit einer Pipette aufgenommen und über der Glassäule mit Fritte abfiltriert. Dieser Plasmaüberstand steht damit als Additiv für Nährmedien zur Verfügung. In die Schottflasche wurde dann der Waschpuffer gefüllt, die Schottflasche wurde noch einige Male gedreht, und der Waschpuffer wieder bis auf einen Rest von etwa 10 ml mit einer Pipette entfernt. Dieser Rest wurde dann zusammen mit dem abgesetzten Sephadex A-50 in einer Pipette aufgenommen und in den Glaszylinder mit Fritte gegeben. Es folgte das Abfiltrieren des Waschpuffers, bis auf eine Restmenge von etwa einem ml über der Säule und das anschließende vorsichtige Aufbringen des Elutionspuffers. Das weitere Vorgehen gleicht der vorausgehenden Beschreibung. Die für die klinische Präparation entscheidende Dauer der Thrombinpräparation konnte so von etwa 90 min auf etwa 20 min verkürzt werden.

Abb. 4



Übersicht des gesamten Verfahrens

1. Gewinnung des autologen Plasmas durch maschinelle Plasmapherese
2. Schockgefrieren des separierten Plasmas
3. Transport in das Präparationslabor
4. Auftauen des Plasmas im Wasserbad
5. Umfüllen des Plasmas in Falconröhrchen
6. Erneutes einfrieren des Plasmas
7. Auftauen bei 4°C über 12 h
8. Trennung des Präzipitates vom Überstand durch Zentrifugieren
9. Abfüllen und Einfrieren des präzipitierten **Fibrinogens**
- 10 Binden von Sephadex A-50 an den Plasmaüberstand
11. Trennen von Sephadex A-50 und **Plasmaüberstand**
12. Waschen von Sephadex A-50
13. Eluieren des Prothrombinkomplexes von Sephadex
14. Aktivieren von Prothrombin zu Thrombin
15. Stabilisation des Thrombins
16. Abfüllen und Einfrieren der **Thrombinkomponente**

Weitergehende Untersuchungen zur Klebefestigkeit des Fibrinklebers und zur Kultur von Chondrozyten in einer Fibrinmatrix wurden von Dipl. Ing. Jan David im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt (David 1999).

Am immunkompetenten Tiermodell wurde das Verfahren zur Herstellung eines speziesspezifischen Fibrinklebers als Matrix für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe am Kinnchen im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Frank Wanjura angewendet (Wanjura 2002).

Die Konzeption und Durchführung der folgenden Anwendung erfolgte durch die Klinik für Plastische- und Handchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg (Direktor Prof. Dr. GB Stark). Die Zellkulturen erfolgten unter Reinraumbedingungen in einem GMP-Labor der Firma BioTissue - Technologies (Freiburg).

Anwendung des autologen Fibrinklebers als Zellmatrix im Tissue Engineering zur Rekonstruktion eines Ohrmuscheldefektes am Patienten.

Erstmals klinisch angewendet wurde die rein autologe Fibrinmatrix für das Tissue Engineering an einem 23-jährigen Patienten der neben anderen Verletzungen während eines Arbeitsunfalls den mittleren Teil seiner rechten Ohrmuschel verloren hatte. Zuvor war der Patient bereits vielfach an anderen Körperstellen operiert worden, eine plastische Deckung durch ein Compositegraft des linken Ohres sollte nach Möglichkeit vermieden werden da er keine Eingriffe wünschte, die zu weiteren sichtbaren Narben am Kopf führen würden.



(Abb. 5 a und b) Ansicht des Ohrmuscheldefektes von hinten und von der Seite.

Um jegliche Fremdkörperreaktion gegenüber dem gezüchteten Transplantat auszuschließen zu können, wurden lediglich körpereigene Ausgangsmaterialien, d.h.

autologe Chondrozyten und eine Matrix aus autologem Blutplasma verwendet. Unter Zuhilfenahme von Techniken der Epithetik sollte ein passgenaues und exakt dem anatomischen Defekt entsprechendes Transplantat aus gezüchtetem Knorpel gefertigt werden.

Zunächst erfolgten daher eine in mehreren Schritten durchgeführte Abformung des Defektes und die Anfertigung einer sterilisierbaren Gießform aus Silikon, in welcher später das Transplantat geformt wurde.

(Anfertigen der Silikonform durch Dr. U. Schneider, Universitätsklinikum Freiburg)



(Abb. 6 a, b und c) Mit zwei viskösen A-Siliconen (Epiform flex and Epiform solid, Dreve, D-Unna) wurde zunächst ein Abdruck des Defektes genommen. Nach Erstellen von Arbeitsmodellen aus Superhartgips und Synthetik wurde dann eine Silikonhohlform mit einem Injektions- und zwei Entlüftungskanälen angefertigt.

Vor der Gewinnung des autologen Knorpels wurden dem Patienten mittels Plasmapherese drei Einheiten autologen Blutplasmas von 200-220 ml entnommen die unter der Sterilbank nach dem entwickelten Verfahren zu autologem Fibrinogen und Thrombin sowie einer serumartigen Fraktion separiert wurden.

Insgesamt konnten so 18ml Fibrinogenkonzentrat, 10 ml Thrombinlösung und 540 ml serumähnliches gerinnungsfaktorarmes Plasma gewonnen werden. Die Fibrinogenkomponente erreichte dabei eine Konzentration von 35 mg/dl die Thrombinlösung zeigte eine Aktivität von 44 NIH/ml.

Im Rahmen eines ersten operativen Eingriffs wurde innerhalb einer minimal invasiven Operation eine kleine Probe Knorpel aus dem rechten Rippenbogen am costosternalen Übergang entnommen. Die Biopsie wurde mit einem Skalpel in etwa 1mm³ messende Stücke zerkleinert und enzymatisch (2mg/ml type II Kollagenase (Seromed, Germany) und 0.1 mg/ml Hyaluronidase (Serva, Germany) gelöst in RPMI 1640 Medium (Seromed, Germany) bei 37°C über 18 h verdaut.

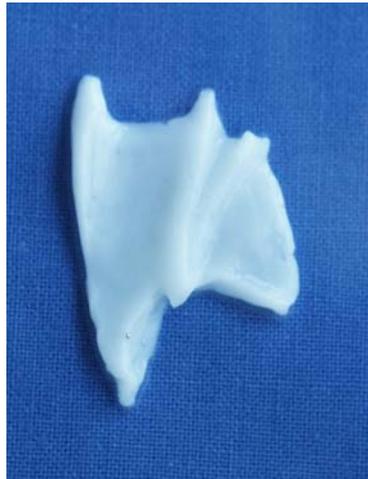
Die Zellvermehrung erfolgte dann in Kulturflaschen (Nunc, Naperville, USA) mit modifiziertem RPMI 1640 Medium (10% humanem autologem Serum, 2% HEPES, 1% Penicillin/streptomycin) unter Standardbedingungen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag erneuert, insgesamt wurde so innerhalb von 14 Tagen dreimal passagiert und die Chondrozyten von 26 Millionen auf 58 Millionen Zellen vermehrt.

Nach Abernten der kultivierten Zellen aus der Monolayerkultur wurden die so gesammelten Zellen in einer Spritze mit 2ml der autologen Fibrinogenlösung vermengt, 0,5 ml der Thrombinlösung wurden in eine zweite Spritze gefüllt. Durch zeitgleiche Injektion der Chondrozyten/Fibrinogen- Suspension und Thrombinlösung über eine Doppelspritze in die Siliconhohlform wurde dann das Transplantat geformt. Während des Einspitzens wurde das Fibrinogen mit Thrombin vermischt und zu Fibrin auspolymerisiert.



(Abb. 7) Einbringen der Chondrozyten/Fibrinogen - Suspension und Thrombinlösung über eine Doppelspritze und einen Adapter in die präformierte Siliconhohlform, über zwei Entlüftungskanäle kann die Restluft entweichen.

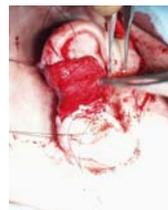
Zur Unterstützung des Polymerisationsprozesses der Matrix wurde die Siliconhohlform dann für 20 min bei 37°Celsius im Brutschrank inkubiert. Das so geformte Transplantat wurde entnommen und in einer mit Nährmedium (5% humanes autologes Serum, 2% HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin, 100 000 Einheiten Aprotinin (Trasylol, Bayer, Deutschland) per 100ml) gefüllten Petrischale zur Reifung erneut für 14 Tage unter Standardbedingungen im Brutschrank aufbewahrt. Das Nährmedium wurde alle 6h erneuert.



(Abb. 8 a und b) Bild des Transplantates vor und nach 14-tägiger Inkubation im Brutschrank. Während dieser Phase gewann das Transplantat palpatorisch an Festigkeit. Das Aussehen änderte sich von einem gelartigen Erscheinungsbild zu einem eher hyalin-knorpeligem Aussehen. Die Form blieb über die gesamte in-vitro Kultivierung stabil und zeigte keine Zeichen von Schrumpfung.

In einer zweiten Operation erfolgte die Implantation des gezüchteten Knorpels. Zu diesem Zeitpunkt passte das Transplantat exakt in den vorbestehenden Defekt, das Transplantat war fest genug um mit intercartilaginären Einzelknopfnähten im Bereich des Defektes am rechten Ohr eingenäht zu werden. Dann wurde mit einem gestielten temporoparietalen Fazienlappen ein Neoperichondrium geschaffen welches das Transplantat schützen und ernähren sollte, im letzten Schritt folgte eine Deckung mit vom Oberschenkel entommener Spalthaut.

(Durchführung der Operation durch Prof. Dr. GB Stark und Dr.med. D. Schäfer, Klinik für Plastische- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Freiburg)



Präoperativer Situs

Einnähen des Knorpeltransplantates

Heben des Temporoparietalen Fazienlappens

Umschlagen des Gestielten Fazienlappens

Deckung mit Spalthaut

Postoperativer Situs

(Abb 9 a, b, c, d und f)

Um die Vitalität des Lappens zu Beurteilen wurde postoperativ zwei Wochen lang täglich die Wunde kontrolliert und der Verband gewechselt. Die Fäden wurden am 7.postoperativen Tag entfernt. Um das Transplantat zu schützen trug der Patient für drei Wochen eine dafür angefertigte Silikonform.



(Abb. 10) Silikonschutzform die unter dem Verband getragen wurde um das Transplantat während der Einheilungsphase vor Druckschäden zu schützen.

Postoperative Beobachtungen

Nach einer anfänglichen Schwellung des Lappens im Transplantationsbereich innerhalb der ersten Woche folgte eine Schrumpfung und Kontraktion des Hauttransplantates. Durch diese Prozesse kam es besonders im Bereich der Helix zu Verziehungen. Trotz eines kosmetisch nicht optimalen Ergebnisses konnte der Defekt auch langfristig gedeckt werden. Palpatorisch ließ sich unter der Haut des Defektbereiches eine derbe feste Schicht ertasten die möglicherweise eher Faserknorpel entspricht. Da diese Schicht postoperativ mit zunehmender Dauer ausdünnte wurde das Transplantat nach 12 Monaten nocheinmal mit Conchaknorpel der Gegenseite unterlegt.



Reihe oben: (Abb. 11 a, b, c, d und e)

Reihe unten: (Abb. 12 a, b, c, d und e)

Zusammenfassender Überblick:

1. Abformung des Defektes und Anfertigen einer Silikonhohlform
2. Gewinnung von Plasma mittels Plasmapherese
3. Herstellung von autologem Fibrinogen, Thrombin und serumähnlichem Plasma
4. Gewinnung einer kleinen Knorpelbiopsie aus Rippenknorpel
5. Isolation und Vermehrung der Chondrozyten in Monolayerkultur
6. Formen des Transplantates in der Hohlform aus Chondrozyten und Fibrin
7. Kultivieren und *in-vitro* Reifung des Transplantates
8. Implantation und *in-vivo* Reifung des Transplantates