

5. Ergebnisse

5.1 In vivo Untersuchungen

5.1.1 Isolierte Chondrozyten

Vor der Zerkleinerung des Gewebes wurde das Knorpelgewicht bestimmt. Dabei wurde die Menge des Knorpels zufällig bestimmt, d.h. es wurde in keinem Fall ein Schweineohr komplett enzymatisch verdaut. Im Durchschnitt wurde eine Chondrozytenzahl von 32,4 Millionen pro Gramm Knorpel ermittelt.

Tabelle 5: Zahlen der isolierten Chondrozyten in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Schweins und vom Gewicht des präparierten Knorpels

| | KGW bei Ablatio auris [kg] | Knorpelgewicht [g] | Isolierte vitale Chondrozyten [x 10⁶] | Zellzahl pro Gramm Knorpel [x 10⁶] | Vitalität [%] |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|--|----------------------|
| Schwein 1 | 54,5 | - | 258,4 | - | 99,0 |
| Schwein 2 | 47,3 | 11,4 | 292,6 | 25,7 | 99,4 |
| Schwein 3 | 47,4 | 14,3 | 293,26 | 20,5 | 96,9 |
| Schwein 4 | 1.) 42,2 | 1.) 8,1 | 283,79 | 35,0 | 99,2 |
| | 2.) 53,0 | 2.) 5,6 | 94,73 | 16,9 | 89,9 |
| Schwein 5 | 32,5 | 8,6 | 548,4 | 63,8 | 97,5 |
| Schwein 6 | 43,0 | 8,9 | 128,33 – entspricht nur einem Teil des verdauten Knorpels | - | 93,0 |

5.1.2 Fibrinogen

Der Fibrinogen-Gehalt wurde exemplarisch in vier allogenen Proben bestimmt. Die Werte lagen 2x bei 15,0 g/l, ferner bei 21,3 g/l und bei 20,6 g/l. Der ebenfalls zur Kontrolle mit untersuchte Überstand aus der Zentrifugation enthielt ca. 1,7 g/l Fibrinogen.

5.1.3 Sterilkontrollen

Keines der Transplantat – Kulturmedium - Ansätze zeigte in dem 10tägigen Beobachtungszeitraum eine mikrobiologische Besiedlung.

5.1.4 Explantationen

5.1.4.1 Makroskopie

Bei allen Transplantaten waren Hauterhabenheiten in den Bereichen der Implantationslokalisation erkennbar, die um so größer waren, je dicker das implantierte Transplantat war. Bei den Explantationen waren die auftretenden Blutungen von Explantations-Zeitpunkt zu Explantations-Zeitpunkt zunehmend schwächer.

Versuchstiergruppe 1

In allen explantierten Ethisorb® enthaltenden Transplantaten waren zu jedem Zeitpunkt Fasern mit bloßem Auge erkennbar. Die Faserstruktur war auch bei Zerteilung mit dem Skalpell erfühlbar. Mit fortgeschrittenem Explantationszeitpunkt waren einerseits die Konstrukte zunehmend fester in das umgebende subkutane Gewebe integriert und andererseits die Polylaktid-Polyglykolid-Strukturen zunehmend in Auflösung begriffen. Zu frühen Explantationszeitpunkten stellten sich die Explantate rötlich dar. Die Konsistenz der Transplantate war weich-elastisch.

Die Chondrozyten enthaltenden, ursprünglich schon sehr kleinen Fibrinkleberkonstrukte waren makroskopisch nicht zweifelsfrei auszumachen. Teilweise waren diffus rötlich-weiß-gräuliche Areale zu erkennen. Daher wurde jeweils Verdachtsgewebe entnommen, das nachfolgend histologisch auf Transplantat enthaltende Bestandteile wie Fibrin und Zellen sowie Entzündungszellen hin untersucht wurde.

Schwein 1, Kontrolltier:

Bei einigen der gräulich-weißlichen Faser-Explantaten war im Zentrum des Anschnitts eine rote Linie erkennbar (Tag 8, Tag 16) (Abbildung 12). Am 31. Tag erschienen die faserenthaltenden Konstrukte gelblich-bräunlich) (Abbildung 13).

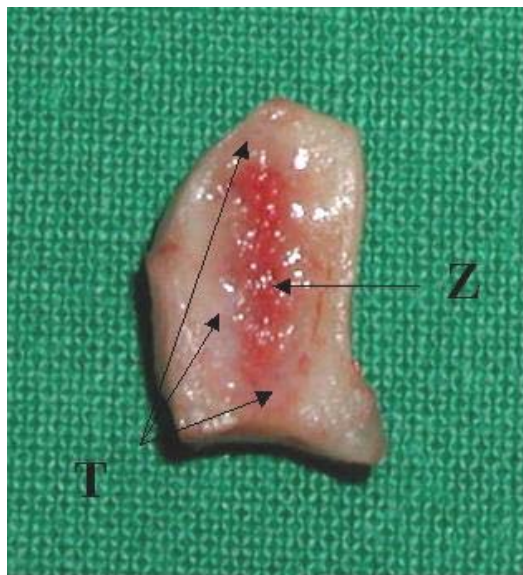


Abbildung 12: Schwein 1, Explantat Tag 8; Ethisorb®-Fasern und Fibrinkleber; T: Transplantat, Z: rötliches Zentrum

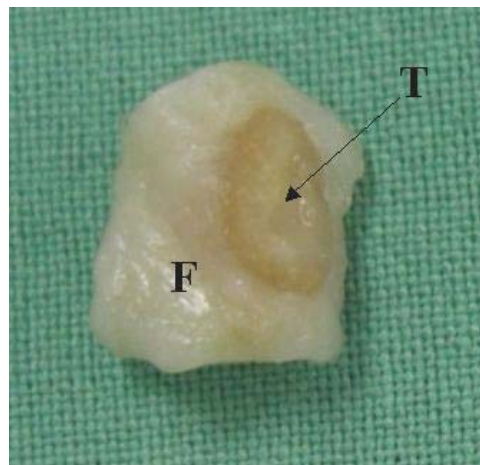


Abbildung 13: Schwein 1, Explantat Tag 31; Ethisorb®-Fasern und Fibrinkleber; T: Transplantat, F: Fettgewebe

Schwein 2, Cortison systemisch:

Über die verschiedenen Explantationszeitpunkte erschienen die Faser-Konstrukte hellgraubräunlich mit zum Teil rötlichem Zentrum (in Linienform). Ein Transplantat der Untergruppe Fasern + Fibrin + Chondrozyten wies am Tag 31 eine Größe von ca. 0,4 mm im Durchmesser auf (Abbildung 14). Ein ähnliches Bild bot sich zu gleichem Zeitpunkt wie bei dem Konstrukt ohne Chondrozyten (Abbildung 15).

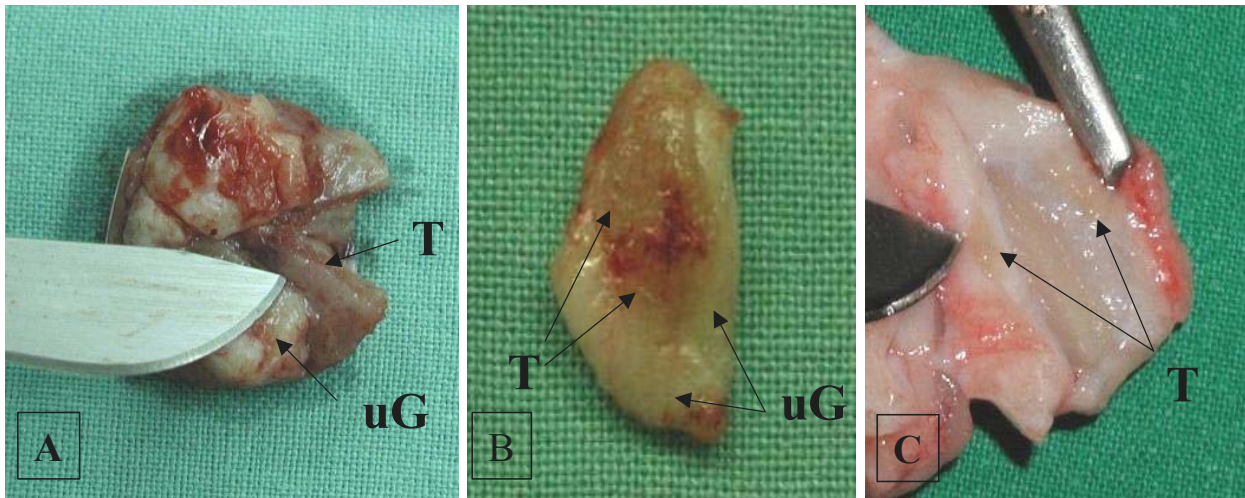


Abbildung 14, A bis C: Schwein 2, Ethisorb®-Fasern, Fibrinkleber und Chondrozyten; A: Tag 3; B: Tag 8; C: Tag 31; T: Transplantat, uG: umgebendes Gewebe

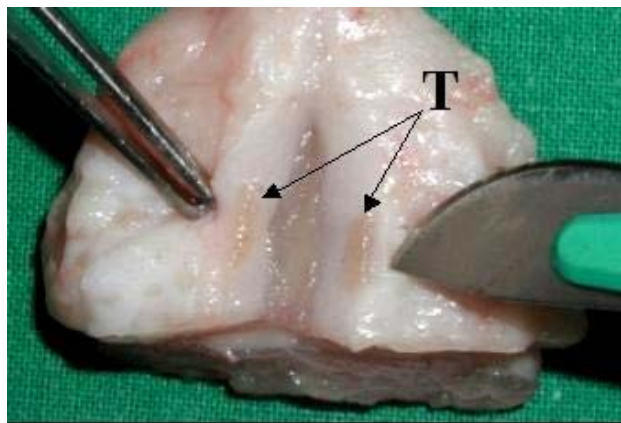


Abbildung 15: Schwein 2, Explantat Tag 31; Ethisorb®-Fasern und Fibrinkleber; T: Transplantat

Schwein 3, Cortison lokal:

Hauterhabenheiten im Bereich der Implantationsstellen fielen bei diesem Tier nur minimal auf. Transplantat und seine unmittelbare Peripherie konnten nicht in allen Fällen am Tag 3 in toto entnommen werden. Das Transplantat war nicht fest in seine Umgebung verklebt, was jedoch am Tag 8 der Fall war. Bis Tag 31 waren die in Originalgröße zu explantierenden Konstrukte gräulich-gelblich (Abbildung 16) mit am Tag 16 punktförmigen rötlichen Bezirken.

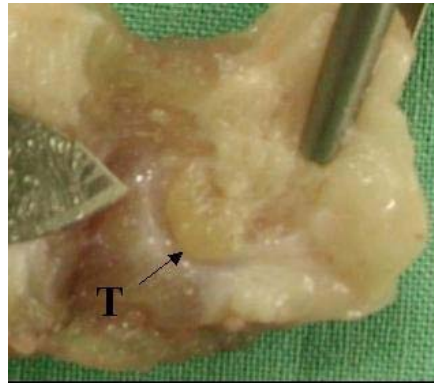


Abbildung 16: Schwein 3, Explantat Tag 30; Ethisorb®- Fasern, Fibrinkleber und Chondrozyten; T: Transplantat

Versuchstiergruppe 2

Hauterhabenheiten traten über den Implantationslokalisationen geringgradig in Abhängigkeit davon auf, wie groß das zu implantierende Konstrukt mit seiner Fibrinhülle war. Bei den Kieselgelfaser-Transplantaten waren zu jedem Explantationszeitpunkt jeweils Faserstrukturen erkennbar. Sie knirschten leicht beim Zerschneiden. Bei den meisten Transplantaten hatten sich um jedes Konstrukt bis zum Tag 31 eine Kapsel gebildet, deren Dicke je nach eingebrachtem Konstrukttyp und Cortisonverabreichung variierte (Tabelle 6). Dabei war es unerheblich, ob die Transplantate vor Implantation eine dicke oder sehr dicke Fibrinhülle erhalten hatten. Das Auffinden der Fibrin-Zell-Transplantate fiel in dieser Gruppe aufgrund ihres größeren Durchmessers leichter.

Schwein 4, Kontrolltier:

Am 3. Tag nach Implantation erschienen die Fasern enthaltenden Konstrukte rötlich und waren von fest-elastischer Konsistenz. Es konnten sehr weiche, grau-weißliche Fibrin-Zell-Transplantate explantiert werden, die in ihrem Durchmesser etwas kleiner waren als zum Zeitpunkt der Implantation. Nach 8 Tagen war die Färbung der Faserkonstrukte teils rötlich, teils gräulich-weißlich und die Beschaffenheit weich-elastisch bei den Fasern-Fibrin-Zell-Transplantaten und fest-elastisch bei denen, die keine Zellen enthielten. Erstere waren gut in das umgebende Gewebe integriert, letztere nur mäßig. Die faserfreien Gebilde waren unverändert in ihrer Erscheinungsform und relativ gut mit ihrem umgebenden Gewebe verklebt. Am 16. Explantationstag erschienen die Fasern-Fibrin-Zell-Transplantate weniger

gefärbt, es war eine gräulich-weiße Kapsel einer Stärke von ca. 2-7 mm peripher auszumachen, die bei den Transplantaten ohne Zellen ca. 2 mm dick war. Die faserfreien Gebilde zeigten eine ca. 1 mm dicke Kapsel. Am letzten Tag *in vivo* stellten sich die Transplantate wie folgt dar: Alle Fasern, Fibrinkleber und Zellen beinhaltende Konstrukte wiesen eine Kapsel auf, die bis 7 mm dick war. Der Inhalt bestand aus einer weißlich-gelblichen sämigen Masse, die makroskopisch erkennbar von Fasern durchsetzt war. Diese erschienen peripher stärker zersetzt als im Zentrum. Die fest-elastischen weißlichen zellfreien Faserkonstrukte waren umhüllt von einer ca. 1 mm dicken rötlichen Hülle. Die faserfreien Gebilde waren nicht zweifelsfrei auszumachen. Es wurden Gewebeproben von Verdachtslokalisationen entnommen.

Schwein 5, Cortison systemisch:

Alle drei Gebildetypen wiesen am 3. Tag einen gräulichen Saum auf, der bis zu 3 mm dick war. Die weich-elastischen bis festen Fasertransplantate waren von gräulich-roter Farbe, die Fibrin-Zell-Konstrukte stellten sich gräulich-gelblich dar. Die Integration in die Umgebung war jeweils mäßig bis gut. Am 8. Tag war eine deutliche Kapselbildung auszumachen um die sich nicht wesentlich anders darstellenden Faser-Transplantate. Bei den Faser-Zell-Konstrukten war sie 4 bis 7 mm dick und von 2 mm Stärke bei den zellfreien Fasertransplantaten. Bei den Fibrin-Zell-Gebilden war makroskopisch keine Kapsel zu erkennen. Am 16. (Abbildung 17) und 31. Tag waren die Kapseln jeweils etwas dünner (zunächst 3 bis 4 bzw. 2 bis 3 mm, dann 2 bis 3 bzw. 1 bis 2 mm, Abbildung 18) mit zäher Sekretbildung bei allen Transplantaten, die Fasern, Fibrinkleber und gegebenenfalls Chondrozyten enthielten. Nur bei einem zelllosen Faser-Konstrukt kam es je Zeitpunkt zu einer abszessähnlichen Ausbildung, die sich wie oben beschrieben darstellte. Am Tag 8 waren in den Bereichen, wo die Fibrin-Zell-Transplantate implantiert worden waren, weich-elastische, gräuliche Strukturen auszumachen, die in einem Fall auch eine Kapselbildung vermuten ließen. Am 16. Tag waren bei diesem Transplantattyp ca. 1 cm lange und ca. 1,5 mm weißliche Stränge erkennbar, die in ihrer Konsistenz fester waren als die sie umgebende Muskulatur bzw. das subkutane Fettgewebe. Lediglich Verdachtsgewebe wurde am letzten Tag entnommen.

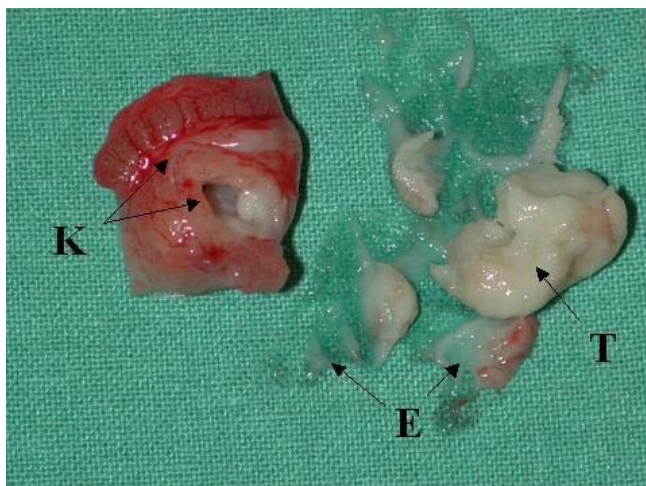


Abbildung 17: Schwein 5, Explantat Tag 16; Kieselgelfasern und Fibrinkleber; T: Transplantat; K: Kapsel, E: eiterähnliche, zähe, weißliche Masse

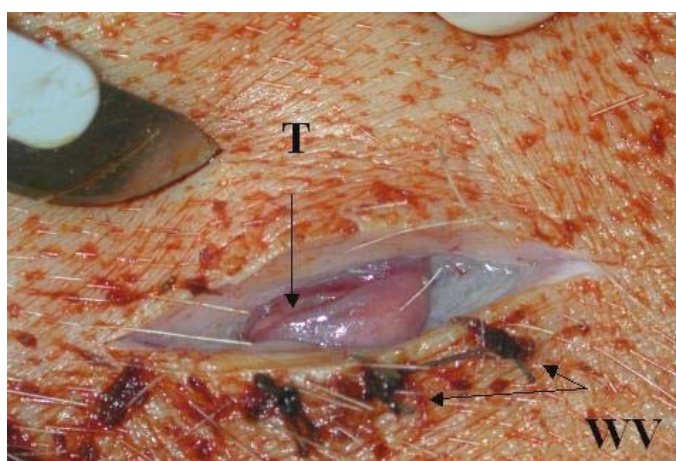


Abbildung 18: Schwein 5, Tag 31 *in situ*. Kieselgelfaser-Transplantat (T), umgeben von angeschnittener feiner, dunkelroter Kapsel; Wundverschluss-Knopfhefte von der Implantation (WV)

Schwein 6, Cortison lokal:

Am ersten Explantationszeitpunkt (Tag 3) waren alle Transplantate in Originalgröße aufzufinden und relativ fest mit dem sie umgebenden Gewebe verklebt. Bei den meisten Konstrukten war ein feiner peripherer Saum erkennbar. Diejenigen, die Fasern enthielten, waren rot, die anderen stellten sich gräulich dar. Die Dicke der gräulichen Kapsel betrug am 8. Tag 3 bis 5 mm bei den rot-gräulichen Fasern-Fibrin-Zell-Konstrukten und 2 bis 3 mm bei denen ohne Zellen. Die Konstrukte ohne Fasermaterial erschienen gräulich, mit punkt- bzw. strichförmigem Zentrum. Am Tag 16 war die Kapsel bei allen faserbeinhaltenden Gebilden 1,5 bis 2 mm dick und enthielt ein weich-elastisches, hellrotes Transplantat. Im Bereich der

5. Ergebnisse

Implantationen der Fibrin-Zell-Konstrukte waren am 16. und auch am letzten Explantationstag (Tag 31) gräulich-gelbliche bzw. weißliche Strukturen am Übergang zwischen Muskulatur- und Fettgeweben auszumachen (weichelastisches Gebilde in einer Größe von ca. 1 x 2 x 10 mm in weichem Umgebungsgewebe liegend, Abbildung 21). Am 31. Tag zeigten die Fasern-Fibrin-Zell-Gebilde eine 1 bis 4 mm dicke Kapsel (Abbildung 19), während die der zellfreien Faserkonstrukte nicht wesentlich dünner erschienen. Zweimal konnte Flüssigkeit beobachtet werden. Das beim Anschneiden der Kapseln abfließende Sekret war flüssig bis sämig und von gelblicher, teils bräunlicher Farbe und durchsetzte das gräuliche Faserkonstrukt (Abbildung 20).

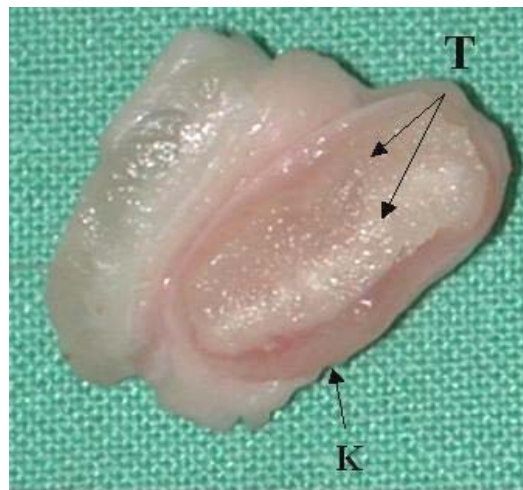


Abbildung 19: Schwein 6, Explantat Tag 31; Kieselfasern, Fibrinkleber und Chondrozyten; K: Kapsel, T: Faserkonstrukt mit hellem Zentrum



Abbildung 20: Schwein 6, Explantat Tag 31; Kieselfasern und Fibrinkleber; K: Kapsel; T: mit Sekret durchsetztes Konstrukt

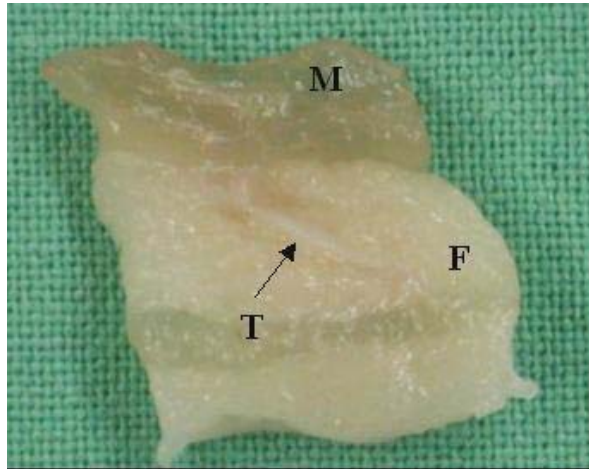


Abbildung 21: Schwein 6, Explantat Tag 31, Chondrozyten in Fibrinkleber; T: Transplantatlokalisierung, M: Muskulatur, F: Fettgewebe

Von allen Flüssigkeiten wurden Sterilkontrollen auf Blutagarplatten bzw. in Thioglykolat-Bouillons angesetzt. Es zeigte sich nach mehrtägiger Inkubation in keinem Fall eine bakterielle Besiedlung.

5. Ergebnisse

Tabelle 6: Tabellarische Aufführung des makroskopischen Bildes der explantierten Transplantate in der Tierversuchsgruppe 2; Auffälligkeiten an den Explantationstagen 8, 16 und 30 bzw. 31 (Kapseldicke und Auftreten von Flüssigkeit); die mit „?“ ausgefüllten Felder kennzeichnen die nicht zweifelsfrei auszumachenden Transplantat-Lokalisationen; „-“ besagt, dass keine Kapsel- bzw. Flüssigkeitsbildung vorlag.

| | | Schwein 4 (Kontrolltier) | | | Schwein 5 (Cortison systemisch) | | | Schwein 6 (Cortison lokal) | | |
|-----------------------------------|-------------|------------------------------------|---------|---------|---|----------------------|---------|--------------------------------------|----------------------|---------|
| Transplantat-Komponenten | | Fa + Fi + Ze | Fa + Fi | Fi + Ze | Fa + Fi + Ze | Fa + Fi | Fi + Ze | Fa + Fi + Ze | Fa + Fi | Fi + Ze |
| Kapsel- dicke [mm] | d 8 | - | - | - | 4 - 7 | 2 | < 1 | 3 - 5 | 2 - 3 | - |
| | d 16 | 2 - 7 | 2 | < 1 | 3 - 4 | 2 - 3 | - | 1,5 - 2 | 1,5 - 2 | - |
| | d 31 | 1 - 3 | 1 | ? | 2 - 3 | 1 - 2 | ? | 1 - 4 | 1 - 2 | - |
| Auftreten einer Flüssigkeit | d 16 | - | - | - | bei 3 Transplant. | bei 1 Transplant. | - | - | - | - |
| | d 31 | bei 3 Transplant. | - | - | bei 3 Transplant. | bei 1 Transplant. | - | bei 2 Transplant. | bei 1 Transplant. | - |

Bei der makroskopischen Beurteilung der an die Schulter bzw. Ohrbasis verpflanzten nativen Knorpelstücken waren keine Besonderheiten auffällig. Sie lagen sowohl zum ersten als auch zum zweiten Explantationszeitpunkt reaktionslos subkutan (Abbildung 22).



Abbildung 22: Heterotrop transplantiertes natives Knorpel (nK), Explantation am Tag 31; Schwein 5, Ohrbasis

5.1.4.2 Histologie

a) Hämalau-Eosin-Färbung (HE)

Alle explantierten nativen Knorpelstücken zeigten sich in der HE-Färbung sowohl bei dem ersten als auch bei dem zweiten Explantationszeitpunkt regelrecht aufgebaut und vital, unabhängig von ihrem Implantationsort.

Im Folgenden werden die histologischen Auswertungen der verschiedenen Transplantattypen aller Schweine anhand der graphischen Darstellungen der sich darstellenden Phänomene ‚chronische Entzündung‘ (Lymphozyten, Monozyten, Plasmazellen), ‚Floridität der Entzündung‘, ‚Fibrose‘ (Bindegewebszellen), ‚Eosinophilie‘ (eosinophile Granulozyten) und ‚Fremdkörperreaktion‘ (Fremdkörperriesenzellen) miteinander verglichen.

Zunächst werden die Kurvenverläufe der histologischen Phänomene je Schwein beschrieben und in Relation zueinander gesetzt.

KONTROLLTIERE

Schwein 1: Die faserenthaltenden Konstrukte zeigen ähnliche Kurvenverläufe hinsichtlich der chronischen Entzündung mit Höchstwert um den 8 Tag (Grad 1). Das Ausmaß der Floridität ist etwa entsprechend (Abbildung 23 und 24). Die fibrotischen Erscheinungen sind bei allen drei Transplantattypen ähnlich in ihrem Verlauf über den Beobachtungszeitraum von 31 Tagen. Zunächst ist eine Zunahme zu verzeichnen, später eine leichte Abnahme. Eine Ausnahme stellt das Konstrukt „Ethisorb®, Fibrin und Chondrozyten“ am letzten Explantationszeitpunkt dar, da hier die Kurve wieder leicht ansteigt. Die Fremdkörperreaktionskurve, die annähernd parallel verläuft zur Kurve der Eosinophilie, ist bei „Fibrin und Chondrozyten“ am geringsten ausgeprägt mit Maximum am 8. und 31. Explantationstag (Abbildung 25).

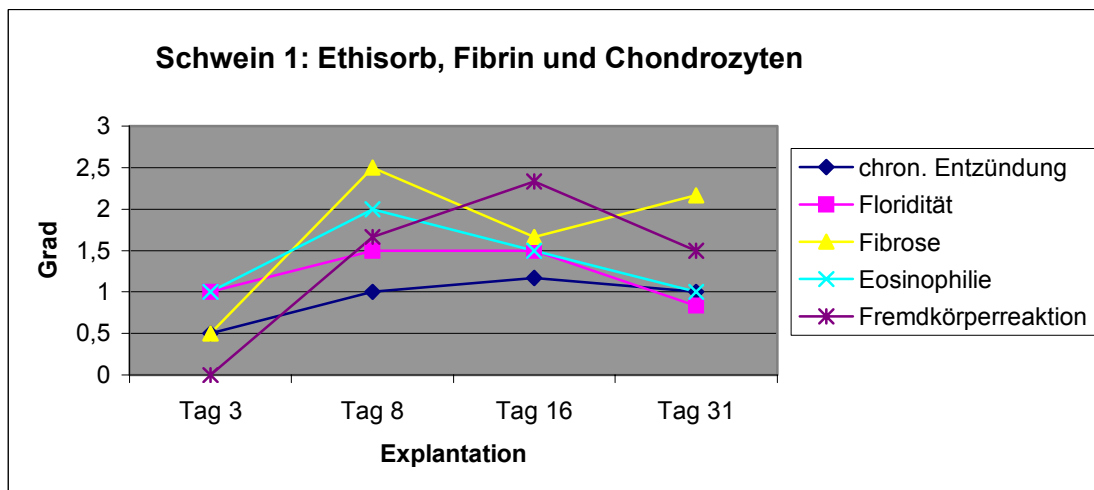


Abbildung 23: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Ethisorb®-Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 1 (Kontrolltier) über einen Zeitraum von 31 Tagen

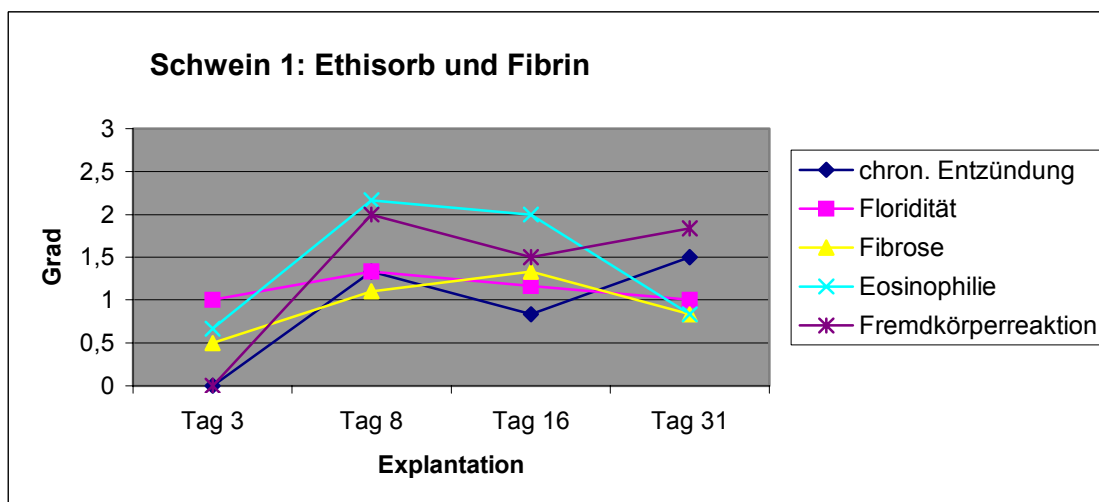


Abbildung 24: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Ethisorb®-Fibrin-Explantaten bei Schwein 1 (Kontrolltier) über einen Zeitraum von 31 Tagen

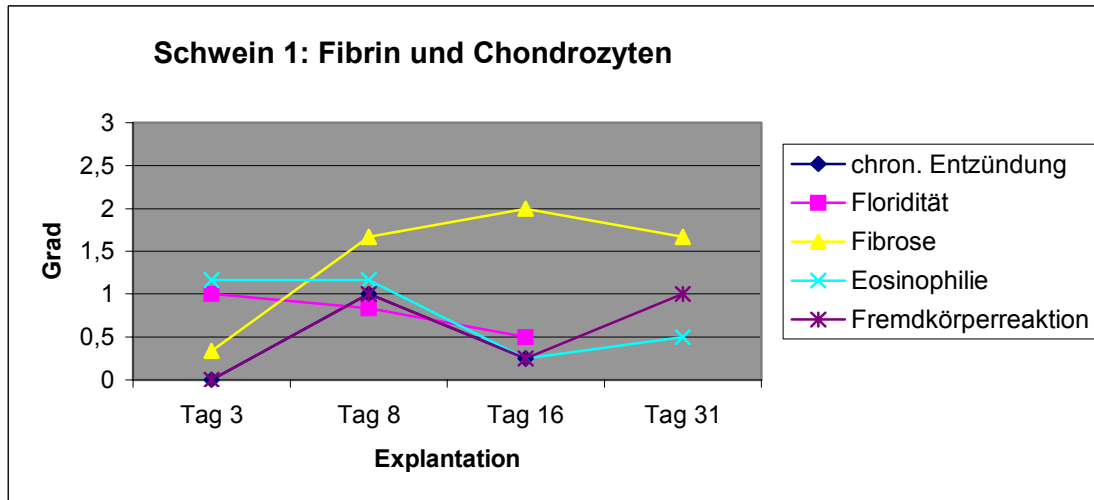


Abbildung 25: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 1 (Kontrolltier) über einen Zeitraum von 31 Tagen

Schwein 4: Mit Ausnahme des Parameters ‚Floridität‘ haben alle Kurven des Konstruktes „Kieselgelfasern, Fibrin und Chondrozyten“ ihr erstes Maximum am 8. Tag, ein Minimum an Tag 16 und ein weiteres Maximum am 31. Tag (Abbildung 26). Die ‚Floridität‘ schwankt bei den verschiedenen Konstrukten um einem geringen Wert (Grad 1) und die ‚Fibrose‘-Kurve steigt relativ steil an und bleibt ab dem 8. Tag etwa auf dem gleichen Niveau. Bei Konstrukten, die lediglich 2 Komponenten enthalten (Kieselgelfasern und Fibrin, Abbildung 27, bzw. Fibrin und Chondrozyten, Abbildung 28), haben die Kurven ‚Eosinophilie‘ und ‚Fremdkörperreaktion‘ ihren Maximalwert am 8. bzw. 16. Tag. Ab diesen Zeitpunkten fallen die Kurven wieder ab bis Tag 31 auf Grad 1 bzw. Grad 0 im faserfreien Transplantat.

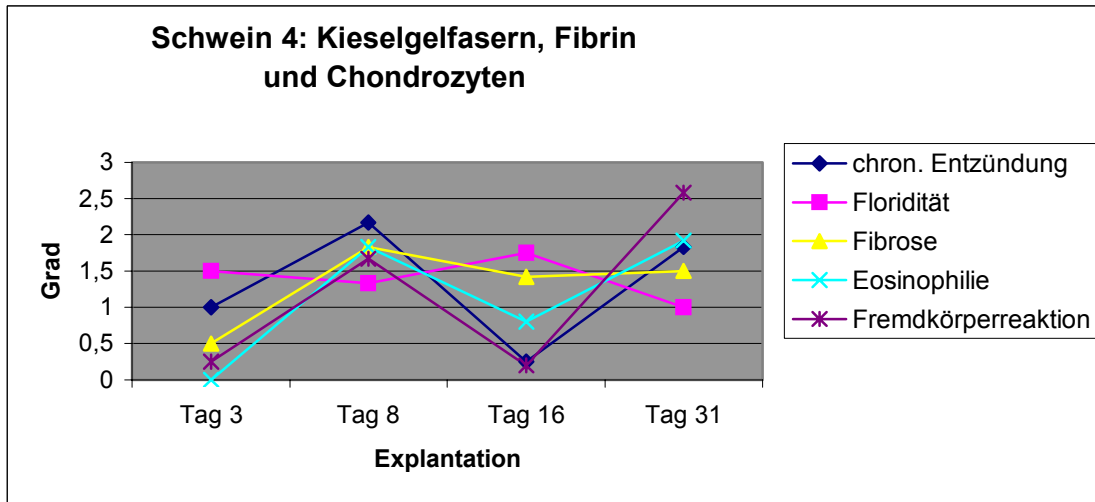


Abbildung 26: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Kieselgelfasern-Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 4 über einen Zeitraum von 31 Tagen

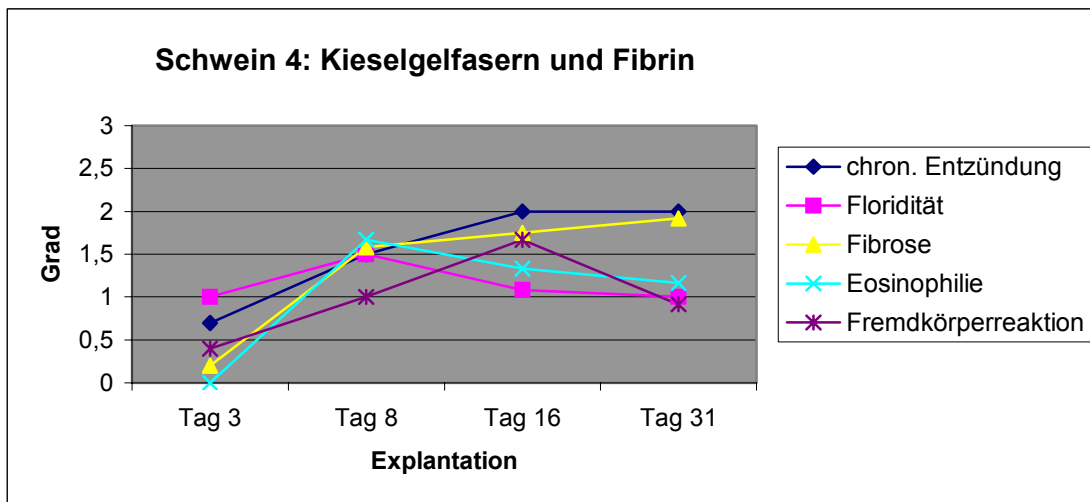


Abbildung 27: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Kieselgelfasern-Fibrin-Explantaten bei Schwein 4 über einen Zeitraum von 31 Tagen

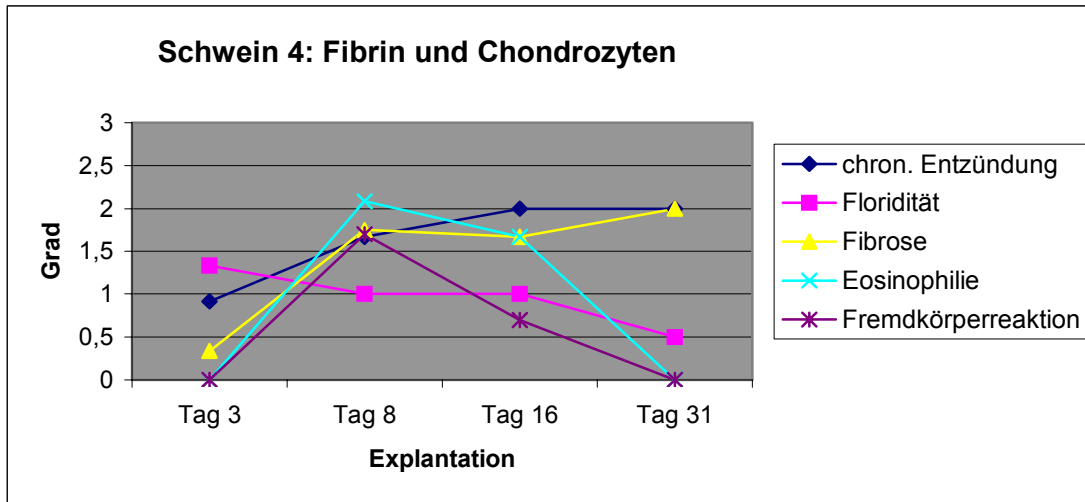


Abbildung 28: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 4 über einen Zeitraum von 31 Tagen

CORTISON SYSTEMISCH

Schwein 2: Sowohl die ‚chronische Entzündung‘ als auch die ‚Eosinophilie‘ verhalten sich in allen Präparaten in etwa gleich, die Kurven schwanken leicht um Grad 1,5. Ein steiler Anstieg bis Tag 8 bzw. 16 ist bei dem Phänomen ‚Fremdkörperreaktion‘ zu vermerken, dem ein flacherer Kurvenabfall folgt (Abbildung 29 bis 31). Bei den 2-Komponenten-Transplantaten am Tag 3 nimmt die Fibrose von Grad 1 bis Grad 2,5 am Ende des Beobachtungszeitraums zu.

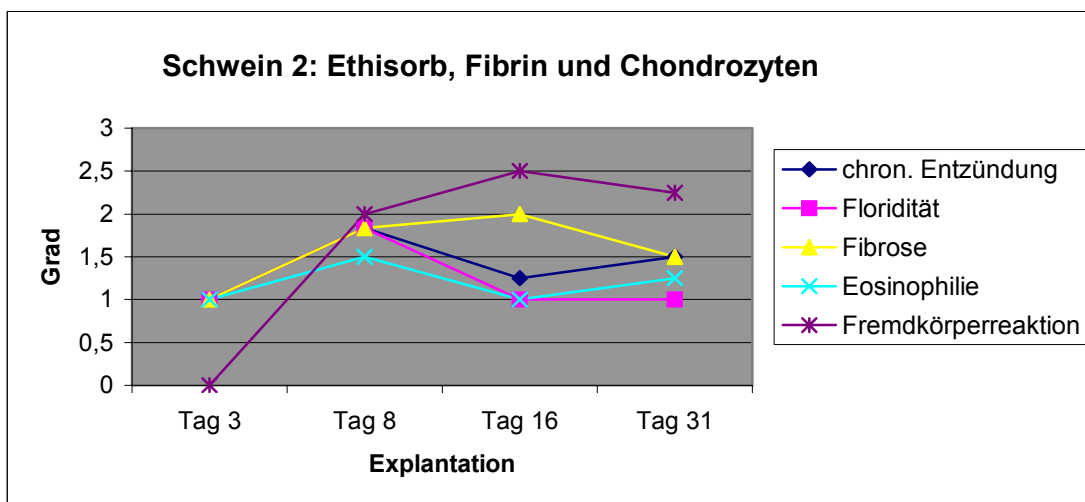


Abbildung 29: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Ethisorb®-Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 2 (Cortison systemisch) über einen Zeitraum von 31 Tagen

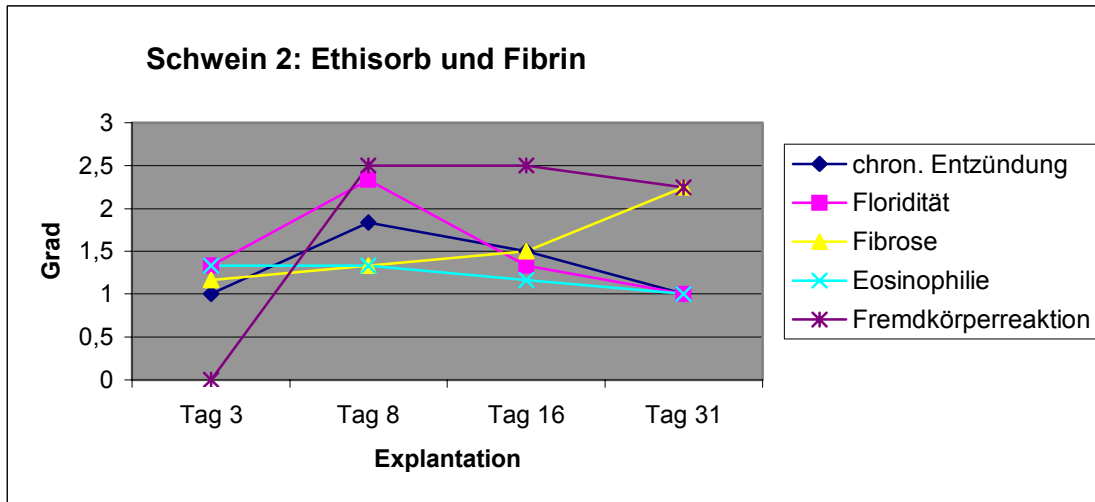


Abbildung 30: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Ethisorb®-Fibrin-Explantaten bei Schwein 2 (Cortison systemisch) über einen Zeitraum von 31 Tagen

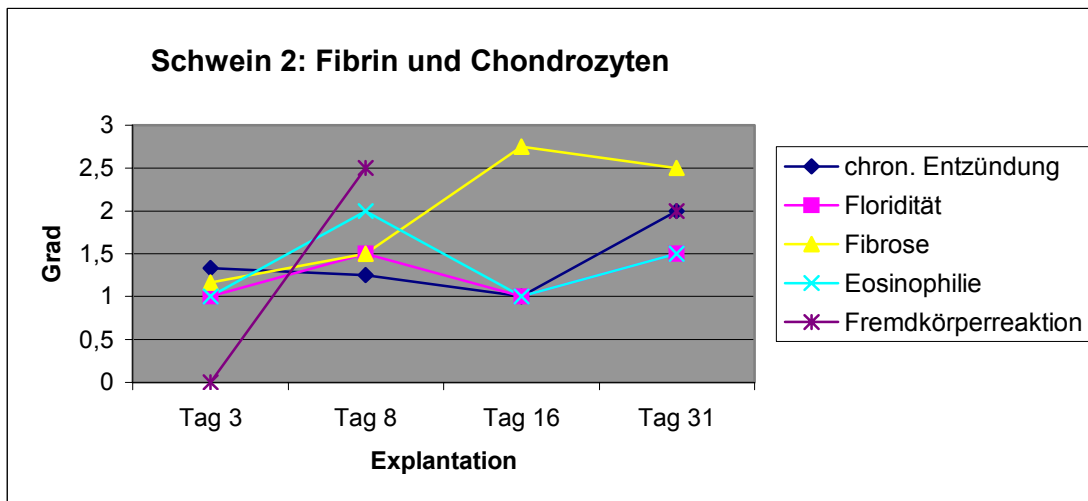


Abbildung 31: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 2 (Cortison systemisch) über einen Zeitraum von 31 Tagen; zu Tag 16, Fremdkörperreaktion, waren keine Angaben möglich.

Schwein 5: Die ‚Eosinophilie‘- und die ‚Fremdkörperreaktion‘-Kurven verlaufen bei allen Konstrukten fast parallel: Zunächst kommt es zu einem steilen Anstieg bis Tag 8 bzw. 16 (Grad 1,5 bei den Faserkonstrukten bzw. Grad 0,5 bei dem faserlosen Transplantat) und anschließend zu einem flachen Abfall der Kurven bis Grad 0 – 1. Bei den faserenthaltenden Explantaten (Abbildung 32 und

Abbildung 33) nehmen die chronische Entzündung ebenso wie die fibrotischen Erscheinungen innerhalb der 4 Wochen leicht bzw. etwas stärker zu. Bei „Fibrin und Chondrozyten“ ist eine Steigerung von Grad 0,5 auf Grad 1,5 am Tag 16 zu beobachten. Die Kurven dieses Konstruktes lassen sich nicht vollständig beurteilen, da am 31. Tag keine Präparate konserviert werden konnten. Man kann hierbei lediglich eine Aussage bis Tag 16 treffen, an dem die ‚Fibrose‘ wieder abfällt, die zuvor am Tag 8, ein Maximum (Grad 2,5) erreicht hatte (Abbildung 34).

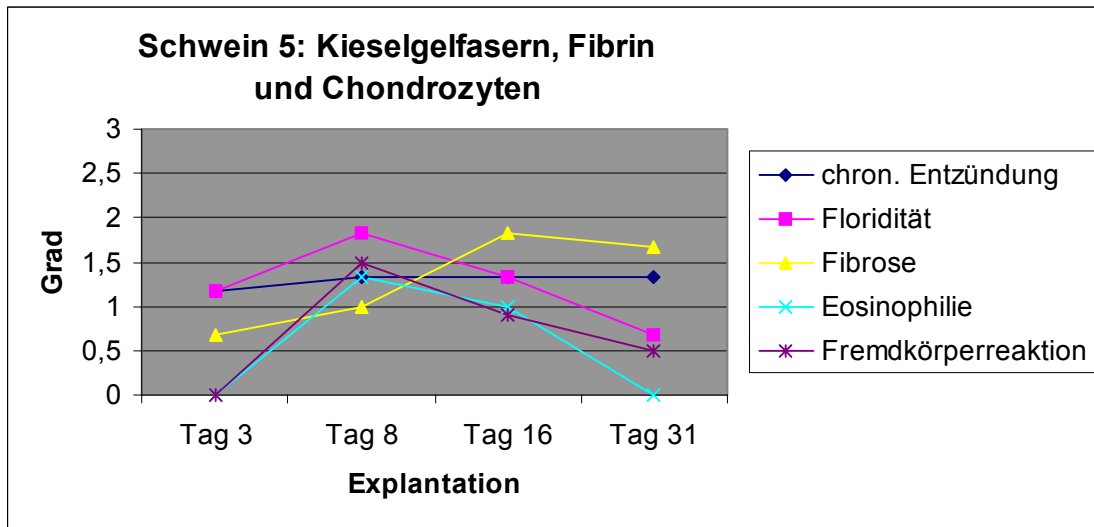


Abbildung 32: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Kieselgelfasern-Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 5 über einen Zeitraum von 31 Tagen

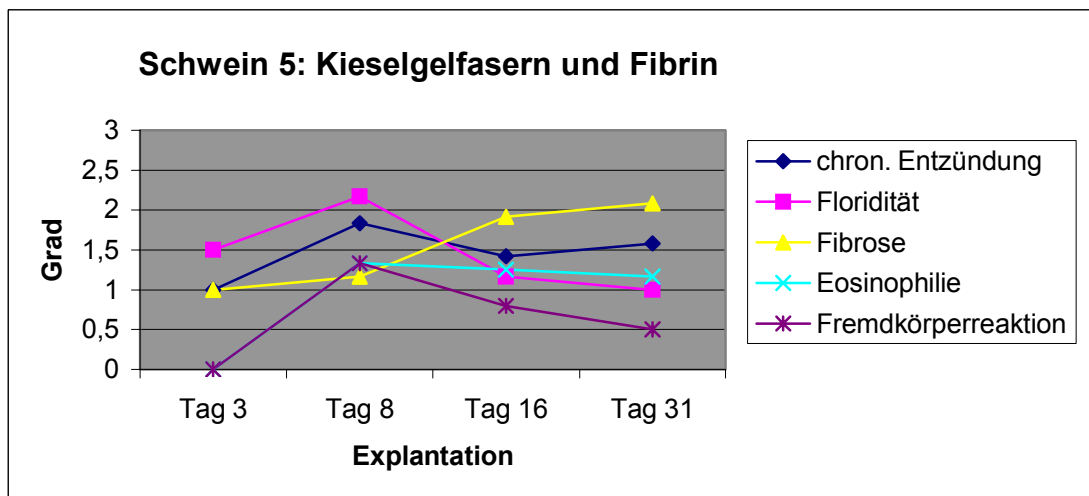


Abbildung 33: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Kieselgelfasern-Fibrin-Explantaten bei Schwein 5 über einen Zeitraum von 31 Tagen

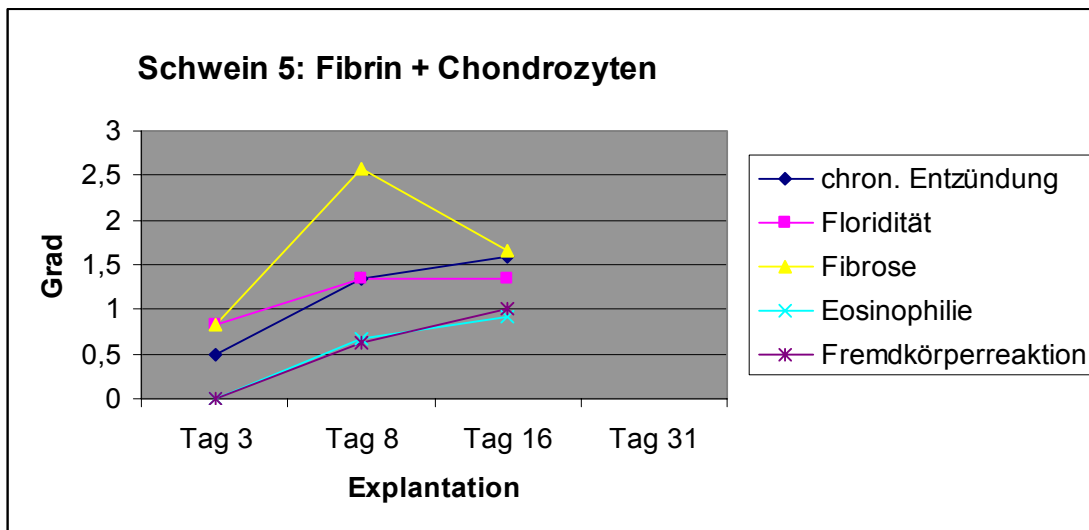


Abbildung 34: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 5 über einen Zeitraum von 31 Tagen; zu den Explantaten an Tag 31 konnten keine Angaben gemacht werden.

CORTISON LOKAL

Schwein 3: Bei allen Explantaten erscheint die ‚chronische Entzündung‘ gering ausgeprägt. Sie bleibt über den Beobachtungszeitraum in etwa gleich (um Grad 1 schwankend) bzw. nimmt am Tag 16 (Fibrin und Chondrozyten, Abbildung 37) deutlich auf Grad 0 ab. Bei allen fällt die ‚Floridität‘ von Grad 1 auf Grad 0 zwischen Tag 3 und Tag 30 ab. Die ‚Fibrose‘ hat jeweils mit Grad 2,5 - 3 ihr Maximum am achten Explantationstag und nimmt im weiteren Verlauf bis zum letzten Tag leicht wieder ab bis auf Grad 1,5 – 2. Bei den beiden Ethisorb® enthaltenden Konstrukten (Abbildung 35 und Abbildung 36) nimmt die ‚Fremdkörperreaktion‘ bis Tag 16 bzw. 30 sehr stark zu. Die ‚Eosinophilie‘ hingegen erreicht bei diesen Transplantaten einen Höchstwert am Tag 8 (Grad 1,5 – 2) und fällt bis zum Ende auf Grad 0,5 kontinuierlich wieder ab. Eine Beschreibung des Kurvenverlaufs bei den Transplantaten ohne Fasern in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraums kann nicht erfolgen, da keine Explantate am 30. Tag konserviert werden konnten.

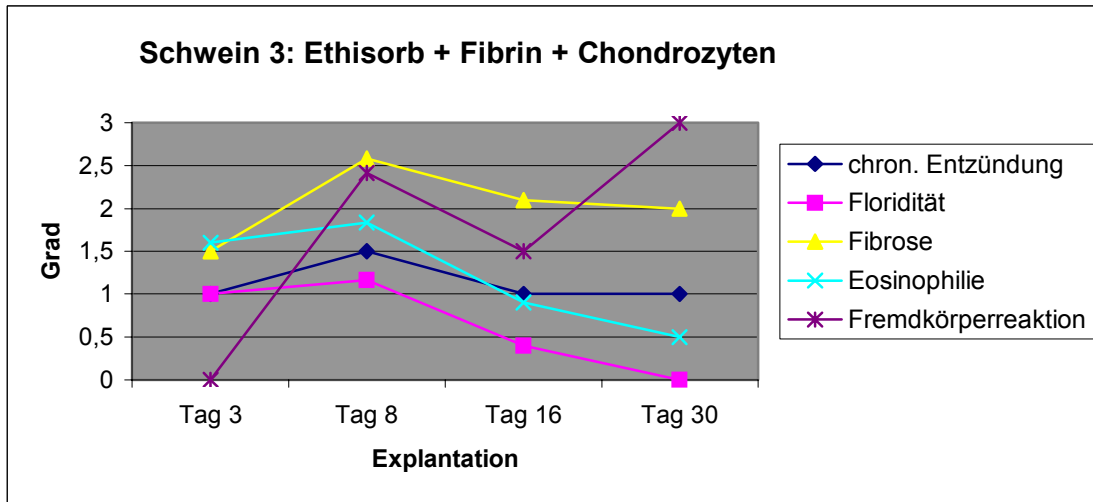


Abbildung 35: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Ethisorb®-Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 3 (Cortison lokal) über einen Zeitraum von 30 Tagen

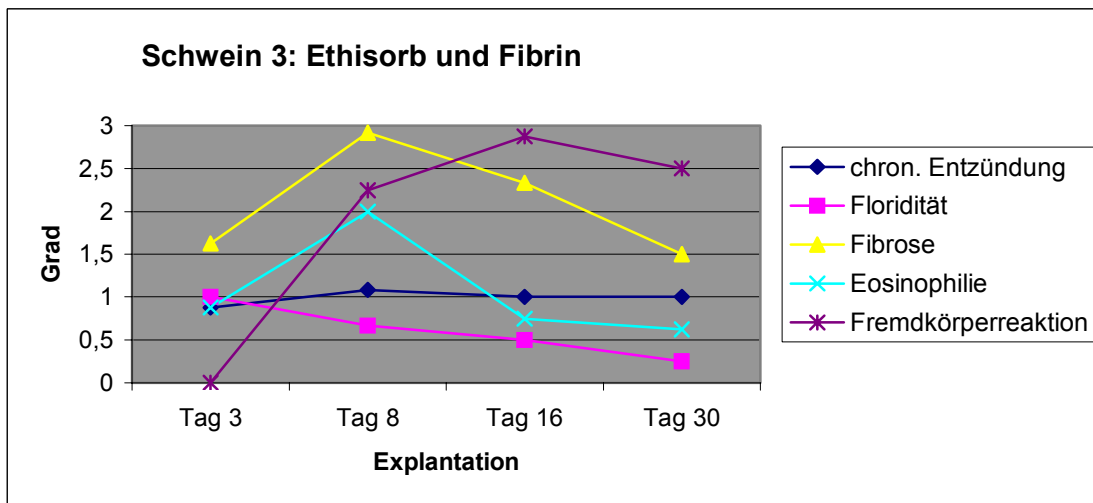


Abbildung 36: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Ethisorb®-Fibrin-Explantaten bei Schwein 3 (Cortison lokal) über einen Zeitraum von 30 Tagen

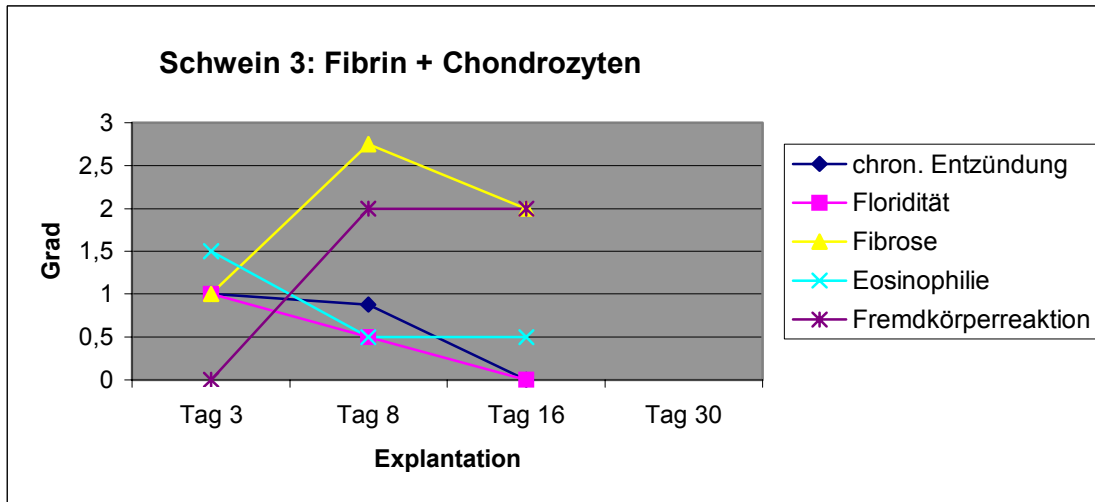


Abbildung 37: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 3 (Cortison lokal) über einen Zeitraum von 30 Tagen; zu den Explantaten an Tag 31 konnten keine Angaben gemacht werden.

Schwein 6: Alle Kurven verlaufen annähernd parallel mit zunächst leichtem Anstieg und Abflachen in der zweite Hälfte des beobachteten Zeitraums. Ausnahmen hier von bilden einerseits die ‚Fibrose‘-Kurve von ‚Kieselgelfasern und Fibrin‘, die ab dem 8. Tag wieder abfällt und andererseits die ‚Fremdkörperreaktion‘-Kurven bei den Zweikomponentenkonstrukten (Abbildung 39 und 40): Es kommt zunächst bei beiden zu einem steilen Anstieg bis Tag 8 (Grad 2,5 – 3) und danach zu einem sehr starken Abfall bis Tag 31 auf Grad 0 bei ‚Fibrin und Chondrozyten‘ bzw. zu einem mäßigen Abfall auf ca. Grad 1,7 bei ‚Kieselgelfasern und Fibrin‘.

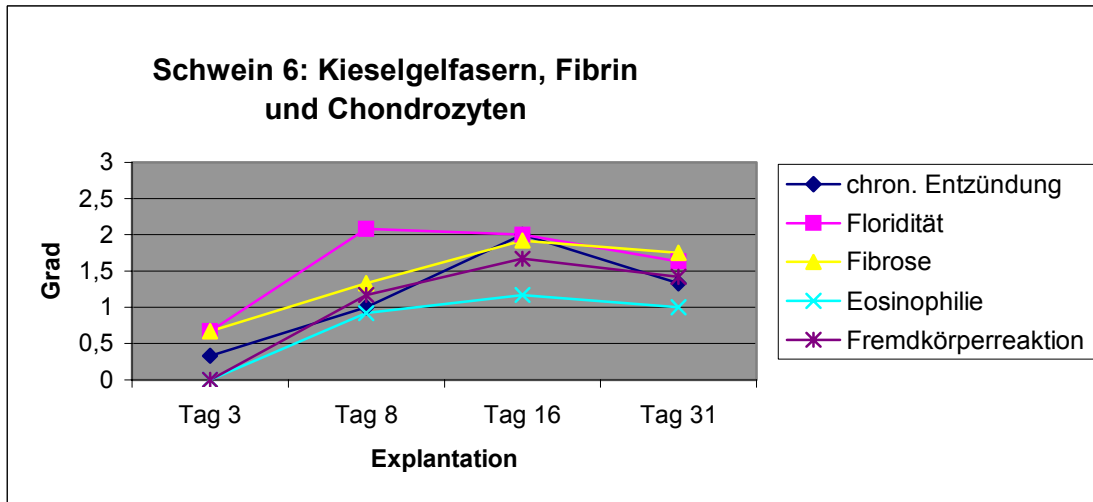


Abbildung 38: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Kieselgelfasern-Fibrin-Explantaten bei Schwein 6 über einen Zeitraum von 31 Tagen

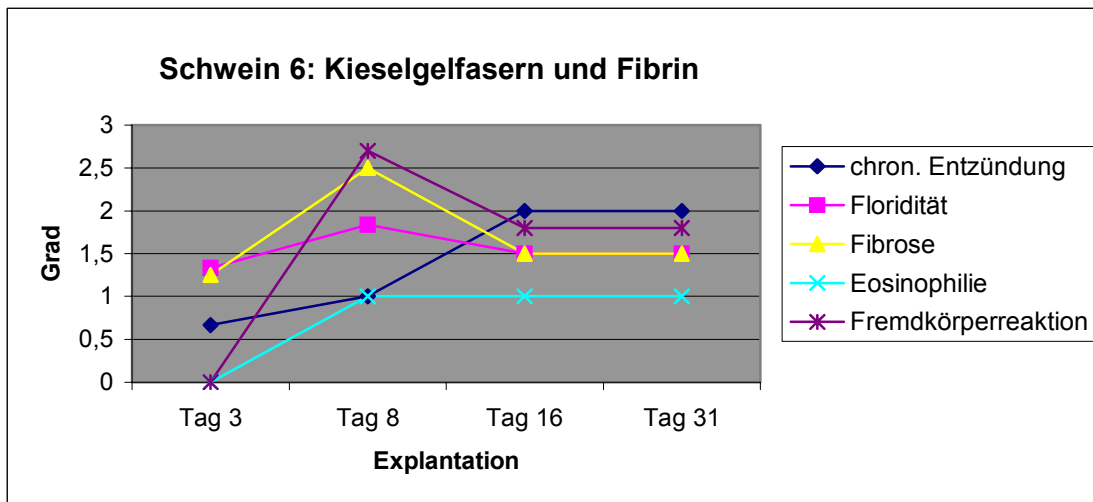


Abbildung 39: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Kieselgelfasern-Fibrin-Explantaten bei Schwein 6 über einen Zeitraum von 31 Tagen

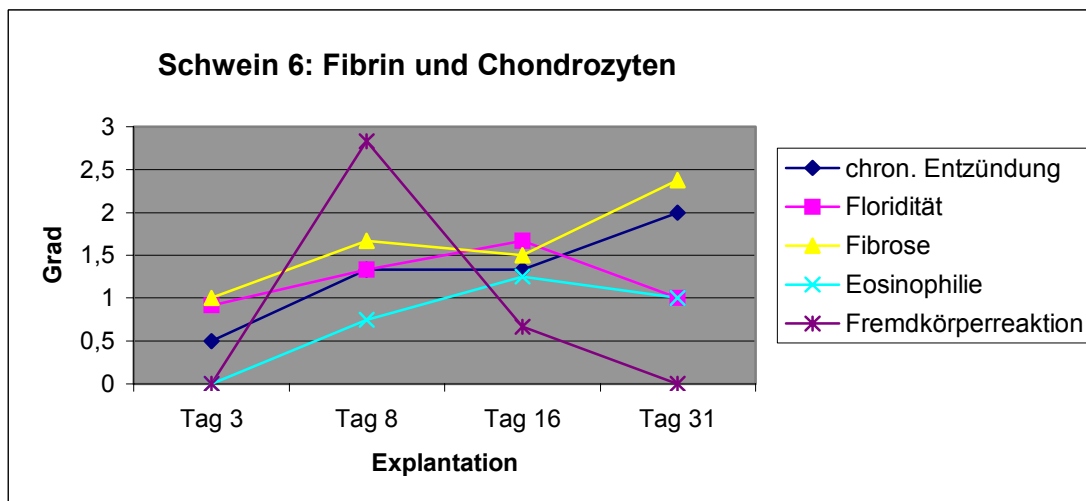


Abbildung 40: Graphische Darstellung der histologischen Beobachtungen bei den Fibrin-Chondrozyten-Explantaten bei Schwein 6 über einen Zeitraum von 31 Tagen

Nachfolgend werden die einzelnen Konstrukttypen untereinander verglichen. Jeweils „Fasern, Fibrin und Chondrozyten“, „Fibrin und Chondrozyten“ und „Fibrin und Chondrozyten“ werden näher betrachtet und ein Bezug zur ggf. erfolgten Immunmodulation durch systemische oder lokale Applikation von Cortison hergestellt.

FASERN, FIBRIN UND CHONDROZYTEN

Alle Kurven bei den Ethisorb®-Fibrin-Chondrozyten- Transplantaten verlaufen sehr ähnlich: Zunächst kann man einen Anstieg aller Parameter vermerken, dann einen leichten Abfall der sich darstellenden Kurven. Lediglich bei „Cortison lokal“ flacht die Fremdkörperreaktionskurve nicht ab, sondern erreicht am Tag 30 ihr Maximum (Grad 3).

Die Kurven der entsprechenden Kieselgelfaser-Konstrukte, die mit Cortison behandelt wurden, zeigen einen vergleichbaren Verlauf zu den Kurven der Ethisorb®-Transplantate. In dieser Gruppe bildet das Kontrolltier die Ausnahme: nach einem geringen Wert am Tag 16 steigen die Parameter ‚chronische Entzündung‘, ‚Fremdkörperreaktion‘ und ‚Eosinophilie‘ wieder deutlich an (Abbildung 26).

FASERN UND FIBRIN

Bei dem Kontrolltier mit den Ethisorb® enthaltenden Konstrukten nimmt die ‚Eosinophilie‘ zwischen Tag 8 und 16 größere Ausmaße an (Grad 2) als bei dem mit Cortison systemisch behandelten Schwein, bei dem der Grad dieses Parameters permanent bei ca. 1,2 liegt. Bei diesem Tier jedoch nimmt die Fibrose zum Ende des Beobachtungszeitraums am meisten zu im Gegensatz zum Kontrolltier und zum Cortison-lokal-Tier, bei dem die fibrotischen Erscheinungen gegen Ende abnehmen. Beim Kontrollschwein nimmt ferner die ‚chronische Entzündung‘ am Ende leicht zu, während sie bei den immunmodulierten Tieren leicht abnimmt (Abbildung 30) bzw. gleich bleibt (Abbildung 36). Die Fremdkörperreaktion ist bei den Cortison-Tieren stärker ausgeprägt als bei dem Kontrolltier dieser Gruppe (um 0,5 bis 1 Grad stärker).

Bei den Kieselgelfaser-Transplantaten bestehen keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Kontrolltier und dem systemisch mit Cortison behandelten Schwein. Auch die Parameter ‚Eosinophilie‘ und ‚chronische Entzündung‘ des lokal mit Cortison behandelten Tieres verlaufen so wie bei den anderen beiden Tieren. Lediglich die ‚Fremdkörperreaktion‘ ist am Tag 8 deutlich stärker ausgeprägt: Grad 2,7 statt 1 – 1,2 bei den beiden anderen Tieren. Auch die fibrotischen Erscheinungen fallen anders aus: Hierbei tritt ein Höchstwert am 8. Tag auf, dann kommt es zu einem Abfall. Bei den übrigen beiden Schweinen hingegen steigt die ‚Fibrose‘ von Beginn bis zum Ende am Tag 31 permanent leicht an.

FIBRIN UND CHONDROZYTEN

Beim Kontrolltier der Versuchstiergruppe 2 (Abbildung 25) liegen im Vergleich zu den mit Cortison behandelten Tieren alle Werte zu allen Zeitpunkten zwischen Grad 0 und Grad 1. Die Kurven der Parameter ‚chronische Entzündung‘, ‚Eosinophilie‘ und ‚Fremdkörperreaktion‘ nehmen beim systemisch immunmodulierten Tier wieder zu, nachdem sie am 16. Explantationstag einen niedrigen Wert (Grad 1) erreicht haben. Bei „Cortison lokal“ (Abbildung 37) sinken die Parameter ‚chronische Entzündung‘ und ‚Eosinophilie‘ am 16. Tag auf Grad 0 bzw. 0,5 ab. Eine Verlaufsbeurteilung bis Tag 31 ist nicht möglich, da entsprechende Werte nicht zu ermitteln waren.

Bei den Fibrin-Chondrozyten-Konstrukten der Versuchstiergruppe 2 nimmt die ‚chronische Entzündung‘ bei allen 3 Tieren von Grad 0,5 – 1 auf bis zu Grad 2 zu. Ein steiler Abfall der Fremdkörperreaktionskurve ist nicht nur bei „Cortison lokal“ zu beobachten, sondern auch beim Kontrolltier. Ebenso verhält es sich mit dem Parameter ‚Eosinophilie‘.

Zudem fielen einige Besonderheiten bei der histologischen Beurteilungen der Präparate auf, die im Folgenden näher beleuchtet werden.

In der Versuchstiergruppe 1 (Tabelle 7) kam es bei einigen Transplantaten zu Verkalkungen und metaplastischer Knochenbildung (Abbildung 41 und Abbildung 43), die besonders bei dem lokal mit Cortison behandelten Tier auftraten. Teilweise war eine feine bindegewebige Kapsel um das Implantat auszumachen. In einigen Präparaten konnte lediglich eine bindegewebige Reaktion nachgewiesen werden ohne Hinweise auf das ursprüngliche Implantat (Abbildung 42).

Tabelle 7: Histologische Besonderheiten bei den Transplantaten aus der Versuchstiergruppe 1 (Schweine 1 bis 3); (...): die Phänomene, die nur in einem der drei identisch hergestellten Explantaten auftraten; ‚-‘: nicht beobachtet

| BESONDERHEITEN | | Tag 3 | Tag 8 | Tag 16 | Tag 30/31 |
|--|--------------------------|----------------------------|---|---|-----------|
| Schwein 1 (Kontrolltier) | Fasern + Fibrin + Zellen | (Verkalkungen) | - | feine Kapsel | - |
| | Fasern + Fibrin | - | - | feine Kapsel | Kapsel |
| | Fibrin + Zellen | Verkalkungen, Sequester | (Verkalkungen, Sequester) | (Zyste) | - |
| Schwein 2 (Cortison systemisch) | Fasern + Fibrin + Zellen | - | - | - | - |
| | Fasern + Fibrin | - | (feineKapsel), (Verkalkungen, Sequester) | (feine Kapsel) | - |
| | Fibrin + Zellen | - | Verkalkungen | - | - |
| Schwein 3 (Cortison lokal) | Fasern + Fibrin + Zellen | Verkalkungen | Verkalkungen | Verkalkungen, (metaplastische Knochenbildung) | - |
| | Fasern + Fibrin | Verkalkungen | Verkalkungen, (metaplastische Knochenbildung) | (Verkalkungen) | - |
| | Fibrin + Zellen | (Verkalkungen) | Verkalkungen, (metaplastische Knochenbildung) | (Verkalkungen) | - |

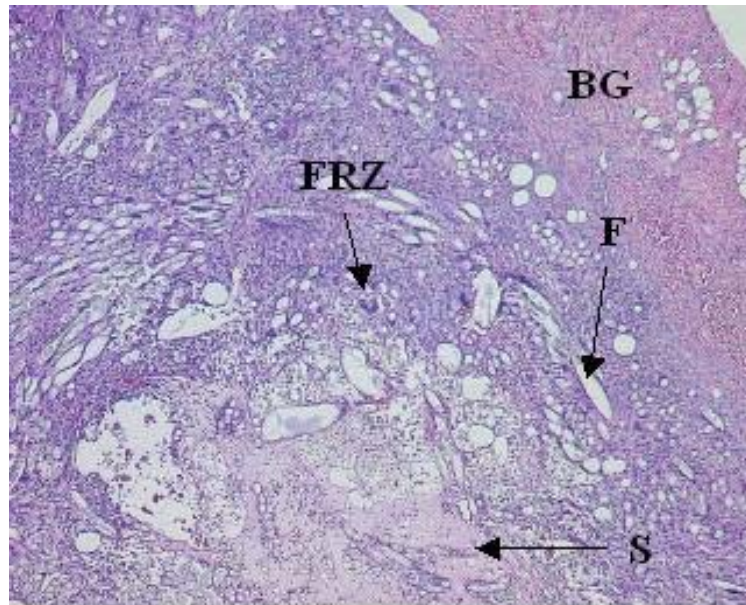


Abbildung 41: Schwein 2, Tag 8; Transplantat Ethisorb®-Fasern und Fibrinkleber, HE-Färbung, 2fache Vergrößerung; FRZ: Fremdkörperriesenzelle, S: Sequester, F: Ethisorb®-Faser, BG: Bindegewebe

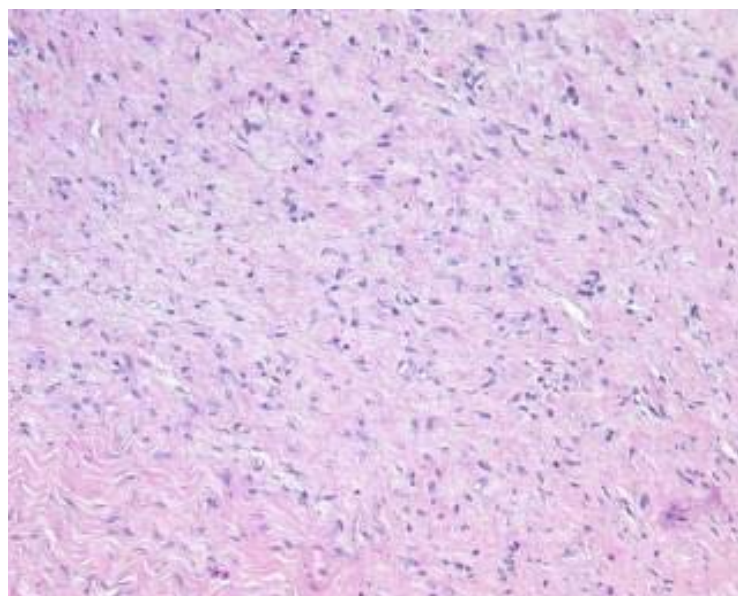


Abbildung 42: Schwein 2, Tag 16; Transplantat Fibrinkleber und Chondrozyten, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung; sich rosa darstellende Bindegewebszellen mit Zellkernen (blau-violett).

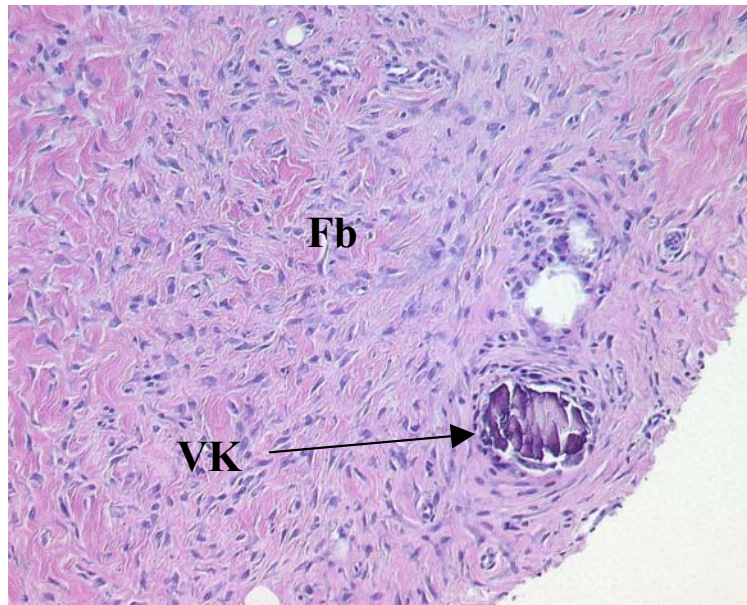


Abbildung 43: Schwein 3, Tag 16; Transplantat Ethisorb®-Fasern, Fibrinkleber und Chondrozyten, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung; VK: Verkalkung, Fb: Fibrose

Als histologischen Besonderheiten in der HE-Färbung in Ergänzung zu den oben genannten Phänomenen in der Versuchstiergruppe 2 (Tabelle 8) wurden ebenfalls wie in Gruppe 1 Verkalkungen beobachtet, jedoch nur am letzten Explantationstag bei dem mit Cortison systemisch behandelten Schwein. Ferner war degenerierte (pyknotische) Knorpelzellen bei den kieselgelfaserfreien Konstrukten an den Explantationstagen 3 und 8 erkennbar (Abbildung 46). Darüber hinaus konnte man um einige Transplantate eine feine Kapselbildung ausmachen.

5. Ergebnisse

Tabelle 8: Histologische Besonderheiten bei den Transplantaten aus der Versuchstiergruppe 2 (Schweine 4 bis 6); (...): die Phänomene, die nur in einem der drei identisch hergestellten Explantaten auftraten; '-': nicht beobachtet

| BESONDERHEITEN | | Tag 3 | Tag 8 | Tag 16 | Tag 31 |
|---|--------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| Schwein 4 (Kontrolltier) | Fasern + Fibrin + Zellen | - | - | - | - |
| | Fasern + Fibrin | - | (angedeutete Kapsel) | - | (kapselartige Fibrose) |
| | Fibrin + Zellen | - | - | - | - |
| Schwein 5 (Cortison systemisch) | Fasern + Fibrin + Zellen | - | - | - | Verkalkungen |
| | Fasern + Fibrin | - | - | - | (Verkalkungen) |
| | Fibrin + Zellen | degenerierter Knorpel | degenerierter Knorpel | - | - |
| Schwein 6 (Cortison lokal) | Fasern + Fibrin + Zellen | - | - | (angedeutete Kapsel) | - |
| | Fasern + Fibrin | - | - | - | (Kapsel) |
| | Fibrin + Zellen | degenerierter Knorpel | (Sequester) | (Verkalkungen) | - |

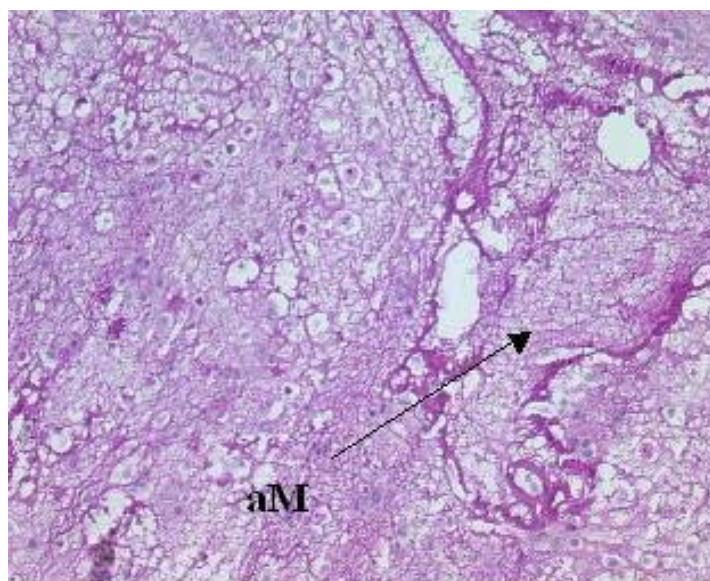


Abbildung 44: Schwein 5, Tag 3; Transplantat Fibrinkleber und Chondrozyten, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung; aM: sich auflösende Matrix (Fibrinkleber)

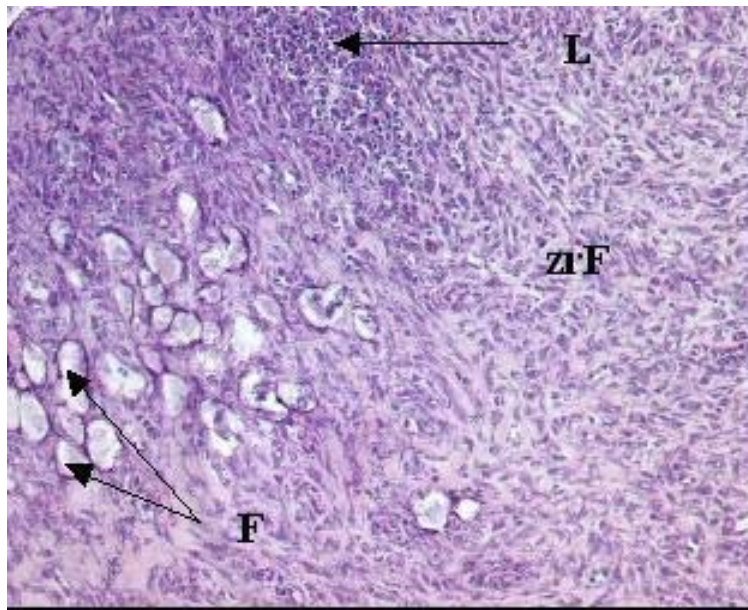


Abbildung 45: Schwein 6, Tag 8; Transplantat Kieselgelfasern und Fibrinkleber, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung; F: Kieselgelfasern, zrF: zellreiche Fibrose, L: Lymphozyten

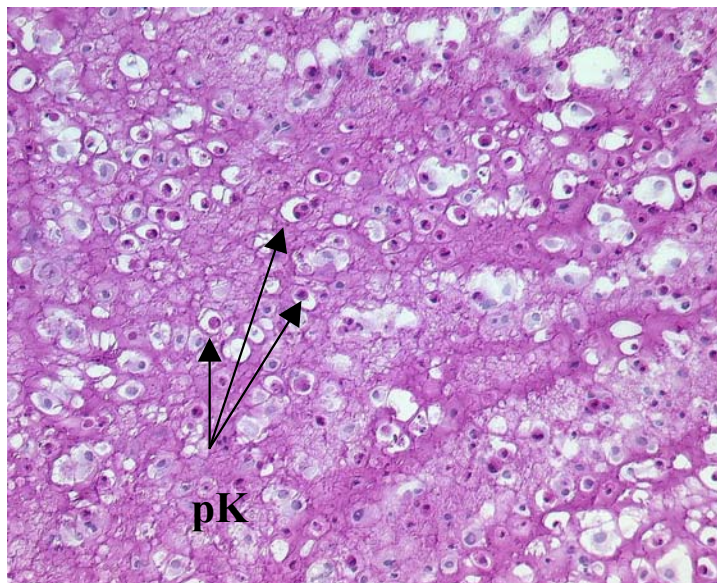


Abbildung 46: Schwein 6, Tag 3; Transplantat Fibrinkleber und Chondrozyten, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung; pK: pyknotische Chondrozytenkerne

b) Zusatzfärbungen

In Ergänzung zu der HE-Färbung wurden weitere Färbungen an den Schnittpräparaten der Explantate durchgeführt (Elastika, Alcianblau). Deutlich erkannte man in der Elastika-Färbung die sich bei einigen Transplantaten kapselartig um die Transplantate ausgebildete Fibrose (Abbildung 47). Wie auch in der HE-Färbung ist die Konstruktmatrix, der Fibrinkleber, auszumachen, der sich in der Alcianblau-Färbung blassbläulich darstellt (Abbildung 48).

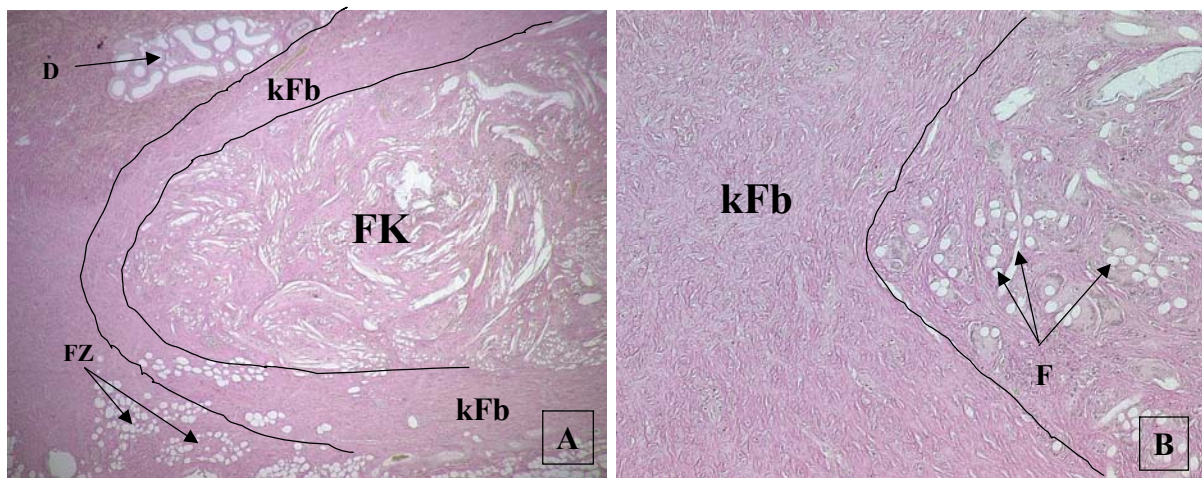


Abbildung 47 A und B: Schwein 4, Tag 3; Transplantat Kieselgelfasern, Fibrinkleber und Chondrozyten, Elastika-Färbung, A: 2fache Vergrößerung, B: 10fache Vergrößerung; FK: Faserkonstrukt, kFb: kapselartige Fibrose, FZ: Fettzellen, D: Drüsen, F: Kieselgelfasern

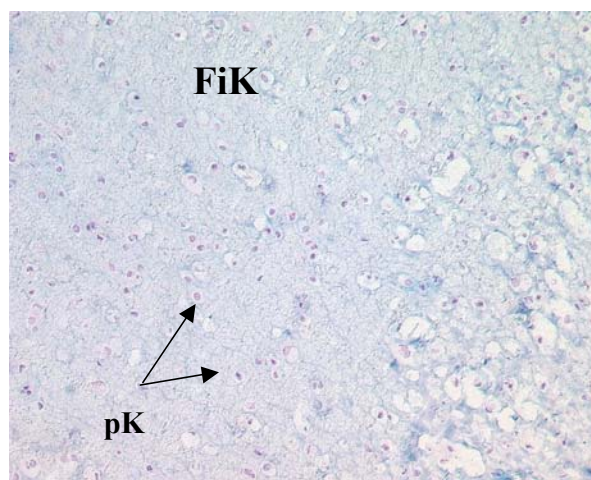


Abbildung 48: Schwein 5, Tag 3; Transplantat Fibrinkleber und Chondrozyten, Alcianblau-Färbung, 10fache Vergrößerung; pk: pyknotische Chondrozytenkerne, FiK: Fibrinkleber

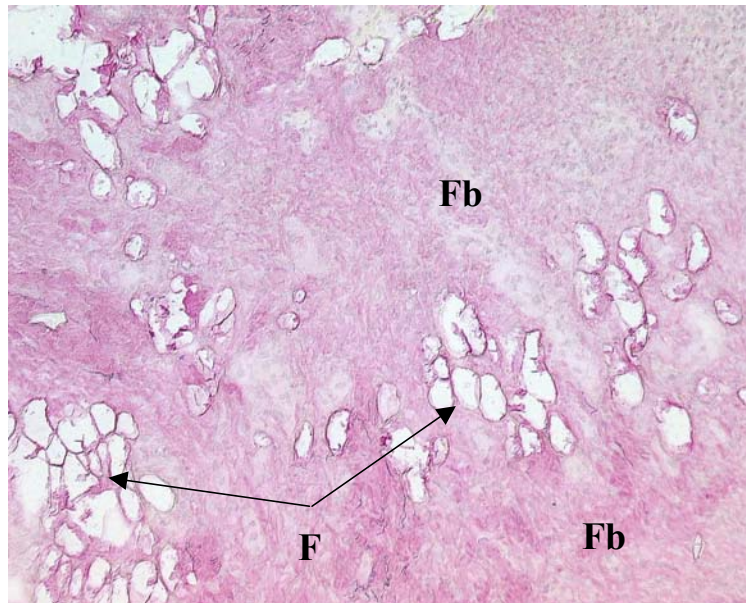


Abbildung 49: Schwein 6, Tag 8; Transplantat Kieselfasern und Fibrinkleber, Elastika-Färbung, 10fache Vergrößerung; F: Kieselfaser, Fb: Fibrose

5.1.5 Blutentnahmen

5.1.5.1 Gesamtleukozytenzahl, Differentialblutbilder

Die ermittelten Zellzahlen in Giga/Liter (G/l) wurden in Abhängigkeit von der Zeit in Graphiken eingetragen (Abbildung 50-51). Die horizontalen Linien markieren dabei den oberen beziehungsweise unteren Normwert.

Bei der Auszählung der Leukozyten war auffällig, dass bei den Ethisorb®-Transplantaten der Schweine 1 und 3 und bei dem Kieselfaser-Schwein 6 fast alle Werte im unteren Normwertbereich lagen. Bei den lokal mit Cortison behandelten Tieren 3 und 6 war zudem am Tag 31 eine geringgradige Leukopenie zu erkennen. Bei den Kieselfaser-Schweinen 4 und 5 wurden höher angesiedelte Leukozytenwerte beobachtet, bei dem mit Cortison systemisch behandelten Schwein Nr. 5 sogar eine geringgradige Leukozytose in der Zeit zwischen Implantation und Explantationstag 16. Insgesamt ist bei fast allen Schweinen eine abfallende Tendenz zu erkennen. Eine Ausnahme bildete das Schwein 1, bei dem am letzten Tag ein Anstieg des Gesamtleukozytengehalts zu verzeichnen war und Schwein 5, deren Werte im mittleren Beobachtungszeitraum nahezu konstant waren (Abbildung 50).

5. Ergebnisse

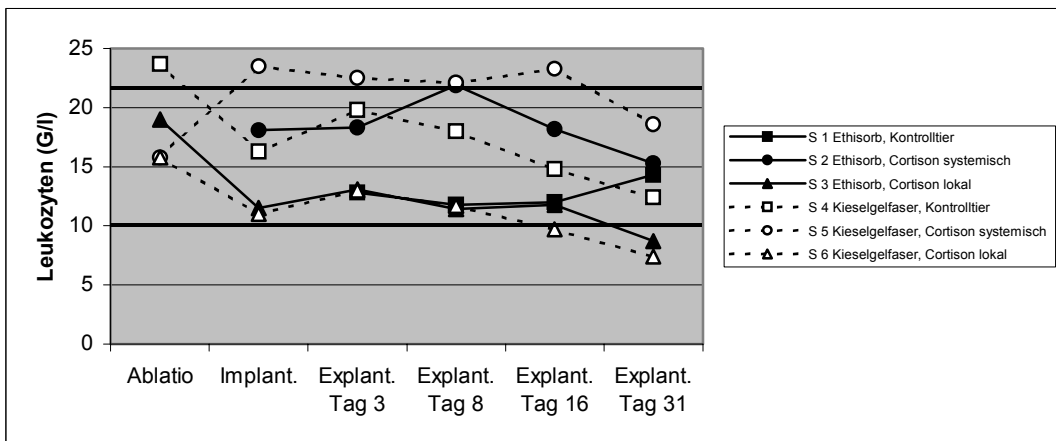


Abbildung 50: Leukozytenkurven der verschiedenen Schweine. Ablatio auris bis Explantation Tag 31

Bei der Differenzierung der Leukozyten lagen die meisten Parameter der Ethisorb®-Tiere im Normbereich. Bei den mit Cortison lokal behandelten Tieren bei beiden Fasermaterialtypen (Schwein 3 und Schwein 6) fiel die Zahl der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten relativ niedrig aus, ohne jedoch eine Neutropenie darzustellen. Das gleiche Phänomen war auch bei dem Ethisorb®-Kontrolltier Schwein 1 ausgebildet. Bei den übrigen Tieren ergaben sich deutlich erhöhte Werte mit ausgeprägter Neutrophilie zwischen Implantation bzw. Tag 8 und Explantationstag 16 (Abbildung 51).

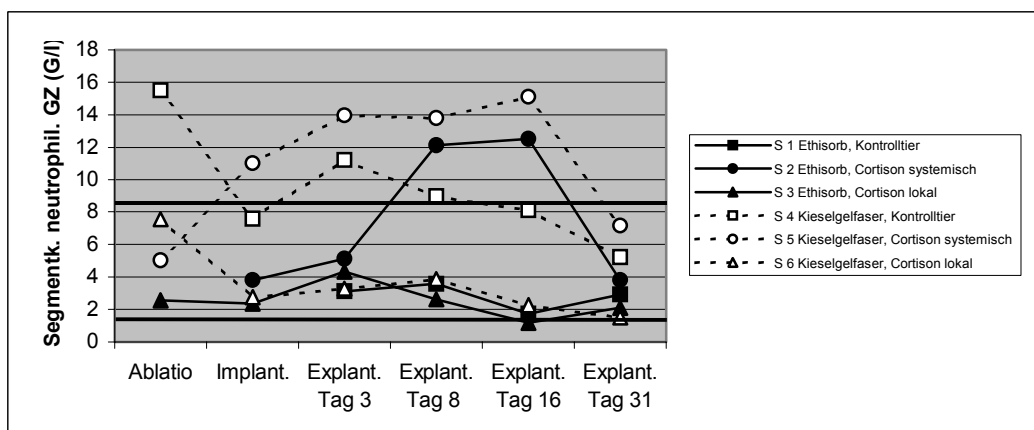


Abbildung 51: Segmentkernige neutrophile Granulozyten-Kurven der verschiedenen Schweine. Ablatio auris bis Explantation Tag 31

Die Lymphozyten lagen während des gesamten Beobachtungszeitraums im Normbereich. Jedoch konnte auch hier eine Verlaufskinetik beobachtet werden, die sich bei allen Tieren ähnelte. Alle Kurven begannen mit einem relativ hohen Lymphozytenwert, der bei fast jedem Tier am 16. Tag nach Implantation seinen Tiefstwert erreicht hatte (Ausnahme Ethisorb®, Cortison lokal, Schwein 3). Ab diesem Zeitpunkt stiegen die Werte wieder an (Abbildung 52).

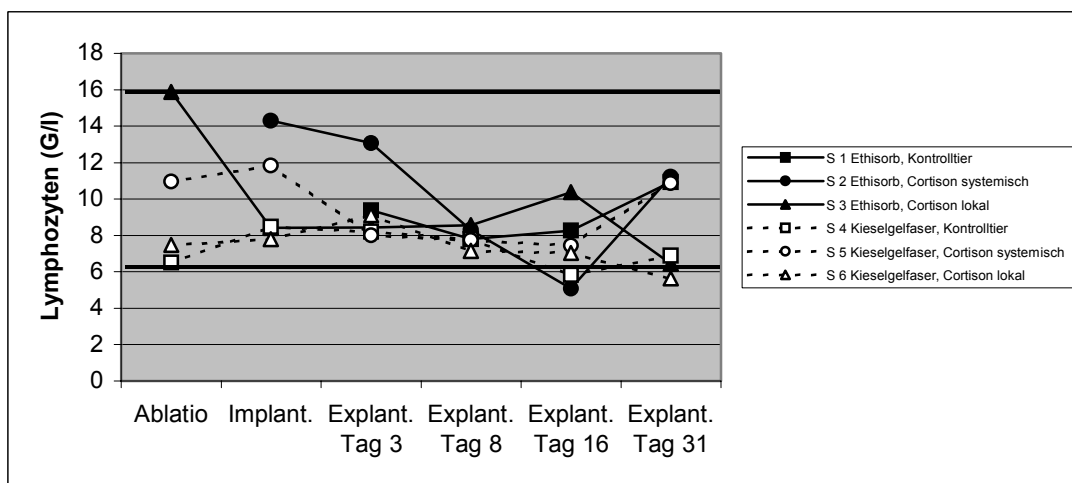


Abbildung 52: Lymphozyten-Kurven der verschiedenen Schweine. Ablatio auris bis Explantation Tag 31

5.1.5.2 Glukosebestimmung, Serumelektrolytwerte

Die Glukosewerte aus dem Serum, das zu Beginn der jeweiligen operativen Sitzungen gewonnen worden war, betragen bei den Kontrolltieren im Durchschnitt 4,6 mmol/l (bei Schwein 1) und 4,4 mmol/l (bei Schwein 4). Bei den Tieren mit der lokalen Cortisonapplikation schwankten die Werte zwischen 3,4 mmol/l und 7,6 mmol/l und ergaben einen Durchschnittswert von 5,23 mmol/l (Schwein 3) bzw. bei Schwein 6 schwankten sie zwischen 4,0 mmol/l und 5,6 mmol/l (im Durchschnitt 4,8 mmol/l). Die Tiere, die Cortison systemisch appliziert bekamen, wiesen Werte auf zwischen 2,9 mmol/l und 5,7 (im Durchschnitt 4,28 mmol/l, Schwein 2) bzw. zwischen 4,7 mmol/l und 5,6 mmol/l (im Durchschnitt 5,27 mmol/l, Schwein 5). Damit lagen alle Werte im Normbereich bzw. leicht darunter.

Die Elektrolytwerte Natrium, Kalium und Calcium zeigten keine signifikanten Abweichungen von der Norm. Sie lagen bei allen Tieren im unteren Normwertbereich bzw. leicht darunter.

Die Chloridwerte lagen bei den Schweinen bei ca. 100 mmol/l, lediglich bei den Schweinen 4 und 6 aus der Kieselgelfasergruppe traten unabhängig von einer Cortisonbehandlung Schwankungswerte zwischen 97 mmol/l und 111 mmol/l auf.

5.2 *In vitro* Untersuchungen

5.2.1 Auswirkungen von Fetalem Kälberserum beziehungsweise von Schweineserum auf die Chondrozyten *in vitro*

Wie in Abbildung 53 und Tabelle 9 ersichtlich zeigte sich bei durchgängig mit FCS amplifizierten Chondrozyten ein deutlich anderes mikroskopisches Bild als bei den ausschließlich mit Schweineserum (SS) beziehungsweise im Verlauf von FCS auf Schweineserum umgestellten Chondrozytenkulturen. Bei den FCS-Ansätzen I und II waren die Zellen zunächst kugelig und wurden fibroblastoid, sobald sie sich am Flaschenboden abgesetzt hatten: Sie waren flach spindelförmig mit multiplen Zellausläufern (Abbildung 53).

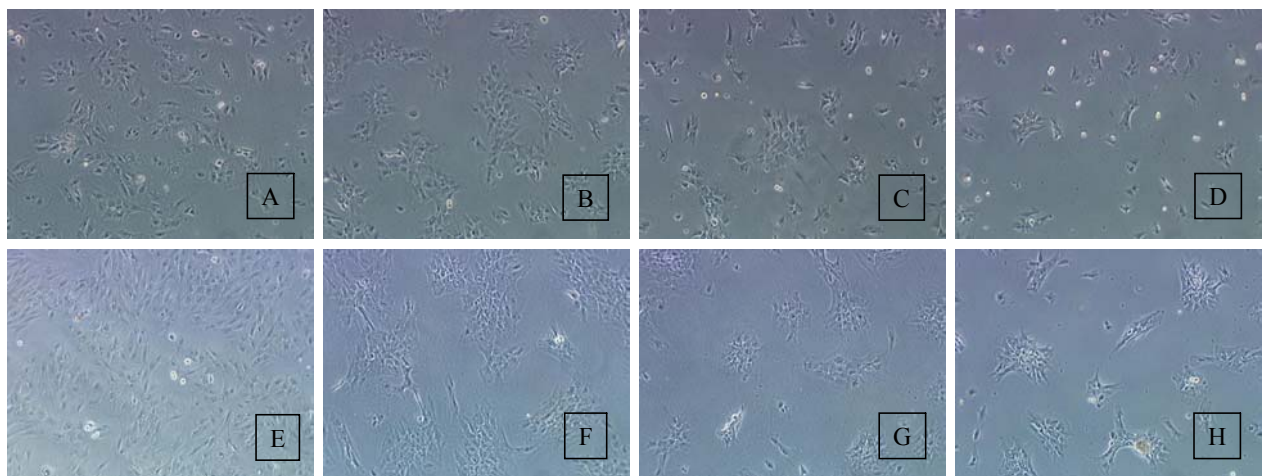


Abbildung 53 A bis H: Amplifizierung der Chondrozyten mit zwei verschiedenen Serumzusätzen in der Monolayerkultur

- A: Tag 12, Ansatz I, Konfluenz ca. 40-50 %, FCS
- B: Tag 12, Ansatz II, Inselbildung, SS
- C: Tag 12, Ansatz III, kleine Zellinseln, Nodules, SS
- D: Tag 12, Ansatz IV, kleine Zellinseln, kleine Nodules, SS
- E: Tag 14; Ansatz I, Konfluenz ca. 80%, FCS
- F: Tag 14, Ansatz II, große Nodules, SS
- G: Tag 14, Ansatz III, mittelgroße Nodules, SS
- H: Tag 14, Ansatz IV, kleine Nodules, SS