

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Tiere

Für diese Versuchsstaffel wurde ein dem Menschen organisch relativ nahe stehendes Tiermodell gewählt: das Schwein. Es kamen zweimal 3 Hausschweine (5 weibliche und 1 kastriertes männliches) zum Einsatz, die mit einem Körpergewicht zwischen 30 und 45 kg in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin, eingestallt wurden. Sie wurden in Einzelboxen mit Stroheinstreu gehalten und bekamen einmal täglich morgens herkömmliches Schweinefutter in Pelletform. Wasser erhielten sie ad libitum. Die erste Operation (Knorpelentnahme) erfolgte mit einem Körpergewicht von durchschnittlich ca. 45 kg (Tabelle 2).

Tabelle 2: Einteilung der Versuchstiere in zwei Gruppen nach der Unterscheidung der Trägermaterialien (Ethisorb® / Kieselgelfaser), nach gegebenenfalls erfolgter Immunmodulation und nach unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen (verwendetes Fibrinogen, Vorkulturbedingungen, Lokalisationen)

	Schw.	Geschlecht	Gewicht bei Ablatio auris [kg]	verwendetes Fibrinogen, Vorkulturbedingungen, <i>in vivo</i>	Immunmodulation
Gruppe 1 (Ethisorb®)	1	männlich, kastriert	54,5	* allogenes Fibrinogen	Kontrolltier
	2	weiblich	47,3	* Vorkultur 10 - 12 Tage	Cortison systemisch
	3	weiblich	47,4	* FCS in der Vorkultur	Cortison lokal
Gruppe (Kieselgelfaser)	4	weiblich	1.) 42,2 2.) 53,0	* kommerzielles xenogenes Fibrinogen	Kontrolltier
	5	weiblich	32,5	* Vorkultur 3 - 5 Tage	Cortison systemisch
	6	weiblich	43,0	* allogenes Serum im Vorkultur-Medium mit Aprotininzusatz, Mediaumtausch nur zur Hälfte * randomisierte Implantationslokalisationen	Cortison lokal

4.1.2 Material für die Operationen am Tier und die Immunmodulation

Atropinum sulfonicum solutum, 10mg/ml	WDT, Garbsen
Braunol® (Jod-Polyvidonjod-Lösung)	Braun, Melsungen
Decortin® H 5 mg, 50 mg (Prednison)	Merck, Darmstadt
Discardit™ II Einmal-Spritzen (2, 5, 10, 20 ml)	Becton-Dickinson, Fraga, ESP
Ethilon® 2/0	Ethicon, Norderstedt
Gauze Swabs Mullkompressen	Beese, Barsbüttel
Heidelberger Verlängerung, 70 cm	Angiokard, Friedeburg
Isotone Natriumchloridlösung 154	Berlin-Chemie, Berlin
Ketamin® 10%	WDT, Garbsen
Lidocain® 2%	Braun, Melsungen
Monovette®, Li-Heparin LH/4,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Novalgine® (Metamizol-Natrium)	Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden
Penicillin-Heyl® oral 1 Mega	Heyl, Berlin
Perfudrop® -Air G Infusionsschlauch	Clinico, Bad Hersfeld
Periph. I.V. Catheter with Injektion valve	Becton Dickinson, Fraga, ESP
Sagrosept® Tücher	Schülke & Mayr, Wien, AUT
Skalpell Bard-Parker®	Becton Dickinson, Fraga, ESP
Sempermed® supreme Operationshandschuhe	Sempermed, Wien, AUT
Solu-Decortin® 50 mg	Merck, Darmstadt
Sprühpflaster	Beiersdorf AG, Hamburg
Sterican® Einmal-Injektionskanüle (0,6; 0,9mm)	Braun, Melsungen
Stresnil® (Azaperon)	Janssen-Cilag, Neuss
T 61®	Intervet, Unterschleißheim
Terramycin®/LA (Oxytetracyclin)	Pfizer, Karlsruhe

4. Material und Methoden

Vacutainer™	BD bioscience
Vetalgin® (Metamizol-Natrium)	Intervet, Unterschleißheim
Vicryl® 2/0	Ethicon, Norderstedt
Volon A 10® (Triamcinolondiacetonid)	Bristol-Meyers Squibb, München
Xylazin® 2%	WDT, Garbsen
Xylocain® 2%	Astra Zeneca, Wedel

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur und den Transplantatbau

Aqua dest.	Hausapotheke der Charité, Berlin
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Brain-Heart-Bouillon	Institut für Mikrobiologie, Charité, Berlin
Collagenase CLS II	Biochrom, Berlin
Collagenase P	Roche, Mannheim
Ethanol, 70%ig, unvergällt	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethanol, 70%ig, vergällt	Hausapotheke der Charité, Berlin
Ethisorb210®, 8mm Durchmesser, 1,5 mm dick	Ethicon, Norderstedt
FCS-Hams F12-Medium	Hams F12-Medium mit 5 % FCS , 25 mmol Hepes-Puffer, 35 µg/ml L- Prolin, 50 µg/ml Ascorbinsäure, 100 I.U./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
FCS-Medium	RPMI – Medium 1640 mit 10% FCS, 100 I.U./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Fetales Kälberserum, FCS	Biochrom, Berlin
Gentamicin	Gibco, Karlsruhe
Hams F12-Medium	PAA, Pasching, AUT
Hanks-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Hepes-Puffer	PAA, Pasching, AUT

4. Material und Methoden

Hyaluronidase, 1000 Units	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kieselgelfasern	Fraunhofer Institut für Silikatforschung, Würzburg
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-Citrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Phosphate Buffered Saline, PBS	PAA, Pasching, AUT
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching, AUT
Schweineserum, SS	eigene Herstellung (von Schlachtschweinen)
SS-Hams F12-Medium	Hams F12-Medium mit 5 % Schweineserum , 25 mmol Hapes-Puffer, 35 µg/ml L-Prolin, 50 µg/ml Ascorbinsäure, 100 I.U./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
SS-Medium	RPMI 1640– Medium mit 10 % Schweineserum, 100 I.U./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Thioglykolat-Bouillon	Institut für Mikrobiologie, Charité, Berlin
Tissucol™	Baxter, Volektswil, CH,
- mit humanem Fibrinogen, 300 KIU/ml	
Aprotinin, 500 I.E. Thrombin,	
40 mmol/l Calciumchlorid-Lösung	
Trasyol® (Aprotinin)	Bayer, Leverkusen
Trypan Blau	Merck, Darmstadt
Trypsin, 0,05%ig, mit 0,02 % EDTA	Biochrom , Berlin
4.1.4 Geräte und Zubehör	
Deckelautomat Tissue-Tek® SCA	Sakura, Zoeterwoude, NL

4. Material und Methoden

Digitale Photokamera C 30302	Olympus, Berlin
Digitale Photokamera Coolpix 990	Nikon, Düsseldorf
Mikrotiterpipetten, mit Spitzen	Eppendorf, Wesseling-Bersdorf
Einbettautomat Hypercenter XP	Shandon, Dreieich
Flowbank Hera Safe Typus 12	Heracell, Sarstedt
Hämacytometer, mit Deckglas	Roth, Karlsruhe
Glasflasche Schott Duran, 1000 ml	Schott Glas, Mainz
HE-Färbe-Automat Varistain 24-4	Shandon, Dreieich
Inkubator Typ HERAcell	Heracell, Sarstedt
Kryostat Frigocut E 2800	Reichert-Jung, Heidelberg-Nußloch
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Bulle, CH
Laborautoklav Sanoclav Typ S-ECZ	Sanoclac, Bad Überkingen-Hausen
Lichtmikroskop CK 40-SLP mit Fluoreszenzeinheit U-RFLT 50	Olympus, Hamburg
Magnetrührer compact MP 1	Merck, Darmstadt
Microtome: - Rotationsmicrotom (ohne Motor) Microm HM 330 - Schlittenmicrotom Microm HM 40	Microm, Heidelberg
Nylonzellsieb, 100 µm	Falcon, Le Pont De Claix, F
Pipettierhilfe	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Falcon, Le Pont De Claix, F
Spinnerflasche	Wheaton, Millieville NJ, USA
Sterican® Einmalkanülen	Braun, Melsungen
Sterilfilter Rotrand, 0,2 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Telemodul Variomac 40C	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Tiefkühltruhe, -80°C	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Waage (Fein-) Navigator™	Ohaus, Gießen
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

4. Material und Methoden

Zellkultur-Testplatten (6er, 48er)	GFL, Techno Plastic Products, Trasadingen, SUI
Zellkulturflasche 420 cm ²	Biochrom, Berlin
Zellkulturflasche 500 cm ²	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Universal 32 R	Hettig, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Nunc, Roskilde, DK
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Numbrecht

4.1.5 Material für die histologischen Färbungen

Aceton	Hausapotheke Charité, Berlin
Corbit-Balsam	I. Mecht, Kiel-Massee
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt (70%, 80%, 96%, abs.)	Hausapotheke Charité, Berlin
Formalin 10 %, gepuffert, Accustain®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxilin (-monohydrat)	Merck, Darmstadt
Methylbenzoat	Merck, Darmstadt
Objektträger Chem Mate Capillary	Dako, Hamburg
Paraffin (Histosec®)	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek® 4566 Cryomold	Sahura, Zoéterwoude, NL
Tissue-Tek®	Sahura, Zoéterwoude, NL
Xylol	J. T. Baker

4.2 Methoden

4.2.1 In vivo Untersuchungen

4.2.1.1 Chondrozytengewinnung

4.2.1.1.1 Ablatio auris

In der ersten operativen Sitzung wurde den Schweinen ein Teil einer Ohrmuschel abgenommen. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 1,0 ml Stresnil®, 3,0 ml Ketamin® 10%, 1,8 ml Xylazin® 2% und 0,17 ml Atropin® 1% pro 10 kg KGW. Anschließend wurde ein venöser Zugang in einer Ohr- oder Beinvene gelegt, über den die Schweine alle 10 Minuten 2,0 ml des 10%igen Ketamins nachinjiziert bekamen und alle 20 Minuten zusätzlich 0,7 ml des 2%igen Xylazins. *Intra operationem* wurde das Schwein mit physiologischer Kochsalzlösung infundiert.

Nach einer OP-Feld-Vorbereitung nach herkömmlichen chirurgischen Kautelen wurde etwa die Hälfte einer Ohrmuschel nach Infiltrationsanästhesie mit maximal 7,0 ml Lidocain® 2% mittels eines Thermokauter-Schnittes abgetrennt. Die Wunde wurde mit Einzelheften verschlossen und mit einem Wundspray versorgt. Ferner wurden ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (Aubikal®, 10–15 ml / Tier) und ein Langzeitantibiotikum (Terramycin® /LA, 20,0 mg/kg KGW) i.m. injiziert. Der abgetrennte Ohrteil wurde bis zum Ende der Operation im Kühlschrank gelagert und anschließend zur weiteren Bearbeitung ins Labor transportiert.

4.2.1.1.2 Präparation und Zerkleinerung des Knorpels

Im Labor wurde unter einer Sterilbank nach erneuter Desinfektion mit einer Jod-Polyvidon-Lösung (Braunol®) die Haut von der Knorpelplatte getrennt, das Perichondrium abpräpariert bzw. abgeschabt und anschließend der Knorpel mit einem Skalpell grob zerkleinert (ca. 2 x 4 cm groß) und in Hanks-Lösung bis zur weiteren Verarbeitung gelagert, um eine Austrocknung des Knorpels zu verhindern. Nach Gewichtsbestimmung der Knorpelstücken wurden diese kurz mit 70%igem unvergällten Ethanol gewaschen, um eine Verkeimung zu verhindern und anschließend mehrfach mit Hanks-Lösung, dem 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben worden waren, gewaschen, um den zellschädigenden Alkohol vollständig zu entfernen. Im nachfolgenden Schritt wurden die Knorpelstücke mit einem Skalpell in ca. 2-3 mm² große Stückchen geschnitten.

4.2.1.1.3 Knorpelverdau, Isolierung der Chondrozyten, Zellvermehrung

Die Knorpelstückchen wurden im FCS-RPMI-Medium mit einem sterilfiltrierten Enzymcocktail (bestehend aus 10.000 units Collagenase CLS II, 30 units Collagenase P und 1000 units Hyaluronidase pro Ansatz) zum Verdau der extrazellulären Knorpelmatrix in Spinnerflaschen (mit Magnetrührmechanismus) gegeben (Abbildung 6). Daraufhin wurden diese auf einem Magnetrührer über 18 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ - Gehalt im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurden die Knorpelzellen isoliert, indem die Verdau-Suspension durch ein Nylonzellsieb in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt wurde, wodurch die nicht vollständig verdaute Knorpelmatrix von den Chondrozyten getrennt wurde. Diese Zellsuspension wurde anschließend 10 Minuten lang bei 500 × g zentrifugiert, der so entstandene zellreiche Bodensatz in Hanks®-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war, um restliche Knorpelmatrixbestandteile vollständig heraus zu waschen. Die Bestimmung der vitalen Zellzahl erfolgte mittels der Trypan Blau-Methode. Die Chondrozyten-Suspension wurde zu gleichen Teilen mit 0,5%iger Trypan Blau-Lösung in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß gemischt. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel berechnet: Der Mittelwert der 4 mittleren Quadrate (Zellen x) multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension (Faktor y), der Verdünnung mit Trypan Blau (Faktor 2) und der durch die technischen Vorgaben der Neubauer®-Zählkammer bedingten Konstanten 10⁴:

$$\text{Gesamtzellzahl} = x * 2 * y * 10^4$$

x = Mittelwert der Zellen in den mittleren Quadraten der Zählkammer

2 = Verdünnungsfaktor Trypanblau – Zellsuspension

y = Volumen der Zellsuspension

10⁴ = Neubauer-Faktor

Die Vitalitätsbestimmung erfolgt ebenfalls durch die Anfärbung der Zellen mit Trypan Blau.

Vitale Zellen erscheinen hell leuchtend, während tote Zellen dunkelblau angefärbt sind. Die Vitalität der Chondrozyten berechnet sich aus der Differenz der Gesamtzellzahl und den toten Zellen.

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Anzahl der vitalen Zellen} * 100 \%}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 6 Millionen Zellen pro 420 cm² – Zellkulturflasche beziehungsweise 7 Millionen Zellen pro 500 cm² - Zellkulturflasche in FCS-Medium ausgesät und im Brutschrank mit 5% CO₂-Begasung bei 37°C inkubiert. Jeden 2. bis 3. Tag wurden die Zellen mikroskopisch auf Adhärenz (Anheften der Zellen am Flaschenboden) und auf Wachstum kontrolliert und ein Mediumwechsel vorgenommen.



Abbildung 6: Brutschrank mit Zellverdau in Spinnerflaschen;
Zellkulturflaschen für die Monolayerkultivierung der Chondrozyten

4.2.1.1.4 Passagieren der Zellen, Zellernte

Nach 7 Tagen hatten die Chondrozyten eine Konfluenz von 90 bis 100 % erreicht. Mittels 0,05%igen Trypsins (mit 0,02 % EDTA) wurden sie vom Flaschenboden abgelöst. Dazu pipettierte man zunächst das FCS-Medium ab, entfernte Medium-Reste mittels Waschung mit PBS und ließ schließlich die Trypsin-Lösung 5 Minuten unter Brutschrankbedingungen auf die Zellen einwirken. Nachdem sich die Zellen abgekugelt und vom Boden der Flasche gelöst hatten (ggf. nach leichtem Klopfen gegen den Flaschenboden), stoppte man die zunehmend zellschädigende Enzymreaktion, indem man FCS-Medium hinzugab. Das gesamte Zellgemisch wurde nun mehrfach resuspendiert und dabei auch gegen den Flaschenboden gespritzt, um restliche, potenziell anheftende Zellen zu lösen bzw. um die noch miteinander verbundenen Zellen in der Suspension zu vereinzeln. Nachfolgend wurde die Zellsuspension zentrifugiert, mit Hanks-Lösung gewaschen und die Zellen ausgezählt wie in Kapitel 4.2.1.1.3 beschrieben.

Nun wurden die Zellen erneut in o.g. Konzentration in Zellkulturflaschen ausgesät. Sobald sie eine Konfluenz von 90 bis 100 % erreicht hatten (nach ca. 7 Tagen) erfolgte die Passage 2.

4.2.1.2 Fibrinkleber

Zur Herstellung der dreidimensionalen Transplantate ist neben dem Trägermaterial eine Grundlage nötig, in die die Zellen eingebettet und fixiert werden können. Das Fibrinogen für die Versuchstiergruppe 1 stellten wir selbst allogen her. Dazu gewannen wir vom hängend ausblutenden Schwein auf einem Schlachthof Blut, nachdem wir die Einstichstelle zuvor erst grob, dann mit 70%igem unvergälltem Ethanol gereinigt hatten. Den Mittelstrahl des Blutes fingen wir mittels eines Trichters in autoklavierten 1 l Glasflaschen (Schott Duran®) auf, in denen sich zur Verhinderung der Blutgerinnung 3,1 g Natrium-Citrat und zur Vermeidung von Verkeimungen 10 ml P/S und 1 ml Gentamicin, gelöst in 100 ml Aqua.dest., befanden. Nach Entnahme wurde die Flasche vorsichtig geschwenkt und anschließend zur weiteren Aufarbeitung mit Kühlelementen gekühlt ins Labor transportiert. Dort wurde das Blut unter der Sterilbank in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen pipettiert und bei Raumtemperatur 11 Minuten ungebremst bei 3490 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand, das Blutplasma, wurde wiederum in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen abpipettiert und bei -80°C für mindestens 3

Stunden eingefroren. Diese Röhrchen wurden daraufhin wieder aufgetaut, was bei 4°C im Kühlschrank geschah. Anschließend wurden Plasma-Röhrchen auf Eis (0°C) zwischengelagert, bevor alle Röhrchen bei 4°C, 3200 × g, 20 Minuten lang gebremst zentrifugiert wurden. Das Halten bei niedriger Umgebungstemperatur ist wichtig, um zu verhindern, dass das entstandene Präzipitat, das Fibrinogen, wieder in Lösung geht. Das nach der Zentrifugation als Bodensatz gewonnene Fibrinogen wurde nach Verflüssigung im 37°C-Wasserbad aus allen Röhrchen eines Schweins gepoolt. So wurden mehrere Chargen Fibrinogens verschiedener Schlachthofschweine hergestellt. Vor der Verwendung des Fibrinogens wurde dieses auf mögliche Auspolymerisation begünstigende Faktoren aus einer Zellsuspension ohne Zugabe von Thrombin getestet. Dazu mischten wir wenige Tropfen des Fibrinogens mit einigen Tropfen einer Zellsuspension, die eine ähnliche Zelldichte besaß wie diejenige beim Transplantatbau (30 Mio./ml). Verwendung fanden später beim Transplantatbau nur solche Chargen, bei denen keine Agglutination oder erst eine nach mehr als 30 Minuten auftrat.

In der Versuchstiergruppe 2 kam ein kommerzieller Zweikomponenten-Fibrinkleber (Tissucol™) zum Einsatz. Eine der beiden Komponenten enthält hauptsächlich Fibrinogen, das aus humanem Plasma hergestellt wird, sowie in kleineren Mengen Plasmafibronectin, Faktor XIII und Plasminogen sowie den Plasmininhibitor Aprotinin (bovin). Die zweite Komponente ist Thrombin. Wir verwendeten das von der Firma Baxter AG, Schweiz, angebotene Lyophilisat (Tissucol Kit), das vor der Anwendung in den mitgelieferten Lösungen rekonstituiert werden musste (139).

4.2.1.3 Transplantatbau

Die wie in Kapitel 4.2.1.1.4 beschriebenen trypsinierten und gezählten Zellen wurden für den Transplantatbau in einer Konzentration von 30 Millionen Zellen pro Milliliter benötigt.

Pro Schwein wurden 36 Transplantate gebaut, von jedem der drei Transplantattypen drei pro Explantationszeitpunkt (Tag 3, 8, 16 und 31) (Abbildung 7). Die homogenisierte Zellen-FCS-Medium-Suspension (Gruppe 1) bzw. Zellen-SS-Medium-Suspension (Gruppe 2) wurde mit Fibrinogen im Verhältnis 3:1 gemischt.

Fasern	+ Fibrin	+ Zellen	$n_a = 3$
Fasern	+ Fibrin		$n_b = 3$
Fibrin	+ Zellen		$n_c = 3$
			<hr style="width: 20%; margin: 0 auto;"/> $\Sigma = n_{a+b+c} \times 4 = 36$

Abbildung 7: Anzahl der herzustellenden Transplantate pro Schwein

4.2.1.3.1 Verwendetes Trägermaterial

Versuchstiergruppe 1:

Als Trägermaterial für 2/3 der zu bauenden Transplantate wurden bioresorbierbare Vicryl-Polydiacanon-Vliese (Ethisorb®) verwendet. Bei 1/3 der Transplantate wurde auf ein strukturiertes Trägermaterial verzichtet. Insgesamt wurden pro Versuchsschwein 36 Transplantate implantiert (Abbildung 11).

a) Trägermaterial + Fibrin + Zellen

200 µl der Zell-FCS-Medium-Schweine-Fibrinogen-Suspension wurde in das Vlies pipettiert und ca. 60 µl Thrombin (1:10 mit PBS verdünnt) beidseits des zellbesiedelten Vlieses aufgetropft. Da das Thrombin nur zur Polymerisation des Fibrinogens dient und nach Füllung des Trägermaterials aufgetragen wird, braucht es nicht zum Gesamtvolumen der Vliese hinzu gerechnet werden. Zur Auspolymerisation wurden die auf diese Weise konstruierten 12 Transplantate mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von ca. 3 mm bei 37° C für 20 Minuten in den Brutschrank gegeben.

b) Fibrin + Zellen

In 12 Vertiefungen einer 96-Well-Platte wurden zunächst 40 µl Thrombin vorgelegt, anschließend 200 µl der Zell-FCS-Medium-Schweine-Fibrinogen-Suspension einpipettiert und auf dieses Gemisch erneut Thrombin aufgetropft. Dieses Zell-Fibrin-Gemisch wurde zum Auspolymerisieren in den Brutschrank bei 37° gestellt. Es entstanden auf diese Weise Transplantate mit einem Durchmesser von 6,5 mm bei einer Höhe von ca. 1,5 mm.

c) Trägermaterial + Fibrin

Es wurde beim Herstellen dieser Transplantate wie unter a) beschrieben verfahren, allerdings ohne Verwendung der Zellsuspension. Es wurden 200 µl Fibrinogen in das Vlies pipettiert.

Versuchstiergruppe 2:

Anstatt der Ethisorb®-Vliese wurden in dieser Versuchsgruppe ca. 100 mg lose gesponnene Kieselgelfasern verwendet, die knäuelartig (in 2 ml-Spritzen über Alkoholdampf gelagert) geliefert wurden.

a) Trägermaterial + Fibrin + Zellen

Um eine ausreichende Desinfektion der Fasern zu gewährleisten, wurden 12 Faserknäuel zunächst mit 70%igem unvergällten Ethanol gespült. Daraufhin war ein mehrmaliges Spülen mit Hanks-Lösung notwendig, um zellschädigende Restalkoholmengen von der Faser zu entfernen. Als nächstes wurden jeweils 60 µl einer 1:2 mit PBS verdünnten Thrombin-Lösung in eine Vertiefung einer 48-Well-Platte gegeben, in die die gewaschenen Fasern gelegt wurden. Mit einer Pinzette wurde das Faserknäuel durch Drücken und Wenden komprimiert. Anschließend wurden zunächst 270 µl des Zell-SS-Medium-humanen-Fibrinogen-Gemisches und darauf 30 µl des Thrombins auf die Fasern pipettiert. Das Konstrukt besaß nun Ausmaße von 11 mm im Durchmesser bei einer Höhe von ca. 4 mm (Abbildung 8).

b) Fibrin + Zellen

In ähnlicher Weise wie in der Versuchstiergruppe 1 wurde bei den 12 Transplantaten dieses Typs verfahren. Hierfür waren 240 µl der Zell-Fibrinogen-Suspension nötig, um eine Konstrukt-Höhe von ca. 2 mm zu erzielen.

c) Trägermaterial + Fibrin

Es wurde entsprechend Punkt 1c) bzw. 2a) verfahren.



Abbildung 8: In einer 48-Well-Platte konstruierte Kieselgelfasertransplantate (links), Vorkultivierung in einer 6-Well-Platte (rechts)

4.2.1.4 Vorkultivierung

Eine mehrtägige Vorkultivierung der Transplantate im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ wurde der Implantation vorangestellt, um die Zellen an neue Bedingungen im dreidimensionalen Raum unter sonst unveränderten Kulturbedingungen zu gewöhnen. Dadurch sollten die durch die Monolayer-Kultur dedifferenzierten Chondrozyten zu einer Redifferenzierung gebracht werden.

Versuchstiergruppe 1:

Die auspolymerisierten Ethisorb®-Transplantate wurden nun in jeweils eine Vertiefung der 6-Well-Platte überführt und mit 5 ml des FCS-Hams F12-Kulturmediums bedeckt. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Kulturmedium komplett ausgewechselt und eine mikroskopische Kontrolle auf potenziellen Zerfall der Konstrukte durch den Abbau des Fibrins, auf das Auswandern von Chondrozyten und auf eine unerwünschte Verkeimung des Transplantats vorgenommen (Abbildung 9).

10 bis 13 Tage dauerte bei dieser Versuchsgruppe die Vorkultivierung, bevor die Transplantate implantiert wurden.



Abbildung 9: Zellbesiedeltes Ethisorb®-Transplantat, 100fache Vergrößerung

Versuchstiergruppe 2:

Bei dieser Gruppe wurde als Kulturmedium SS-Hams F12-Medium verwendet, um eine verstärkte Redifferenzierung der Chondrozyten durch die Zugabe von allogenem Serum zu provozieren. Zusätzlich wurde Aprotinin (Trasylol®) in einer Konzentration von 1000 I.E./ml zugesetzt, um die Lyse des Fibrins und somit einen vorzeitigen Zerfall des Konstruktes mit Auswandern der Zellen zu verhindern. Um die von den Chondrozyten selbst produzierten Wachstumsfaktoren und Metabolite nicht vollständig zu entfernen, wurde nach zwei bis drei Tagen lediglich die Hälfte des Kulturmediums ausgetauscht (2,5 ml). Die Vorkultur dauerte hier lediglich 3 bis 5 Tage.

4.2.1.5 Sterilkontrollen

Einen Tag vor der Implantation wurde aus jeder Plattenvertiefung eine Mediumprobe entnommen, um jedes Transplantat auf Sterilität zu überprüfen. Es wurde jeweils ca. 100 µl in ein Reagenzglas mit einem nicht selektiven Nährmedium gegeben. Zum Einsatz kamen 10 ml einer Thioglykolat-Bouillon zum Nachweis vorwiegend anaerober Keime und Pilze und 5 ml einer Brain-Heart-Bouillon zum Aerobier-Nachweis. Die Sterilkontrollen wurden bei 37°C im Wärmebrutschrank inkubiert. Am Tag der Implantation wurde jedes Reagenz beurteilt und eine Ja/Nein-Bewertung vorgenommen. Es sollten lediglich diejenigen Transplantate implantiert werden, deren mikrobiologische Tests negativ ausfielen. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden die Proben weiterhin regelmäßig auf mikrobiologisches Wachstum überprüft. Negative Probe wurden im Implantationsprotokoll vermerkt.

4.2.1.6 Implantation der Transplantate

Nach einer Vorinkubation von 10 bis 13 Tagen (Gruppe 1) bzw. 3 bis 5 Tagen (Gruppe 2) wurden die Transplantate in ihrem Medium in den Operationssaal transportiert. Nach Ablegen des Schweins und der Vorbereitung des Operationsfeldes (laterale Thorakalwand caudal der Skapula bis zur letzten Rippe) nach üblichen chirurgischen Kautelen wurden je Körperseite 18 ca. 2 cm lange, senkrecht verlaufende Schnittinzisionen mit einem Abstand von ca. 3 cm zueinander gesetzt. Nach Präparationen subkutaner Taschen nach kranial wurde je Tasche ein Transplantat eingesetzt und ca. 1 Zentimeter vorgeschoben. Der Wundverschluss erfolgte mit 2 bis 3 Hautheften mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Ethilon®) (Abbildung 10). Die Implantationslokalisationen der verschiedenen Transplantattypen für die Versuchstiergruppe 1 ist dem Schema in der Abbildung 11 zu entnehmen. In Dreiergruppen je Explantationszeitpunkt wurden die Konstrukte eingesetzt: 3 mal Fasern + Fibrin + Zellen, 3 mal Fasern + Fibrin und 3 mal Fibrin + Zellen. Bei den Tieren der Versuchstiergruppe 2 wurden die Implantationslokalisationen pro Entnahmezeitpunkt randomisiert, um einen potenziellen Ortseffekt auszuschließen (ohne Abbildung).

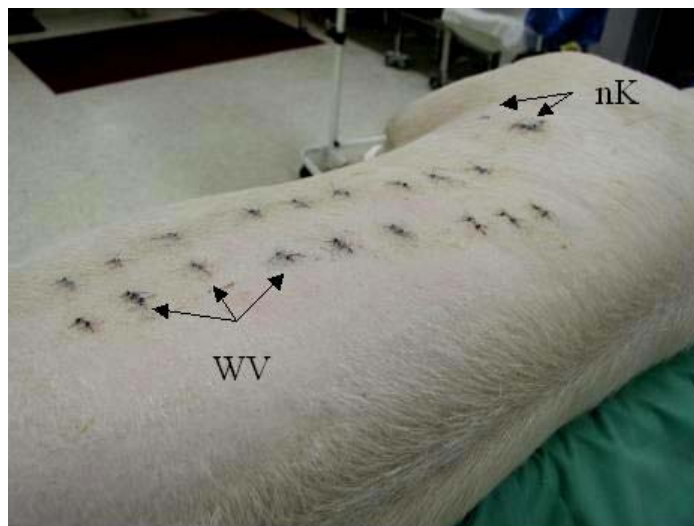


Abbildung 10: WV: Wundverschlüsse nach Einbringen der Implantate, nK: Implantationslokalisation für nativen Knorpel im Schulterblattbereich.

Rechte Körperseite ← kranial				Linke Körperseite kranial ⇒			
(Ohrbasis)	(Schulter)					(Schulter)	(Ohrbasis)
η (Tag 0)	η (Tag 0)					η (Tag 0)	η (Tag 0)
η (Tag 31)	η (Tag 31)					η (Tag 31)	η (Tag 31)
α α α	β β β	γγγ	Tag 3	Tag 8	γγγ	β β β	α α α
α α α	β β β	γγγ	Tag 16	Tag 31	γγγ	β β β	α α α

Abbildung 11: Schema der implantierten Transplantate, Versuchstiergruppe 1

α = Vliesmaterial + Fibrinkleber + Chondrozyten

β = Vliesmaterial + Fibrinkleber

γ = Fibrinkleber + Chondrozyten

η = natives Knorpelstück, je eins an der Ohrbasis und Schulter, am 0. und am 31. Tag zu explantieren

4.2.1.7 Heterotrope Transplantation

Um zu untersuchen, ob es einen Effekt auf die Lokalisation des Knorpels im Tier gibt, wurden jeweils vier ca. 1 cm² große native Knorpelstückchen während der Ablatio auris präpariert. Sofort im Anschluss wurden zwei im Bereich der Ohrbasis und zwei im Schulterbereich reimplantiert. An zwei unterschiedlichen Zeitpunkten sollten sie wieder entnommen und histologisch untersucht werden: Am Tag der Transplantatimplantation (Tag 0) und am Tag der Euthanasie (Tag 31). Die Verweilzeiten im Schwein richteten sich nach der Kultivierungsdauer der Zellen und der Vorkulturzeit. Demnach lag der erste Explantationszeitpunkt in der Tierversuchsgruppe 1 (Schwein 1 bis 3) bei ca. 4 Wochen und in der Tierversuchsgruppe 2 (Schwein 4 bis 6) zwischen 20 und 49 Tagen. Der 2. Entnahmezeitpunkt lag 30 bzw. 31 Tage später. Bei Schwein 4 musste auch das zweite Ohr abgenommen werden, da bei der *in vitro* Amplifizierung der Chondrozyten des ersten Ohres eine Zellkulturverkeimung auftrat. Deshalb erfolgte bei diesem Tier die erste Explantation der nativen Knorpelstückchen nach 49 Tagen und die zweiten nach 70 Tagen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verweilzeiten der an die Ohrbasis und Schulter heterotrop transplantierten Knorpelstückchen im Tier

	Schwein 1 (Gruppe 1)	Schwein 2 (Gruppe 1)	Schwein 3 (Gruppe 1)	Schwein 4 (Gruppe 2)	Schwein 5 (Gruppe 2)	Schwein 6 (Gruppe 2)
Explantations- Zeitpunkt 1 nach ... Tagen in vivo	27	28	27	49	22	20
Explantations- Zeitpunkt 2 nach ... Tagen in vivo	58	59	57	70	53	51

4.2.1.8 Immunmodulation zur Transplantatprotektion

Um eine Transplantatprotektion zu bewirken, wurde eine Immunmodulation durch den Einsatz von Glukokortikoiden vorgenommen. Dazu wurde je Versuchstiergruppe ein Tier systemisch und ein Tier lokal mit Cortison behandelt. Je ein Schwein pro Gruppe blieb als Kontrolltier unbehandelt. In Versuchstiergruppe 1 (Schwein 2, Tabelle 13) begann man am Tag der Transplantat-Implantation mit einer intravenösen Prednisolon-Applikation von 1,0 mg/kg KGW (Solu-Decortin® 50 mg). In den folgenden Tagen erhielt das Tier eine 1,0 mg Prednison-Dosis (Decortin®) morgens über das Futter. Nach 5 Tagen wurde die Dosis reduziert auf 0,9 mg/kg KGW, nach Ablauf von 14 Tagen auf 0,75 mg, vom 19. bis 22. Tag lag die Dosis bei 0,5 mg, vom 23. bis 26. bei 0,25 mg und abschließend bis zum letzten Explantationszeitpunkt mit nachfolgender Euthanasie am 31.Tag lag die verabreichte Dosis bei 0,1 mg/kg KGW. Die *per os* - Applikation bei Schwein 5 (Versuchstiergruppe 2, Tabelle 14) begann schon zwei Tage *prae implantationem*. Während der gesamten Implantationszeit wurde in dieser Tiergruppe die Dosierung von 1,0–1,1 mg Prednison pro kg KGW aufrecht erhalten. Die lokalen Cortison-Applikationen bei den Schweinen 3 und 6 erfolgte in der Weise, dass die Transplantate unmittelbar vor Implantation in eine Triamcinolon-Lösung (Volon A 10®) (0,5 mg/ml) getaucht wurden.

Eine mechanische Hürde für die Immunzellen sollte eine Hülle aus Fibrin darstellen, die zudem vor dem Einbringen diese Transplantate gebildet wurde. Dazu wurde jedes Konstrukt zweimal zunächst in einigen Tropfen Thrombin (1:10 verdünnt), anschließend in etwas Fibrinogen gewendet. Einige Transplantate wurden noch dicker umhüllt. Nach der Auspolymerisation wurde jedes Transplantat in die jeweils präparierte Hauttasche geschoben.

Während der gesamten Implantationsphase standen alle Tiere unter antibiotischem Schutz. Bis Tag 5 nach Implantation wirkten die zu den Zeitpunkten der Implantation und an den Tag-3-Explantationen applizierten Wirkstoffmengen des Oxytetracyklins (Terramycin/LA®, 20 mg/KGW). Ab Tag 6 bis zur Euthanasie an Tag 30 bzw. 31 bekamen die Schweine einmal täglich Phenoxymethylpenicillin *per oral* (Penicillin-Heyl oral 1 Mega®, 1770 mg/Tier).

4.2.1.9 Explantationen

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je drei Transplantattypen entnommen. Dazu gehörten Vliesmaterial mit in Fibrinkleber aufgenommenen Chondrozyten (α), Vliesmaterial, das mit Fibrinogen und Thrombin getränkt wurde (β) und ein Konstrukt, das aus Fibrinkleber und Ohrknorpelzellen bestand, ohne dass ein Fasergerüst zum Einsatz kam (γ) (Abbildung 11). Die Tiere wurden wie in den vorausgegangenen Operationen abgelegt und entsprechend wurde die Operationsfläche vorbereitet. Die Hauthefte wurden geöffnet und die Transplantate vorsichtig entnommen. Nach photodigitaler und handschriftlicher Dokumentation der Explantationsbefunde wurde jedes Transplantat zerteilt. Die Hälfte wurde in 10%igem gepuffertem Formalin fixiert. Etwa ein Fünftel des Explantats wurde in TissueTek® eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das übrige Stückchen wurde unbehandelt in ein 1 ml Reaktionsgefäß gegeben, ebenso schockgefroren und nachfolgend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.2.1.9.1 Explantationszeitpunkte

Um zu untersuchen, welche Reaktionen im Spenderorganismus in der frühen Phase nach Implantation der Chondrozytenkonstrukte ablaufen, wurden am 3. Tag die ersten 9 Transplantate explantiert. Am Tag 8, 16 und 31 wurden die nächsten Explantationen vorgenommen.

Die nativen Knorpelstückchen wurden zum Zeitpunkt der Transplantat-Implantation und am Tag 31 nach Implantation entnommen. So waren diese 3 bis 4 bzw. 7 bis 8 Wochen im Tier.

4.2.1.10 Blutentnahme

Vor jedem chirurgischen Eingriff wurde bei jedem narkotisierten Tier in Rückenlage aus der V. jugularis Blut entnommen. Natives Blut wurde nach Ablauf von ca. 30 Minuten bis 2 Stunden für zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, das Serum wurde in 1,0 ml

Reaktionsgefäßen abgefüllt, bis zum Abschluss der operativen Sitzung bei 4°C und danach bei -20°C gelagert bis zur Bestimmung der Serumelektrolyte und des Glukosewertes. Zusätzlich wurde mittels einer Monovette® Blut entnommen, aus dem innerhalb weniger Minuten nach Entnahme Blutausrich für die Erstellung eines Differentialblutbildes angefertigt wurden. Im Anschluss an die Operation, d.h. ca. drei bis fünf Stunden später, wurde die Leukozytenzahl bestimmt.

4.2.1.11 Histologie

Nach Explantation der Transplantate wurden die Proben wie in Kapitel 4.2.1.9 beschrieben geteilt und für die histologischen Untersuchung konserviert. Die von der Versuchstiergruppe 1 gewonnenen, formalinfixierten Explantate wurden in Paraffin eingebettet und mittels eines Microtoms in einer Dicke von 2 µm geschnitten. Die Explantate der Versuchstiergruppe 2 ließen sich nicht in Paraffin einbetten, da durch die Alkoholreihe zur Entwässerung im Rahmen des Einbettvorgangs das chemische Gleichgewicht der Fasern gestört wurde und die Fasern eine glasartige Konsistenz annahmen, die es unmöglich machte, die Präparate zu schneiden. Hier kamen die in TissuTek® eingebetteten und nachfolgend bei -80°C gelagerten Proben zur Verwendung. Mit einem Kryotom wurden Schnitte in einer Dicke von 8 µm angefertigt. Bis zur Färbung wurden die Schnitte weiter bei -80° C gelagert.

a) Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung aller formalinfixierten, paraffineingebetteten Präparate aus der Versuchstiergruppe 1 erfolgte mit einem Färbeautomaten (Varistain). Das Eindeckeln geschah mit einem Deckelautomaten Tissue-Tek® SCA.

Für die Färbungen der Versuchstiergruppe 2 wurden die kryokonservierten Proben verwendet, da sich die Explantatstücke nicht in Paraffin einbetten ließen. Die Proben wurden am Kryostaten geschnitten. Die Färbung erfolgte nach einem Schnellschnitt-Protokoll (nach Harris). Zunächst ließ man den bei Raumtemperatur aufgetauten Schnitt 10 Sekunden lang in Aceton stehen, spülte ihn kurz mit Leitungswasser und färbte ihn eine Minute lang mit Hämalaun nach Harris. Nachfolgend bläute man mit handwarmem Leitungswasser für mindestens eine weitere Minute. Danach wurde der Objektträger zunächst für 15 bis 20 Sekunden in Eosin gestellt und anschließend drei mal für ca. 10 Sekunden in Aceton. Dabei wurde der Objektträger so lange mehrmals hochgezogen, bis das Aceton farblos ablief. Ebenso

wurde mit Xylol verfahren. Mittels Corbit wurde abschließend das Präparat eingedeckelt.

Bei der Beurteilung der Schnittpräparate wurden die sich darstellenden Phänomene in Grade eingeteilt. Die Skala reichte von ‚geringgradig‘ (Grad 1) bis ‚hochgradig‘ (Grad 3), wobei auch Abstufungen zwischen den Graden möglich ist.

b) Zusatzfärbungen

In Ergänzung zu der Übersichtsfärbung (HE) wurden Zusatzfärbungen durchgeführt, um die Zell- und Gewebetypen näher zu charakterisieren. Bei diesen Färbungen handelte es sich um die Elastika-Färbung (Resorcinfuchsin-Kernechrot) zum Nachweis elastischer Fasern und um die Alcianblau-Färbung, um die für Knorpelgewebe charakteristischen Glykosaminoglykane und Proteoglykane nachzuweisen.

4.2.2 In vitro Untersuchungen

4.2.2.1 Auswirkungen von Fetalem Kälberserum beziehungsweise von Schweineserum auf die Chondrozyten in vitro

Einem Schlachtschwein wurde eine Ohrmuschel entnommen, die nachfolgend gesäubert und mit Braunol® desinfiziert wurde. Die Ohrknorpelfreilegung, Zerkleinerung und die nachfolgende enzymatische Isolierung der Zellen sowie die Amplifizierung erfolgte wie in den Kapiteln 4.2.1.1.2 bis 4.2.1.1.4 beschrieben.

Nachdem nach der 2. Passage die Zahl der vitalen Zellen nach der Neubauer-Zählkammer-Methode bestimmt worden war, wurden die Zellen in einer Dichte von 0,57 Millionen Zellen pro 25 cm² – Zellkulturflasche ausgesät und im Brutschrank mit 5% CO₂-Begasung bei 37°C inkubiert. Jeden 2. bis 3. Tag wurde das Zellwachstum mikroskopisch auf Adhärenz und Wachstum kontrolliert und ein Mediumwechsel vorgenommen.

Während der Amplifizierung der auf diese Weise gewonnenen Zellen kamen RPMI-Medien (supplementiert mit 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) mit verschiedenen Serumzusätzen (10%ig) zum Einsatz. Es wurde eine Einteilung in vier Kultivierungsansätze vorgenommen. Im ersten Ansatz erfolgte eine Amplifizierung der Chondrozyten während des ganzen Beobachtungszeitraumes mit FCS. Im zweiten Ansatz begann die Kultivierung mit FCS und nach der 2. Passage wurde auf adultes Schweineserum als Mediumzusatz umgestellt. Im dritten Ansatz säte man die Zellen in FCS-RPMI aus, und ab dem 2. Kulturtag wurde das

FCS durch Schweineserum ersetzt. Im vierten Ansatz wurden die Zellen ausschließlich mit Schweineserum vermehrt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht der *in vitro* Untersuchung zum Einflusses von Fetalem Kälberserum (FCS) und adultem Schweineserum (SS) auf die Monolayerkultivierung von porcinen Ohrchondrocyten

	<i>Ansatz I</i>	<i>Ansatz II</i>	<i>Ansatz III</i>	<i>Ansatz IV</i>
Aussaat	FCS	FCS	FCS	SS
1. Medium- wechsel	FCS	FCS	SS	SS
1. Passage	FCS	FCS	SS	SS
2. Passage	FCS	SS	SS	SS

Sobald die Chondrozyten in dem ausschließlich mit FCS amplifizierten Ansatz eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten, wurden die Zellen aller Serumansätze mittels 0,05 %igem Trypsin (mit 0,02 % EDTA) vom Flaschenboden abgelöst, ausgezählt und der Vermehrungsfaktor bestimmt. Anschließend wurden die Zellen erneut in oben genannter Konzentration in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach erneuten Erreichen einer Konfluenz von 90 bis 100 % im FCS-Ansatz, passagierte man die Zellen ein zweites Mal und säte sie erneut in oben genannter Konzentration aus. Schließlich wurde bei entsprechender Konfluenzerreichung ein letztes Mal passagiert und abschließend die Zellzahl bestimmt.

4.2.2.2 Entwicklung *in vitro* kultivierter Transplantate (mit/ohne Kieselgelfasern) besiedelt mit Chondrozyten aus verschiedenen Passagen (Methode Versuchstiergruppe 2)

Es wurden Ohrchondrozyten von einem Schlachtschwein gewonnen. Nach Grobreinigung, Desinfizierung und Freipräparierung des Knorpels wurden die Zellen enzymatisch isoliert und amplifiziert wie in den Kapiteln 4.2.1.1.2 bis 4.2.1.1.4 beschrieben. Unmittelbar nach der Zellisolation (Passage 0), sowie nach der 1., 2., 3. und 4. Passage wurden jeweils Transplantate gebaut aus den drei Komponenten Chondrozyten, Kieselgelfasern und Fibrinkleber beziehungsweise den zwei Anteilen Chondrozyten und Fibrinkleber, ohne ein weiteres Trägergerüst zu verwenden. Die Methodik wurde ausführlich in Kapitel 4.2.1.3 [(Versuchstiergruppe 2, a) Trägermaterial + Fibrin + Zellen und b) Fibrin + Zellen)] erläutert.

Die im Anschluss im Brutschrank auspolymerisierten Vliese wurden nachfolgend jeweils in eine Vertiefung einer 6-Well-Patte gegeben. Hinzu gab man 5 ml des SS-Hams F12-Kulturmediums. Zusätzlich wurde Aprotinin (Trasylol®) in einer Konzentration von 1000 I.E./ml hinzugegeben, um die Lyse des Fibrins und somit einen vorzeitigen Zerfall des Konstruktes mit Auswandern der Zellen zu verhindern. Um die von den Chondrozyten selbst produzierten Wachstumsfaktoren und Metabolite nicht vollständig zu entfernen, wurde nach zwei bis drei Tagen lediglich die Hälfte des Kulturmediums ausgetauscht (2,5 ml). Die *in vitro* Kultivierung der zellbesiedelten Vliese erfolgte über mehrere Wochen. Jeweils am Tag des Transplantatbaus (Woche 0), nach der 1., 2., 4. und 8. Kultivierungswoche wurden die Konstrukte zweigeteilt und in 10% gepuffertem Formalin und in TissueTek™ für die -80°C – Lagerung konserviert .

4.2.2.3. *In vitro* Kultivierung verschiedener Transplantate

Parallel zu den in das Schwein implantierten Vliesen wurden einige Transplantate *in vitro* weiter kultiviert wie unter 4.2.1.4 beschrieben und zu einem bestimmten Zeitpunkt für histologische Untersuchungen konserviert. Es wurden Transplantate über 1 Tag, 16 Tage, 3 Monate und über 10 Monate *in vitro* kultiviert.