

### 5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Porcine Ohrchondrozyten lassen sich in der Monolayerkultur sowohl mit dem Mediumzusatz FCS als auch mit Serum vom adulten Schwein amplifizieren. Dabei verlieren sie ihren knorpelspezifischen Phänotyp und werden fibroblastoid. Mit FCS-Zusatz wachsen die Zellen in einem gleichmäßigen Zellrasen bis zum Erreichen einer Konfluenz. Die Zugabe von Schweineserum bedingt die Bildung von Zellinseln, Nodules, mit sich übereinanderlagernden Chondrozyten, ohne dass sie den Zellkulturflaschenboden vollständig bedecken. Der Zellvermehrungsfaktor von der 2. zur 3. Passage ist bei der Schweineserumkultur nur halb so groß wie bei dem FCS-Ansatz.
- Die *in vitro*-Untersuchung zeigte, dass die Zellen aus der Monolayerkultur im dreidimensionalen Konstrukt ihre Knorpelspezifität nicht völlig verloren bzw. wiedererlangt haben. Histologisch konnten Chondrozyten nachgewiesen werden.

Bei den Untersuchungen gleich im Anschluss an den Bau der Transplantate zeigte sich unabhängig von der Passage, aus der die Zellen verwendet wurden, eine gering- bis mittelgradig ausgeprägte Degeneration der Chondrozyten. Für die Kieselgelfasern-Fibrin-Chondrozyten-Gebilde galt: Sowohl die frisch isolierten Zellen als auch die aus der 1. und 2. Passage stammenden Zellen erschienen über den gesamten Beobachtungszeitraum mittel- bis hochgradig degeneriert.

Bei den faserfreien Transplantaten waren die frisch isolierten Zellen gering- bis mittelgradig, die Zellen aus der 1. Passage mittel- bis hochgradig und die Zellen aus der 2. Passage hochgradig degenerativ verändert. Auffällig war bei den Konstrukten aus der 2. bis 4. Passage eine Substanz, die an sich auflösenden Fibrinkleber bzw. an Knorpelmatrix erinnerte. Ergänzende Färbungen bestätigten, dass es sich bei den Präparaten aus der 4. *in vitro* Woche um Knorpelmatrix handelte, die im Untergang begriffen war. In wieweit noch Fibrinkleberanteile vorhanden waren, ließ sich mit den zur Verfügung stehende Mitteln nicht nachweisen.

Bei den Konstrukten sowohl mit als auch ohne Kieselgelfasern mit Zellen aus der 3. und 4. Passage konnten von der 1. bis zur 8. Woche durchgehend hochgradige

degenerative Veränderungen der Chondrozyten nachgewiesen werden.

- Unmittelbar nach dem Bau sind die Zellen noch am wenigsten degeneriert.
  - Die faserfreien Konstrukte schädigen die Zellen weniger.
  - In der 3. und 4. Passage sind die Zellen von der 1. bis zur 8. Woche hochgradig degeneriert, unabhängig davon, ob Fasern enthalten sind oder nicht.
- Erkennbar war eine Korrelation zwischen dem Körpergewicht der Schweine zum Zeitpunkt der Ablatio auris und der gewonnenen Knorpelzellzahl: Je schwerer (und damit älter) ein Tier war, um so kleiner war die Chondrozytenzahl.
  - Das im Schweineblut enthaltene Fibrinogen konnte nahezu vollständig durch das Kryopräzipitationsverfahren ausgefällt werden und stellte somit eine qualitativ gute Fibrinkleberkomponente dar.
  - In Transplantaten, die aus Zellen der in dieser Studie verwendeten Schweine konstruiert und parallel *in vitro* kultiviert worden waren (1 Tag bis 3 Monate), wurden histologisch Chondrozyten bzw. Knorpel nachgewiesen, die jedoch stark degenerativ verändert erschienen. Ein Schwein einer vorherigen Studie lieferte die Zellen für das Transplantat, das über 10 Monate kultiviert worden war.
  - Bei der makroskopischen Beurteilung der Transplantate aus der Versuchstiergruppe 1 waren zu jedem Zeitpunkt die fasernhaltenden Konstrukte leicht im subkutanen Gewebe zu identifizieren. Die faserfreien Transplantate waren aufgrund ihrer geringen Ausgangsgröße zu späteren Explantationszeitpunkten nicht zweifelsfrei wieder aufzufinden. Es konnte kein Zusammenhang hergestellt werden zwischen dem Aussehen der Transplantate und einer gegebenenfalls erfolgten Immunmodulation.
- Makroskopisch waren in der Versuchstiergruppe 2 alle Kieselgelfasern enthaltenden Transplantate und die meisten Lokalisationen der Fibrin-Chondrozyten-Konstrukte zu jedem Explantationszeitpunkt *in vivo* auszumachen. Am 16. und 31. Tag waren bei allen Faserkonstrukten Fremdkörperkapseln von mehreren Millimetern Stärke um das Transplantat mit bloßem Auge erkennbar. Die cortisonbehandelten Tiere zeigten dieses Phänomen schon am 8. Tag nach Implantation. Dabei nahm die Kapseldicke über die Zeit geringgradig ab, während die Häufigkeit des Sekret-Auftretens bei den entsprechenden Konstrukten zunahm.
- Bei der histologischen Auswertung wurden die Phänomene ‚chronische Entzündung‘, ‚Floridität der Entzündung‘, ‚Fibrose‘, ‚Eosinophilie‘ und ‚Fremdkörperreaktion‘

beurteilt und mit einer Graduierung versehen. Bei den folgenden Parametern konnten keine Zusammenhänge hergestellt werden zwischen einer Cortisonapplikation und dem Ausmaß der Befunde. Diese lassen eine verallgemeinernde Zusammenfassung zu:

- Die chronische Entzündung und ihre Floridität trat bei fast allen Konstrukttypen und bei allen Schweinen im geringen bis mittelgradigen Ausmaß auf. Meist war bei ‚Entzündung‘ eine leichte Zunahme, bei ‚Floridität‘ eine leichte Abnahme des Grades über die Zeit zu verzeichnen.

- Die fibrotischen Erscheinungen nahmen in der Regel mit der Zeit zu und zum Ende hin wieder ab.

- Bei dem Parameter ‚Fremdkörperreaktion‘ war keinerlei Zusammenhang zwischen Transplantattyp, Immunmodulation und Ausmaß des histologischen Befundes herzustellen.

Bei dem Kriterium ‚Eosinophilie‘ bestand eine Beziehung zwischen Immunmodulation, Fasermaterial und Kurvenverlauf: Bei den mit Cortison lokal behandelten Ethisorb®-Tieren fiel die Kurve von zunächst Grad 1 - 1,5 bis auf Grad 0,5 am letzten Explantationstag ab. In der Parallelgruppe (Kieselgelfasern) stiegen die Eosinophilie-Kurven hingegen von Grad 0 auf Grad 1, die zwischen dem 8. und 31. Tag in etwa aufrecht gehalten wurden. Bei den systemisch mit Cortison versorgten Schweinen fiel in der Ethisorb®-Gruppe ein leichtes Schwanken der Werte um Grad 1 auf, während in der Parallelgruppe ein leichter Anstieg zu beobachten war. Eine Ausnahme hiervon bildete „Kieselgelfaser, Fibrin und Chondrozyten“. Es wurde eine Kurve beschrieben mit Anfangs- und Endgrad 0 mit Maximalwert bei 1,5 am 8. Tag. Bei den Kontrolltieren konnte man keine Regelmäßigkeit zwischen den Gruppen und Transplantattypen beobachten.

Als Besonderheiten wurde folgendes verzeichnet:

→ Bei den Ethisorb®-Tieren, insbesondere bei dem Schwein, dessen Transplantate mit einer Cortisonlösung benetzt worden waren, traten von Beginn an Verkalkungen und metaplastische Verknöcherungen auf, die am letzten Explantationstag jedoch nicht mehr nachgewiesen werden konnten. In der Versuchstiergruppe 2 konnten bei den faserlosen Konstrukten der immunmodulierten Tiere an Tag 3 und Tag 8 degenerierte Knorpelzellen nachgewiesen werden.

- Die verpflanzten nativen Knorpelstückchen waren unabhängig von ihrer Lokalisation

an der Ohrbasis bzw. an der Schulter sowohl makroskopisch als auch histologisch unverändert.

- Bei dem mit Cortison lokal behandelten Schwein der Versuchstiergruppe 2 (Schwein 6) und bei dem Ethisorb-Kontrolltier (Schwein 1) befanden sich die Leukozyten-, neutrophile-Granulozyten- und Lymphozytenwerte im unteren Normbereich. Bei den übrigen Tieren aus Gruppe 2 lagen die Leukozyten und neutrophilen Granulozyten im oberen Normwertbereich bzw. es trat eine Neutrophilie in Erscheinung zwischen Implantation und Explantationstag 16. Bei dem mit Cortison systemisch behandelten Schwein der Tierversuchsgruppe 1 (Schwein 2) kam es bei den Leukozytenwerten zu einem Höchstwert an Tag 8, was sich bei den neutrophilen Granulozyten zwischen Tag 8 und Tag 16 manifestierte. Bei der Betrachtung der Lymphozytenwerte war generell bei allen Tieren eine abfallende Tendenz erkennbar mit Minimalwerten um den 16. Tag. Dabei lagen alle Werte im Normbereich.

Die übrigen Parameter des weißen Blutbildes lagen alle innerhalb der Norm.