

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).

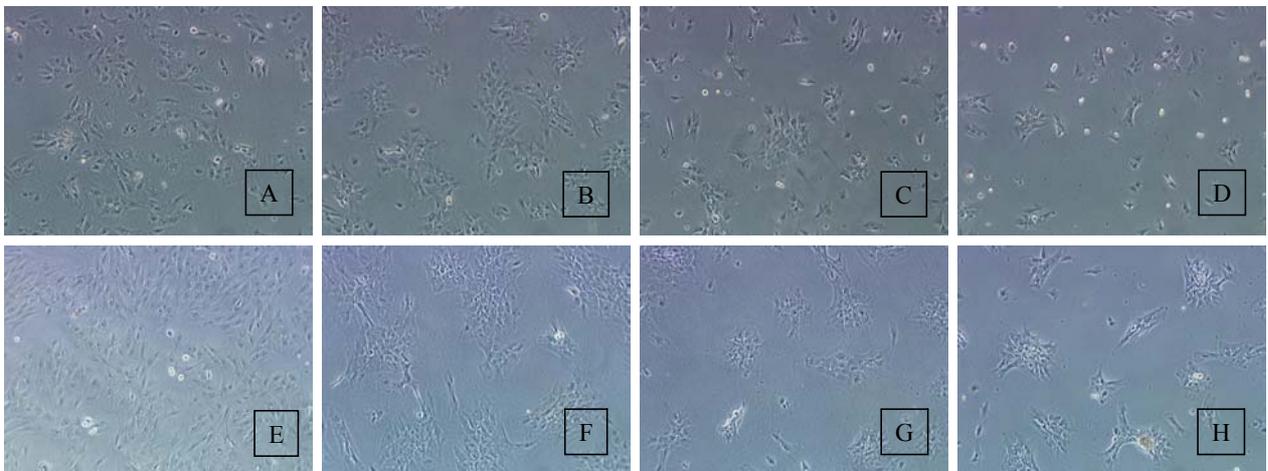


Abbildung 53 A bis H: Amplifizierung der Chondrozyten mit zwei verschiedenen Serumzusätzen in der Monolayerkultur

- 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

Zum Zeitpunkt der ersten Passage am Tag 5 nach der Einsaat hatten sich die Zellen etwa ver-4-facht. Die ausschließlich mit Schweineserum gezogenen Zellkulturen hingegen waren weniger bestrebt, sich zweidimensional auszubreiten. Vielmehr zeigte sich deutlich eine Tendenz zum mehrschichtigen Wachstum und zur Bildung von im Laufe der Zeit immer größer werdenden Zellinseln, sogenannten Nodules, in denen die fibroblastoide Zellmorphologie aufgrund der dichten Übereinanderlagerung nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 53). Bei der ersten Passage zeitgleich mit den anderen Versuchsansätzen zeigte sich, dass sich die Chondrozytenzahl lediglich ver-3,1-facht hatte im Gegensatz zu Ansatz I (ver-4,1-facht), Ansatz II (ver-3,8-facht) und Ansatz III (ver-3,7-facht) (Tabelle 9).

In den Versuchsansätzen III wurde am 2. Tag nach der Zellisolierung, bei Ansatz II nach der zweiten Passage von FCS auf Schweineserum umgestellt, was bewirkte, dass die Zellen daraufhin sofort ihr Wachstumsverhalten und ihre Zellmorphologie änderten. Es zeigte sich ein ähnliches mikroskopisches Bild wie bei den ausschließlich mit Schweineserum amplifizierten Zellen (Abbildung 53). Zum Zeitpunkt der dritten Passage sah man, dass zwischen den Ansätzen I bis III kein gravierender Unterschied zwischen den Zellzahlen (Vermehrungsfaktor 1,1 bis 2,0) bestand. Lediglich bei Versuchansatz IV (reine Schweineserumkultur) hat die Zahl der vitalen Zellen bis zum Abschluss des Versuchs stetig abgenommen und betrug nur noch das 0,9-Fache an Zellen, die nach der zweiten Passage eingesät worden waren (Tabelle 9).

5. Ergebnisse

Tabelle 9: *In vitro* Untersuchung des Einflusses von fetalem Kälberserum (FCS) und adultem Schweineserum (SS) auf die Monolayerkultivierung von porcinen Ohrchondrozyten.

Tag		Ansatz I	Ansatz II	Ansatz III	Ansatz IV
0	Aussaat	FCS	FCS	FCS	SS
2	Mediumwechsel	FCS	FCS	SS	SS
3	Beurteilung	Zellen fibroblastoid, ca. 50 % Konfluenz	Zellen fibroblastoid, ca. 50 % Konfluenz	gleichmäßiger Zellrasen mit einzelnen Zellinseln	einzelne runde adhärenzte Zellen, sich deutlich überlagernde Zellen (Nodule-Ausbildung)
4	Beurteilung, Mediumwechsel	Konfluenz bis 70 %; einzelne runde adhärenzte Zellen; FCS	Konfluenz bis 80 %; einzelne runde adhärenzte Zellen, kaum sich überlagernde Zellen; FCS	Konfluenz ca. 70 - 80%, kaum sich überlagernde Zellen; SS	Inselbildung, Nodules, Konfluenz ca. 50 - 70 %; SS
5	Beurteilung, 1. Passage	Konfluenz ca. 90 - 95 %, einzelne sich überlagernde Zellen; Passage: 4,1-fache Zellzahl, Wiederaussaat mit FCS	Konfluenz ca. 85 - 95 %, einzelne sich überlagernde Zellen; Passage: 3,8-fache Zellzahl, Wiederaussaat mit FCS	konfluierende Nodules; Passage: 3,7-fache Zellzahl; Wiederaussaat mit SS	viele große Nodules, z.T. kleine Nodules; Passage: 3,1-fache Zellzahl; Wiederaussaat mit SS
8	Beurteilung, Mediumwechsel	Konfluenz ca. 60 - 70 %; FCS	Konfluenz ca. 40 - 50 %; FCS	viele mittelgroße Zellinseln; SS	viele kleine Zellinseln, Nodules; SS
10	Beurteilung, 2. Passage	Konfluenz ca. 95 - 97 %; Passage: 2,0-fache Zellzahl, Wiederaussaat mit FCS	Konfluenz ca. 80 - 90 %; Passage: 2,0-fache Zellzahl, Wiederaussaat mit SS	große Nodules; Passage: 2,2-fache Zellzahl, Wiederaussaat mit SS	Passage: 1,8-fache Zellzahl, Wiederaussaat mit SS
12	Beurteilung, Mediumwechsel (Abbildung 53)	Konfluenz ca. 40 - 50 % FCS	Inselbildung; SS	kleine Zellinseln, Nodules, SS	kleine Zellinseln und kleine Nodules, SS
14	Beurteilung, 3. Passage	Konfluenz ca. 80 %; Passage: 1,8-fache Zellzahl	große Nodules; Passage: 2,0-fache Zellzahl	mittelgroße Nodules, Passage: 1,1-fache Zellzahl	kleine Nodules; 0,9-fache Zellzahl

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

In allen Transplantaten (sowohl in Konstrukten mit Kieselgelfasern als auch in reinen Fibrinkleber-Chondrozyten-Transplantaten) wurden Chondrozyten nachgewiesen (Ausnahme Woche 0/Ablatio bei „Kieselgelfasern, Fibrin und Chondrozyten“). Sie erschienen

5. Ergebnisse

mikroskopisch in der HE-Färbung verschiedengradig degeneriert. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Kultivierungsdauer und Ausmaß der Zelldegeneration bestand insofern, als in der Woche 0 eine geringere, zu späteren Zeitpunkten eine stärkere Zelldegeneration festgestellt werden konnte.

Bei der Kultivierung der Konstrukte aus Kieselgelfasern, Fibrin und Chondrozyten war zu beobachten, dass alle der in der Woche 0 untersuchten Präparate eine mittelgradige Degeneration aufwiesen. In der Woche 1, 2 und 4 bis zur 2. Passage waren die Zellen mittel- bis hochgradig geschädigt. In den Transplantaten mit Chondrozyten aus der 3. und 4. Passage waren die Zellen aus der 1. Woche hochgradig degeneriert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Kieselgelfasern, Fibrinkleber und Chondrozyten. *In vitro* Kultivierung von Transplantaten bis zu 8 Wochen, deren Zellen aus der Ablatio auris, der 1., 2., 3. und 4. Passage stammen; -, ' nicht untersucht

		Kieselgelfasern + Fibrin + Chondrozyten			
		Kultivierungsdauer über			
Transplantatbau mit Zellen von	0 Wochen	1 Woche	4 Wochen	8 Wochen	
Ablatio auris	keine Chondrozyten nachweisbar	Chondrozyten im Randbereich; hochgradig degenerativ	wenige Chondrozyten, hochgradig degeneriert, lytische Zellkerne	Chondrozyten im Randbereich; mittelgradig degenerativ	
1. Passage	mittelgradig degenerierte Chondrozyten	unklarer Zelltyp, einzelne Kernschatten	unklarer Zelltyp, einzelne Kernschatten	mittelgradig degenerierte Chondrozyten	
2. Passage	mittelgradig degenerierte Chondrozyten	mittel-hochgradig degenerierte Chondrozyten	mittel-hochgradig degenerierte Chondrozyten (?)	Kernschatten	
3. Passage	mittelgradig degenerierte Chondrozyten	hochgradig degenerierte Chondrozyten	Kernschatten	-	
4. Passage	zahlreiche mittelgradig degenerierte Chondrozyten	hochgradig degenerierte Chondrozyten	hochgradig degenerierte Chondrozyten	-	

Auch in dem Versuchsansatz ohne Verwendung eines Fasergerüsts zeigten sich Degenerationserscheinungen der Chondrozyten, die jedoch nicht so stark ausgeprägt waren wie in den fasernhaltenden Konstrukten. In der Woche 0 waren gering- bis mittelgradige

degenerierte Zellen zu erkennen unabhängig davon, aus welcher Passage die Knorpelzellen stammten. In den folgenden Wochen gab es Unterschiede im histologischen Erscheinungsbild in Bezug auf das Alter der Chondrozyten: Frisch isolierte Zellen lieferten bis Woche 4 gering- bis mittelgradig degenerierte Zellen. In den Konstrukten mit Chondrozyten aus der 1. Passage waren mittel- und hochgradige Zellschädigungserscheinungen nachzuweisen. Die 2. bis 4. Passage lieferte ab Woche 1 nur hochgradig veränderte Chondrozyten. Diese zeigten einen uncharakteristischen Zelltyp, die Zellen lagerten nicht in typischer Chondron-Formation und teilweise waren lediglich Kernschatten auszumachen.

Auffällig war ferner, dass die Zellen, die aus der 2., 3. und 4. Passage zum Transplantatbau verwendet worden waren, in einer Substanz lagerten, die an Knorpelmatrix erinnerte. Alternativ konnte es sich auch um Fibrinkleber handeln, was v.a. in der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraums wahrscheinlich schien (Tabelle 11).

In ergänzenden Färbungen stellten sich die Präparate der 4. Woche besonders schön dar (Alcianblau, Abbildung 54; Elastika, Abbildung 55). Hier konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der Grundsubstanz um Knorpelmatrix handelte, die größtenteils im Untergang begriffen war.

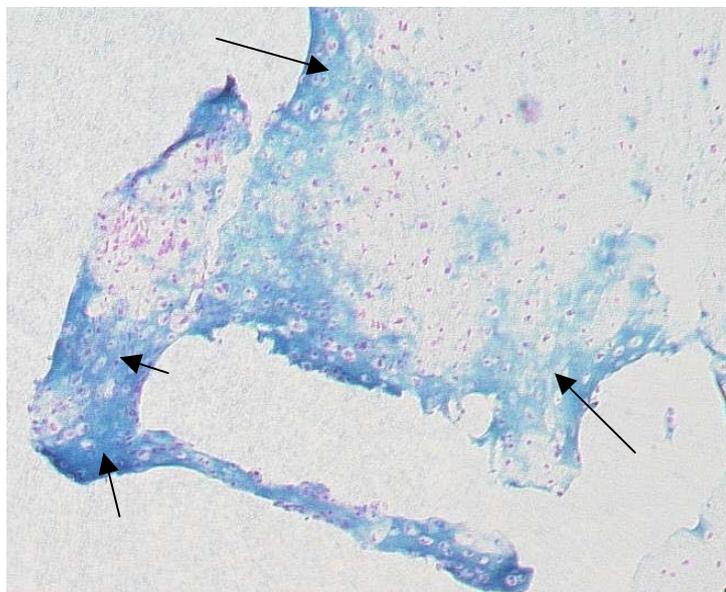


Abbildung 54: Kieselgelfaser-Transplantat, Chondrozyten aus 4 Passage, 4 Wochen *in vitro*, Alcianblaufärbung, 10-fache Vergrößerung; blau sich darstellende im Untergang begriffene Knorpelinseln (Pfeile); Knorpelmatrix mit teils pyknotischen, teils vitalen Zellkernen.

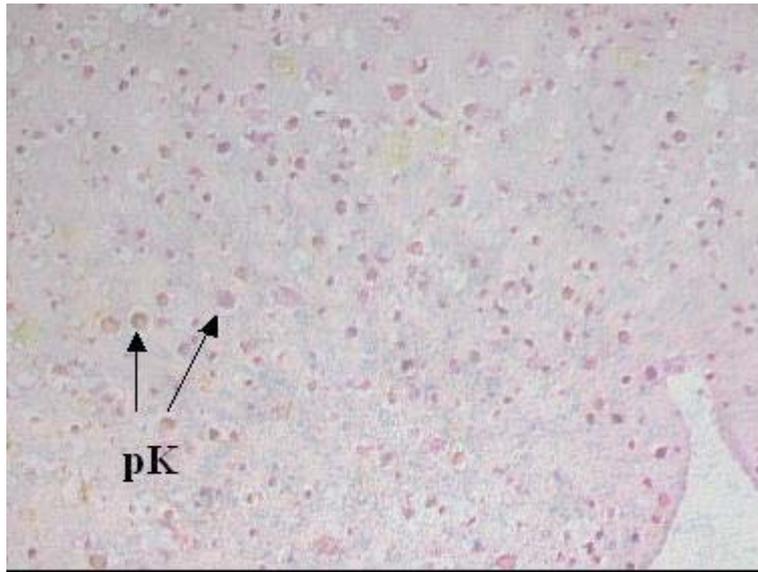


Abbildung 55: Kieselgelfaser-Transplantat, Chondrozyten aus 4. Passage, 4 Wochen *in vitro*, Elastikafärbung, 20-fache Vergrößerung; pK: pyknotische Zellkerne in vornehmlich untergegangener Knorpelmatrix.

5. Ergebnisse

Tabelle 11: Fibrinkleber und Chondrozyten. *In vitro* Kultivierung von Transplantaten bis zu 8 Wochen, deren Zellen aus der Ablatio auris, der 1., 2., 3. und 4. Passage stammen; Beurteilung der HE-Färbung; ‚-‘ nicht untersucht

		Fibrin + Chondrozyten			
		Kultivierungsdauer über			
Transplantatbau mit Zellen von	0 Wochen	1 Woche	4 Wochen	8 Wochen	
Ablatio auris	gering-mittelgradig degenerierte Chondrozyten, Kernschatten	mittelgradig degenerierte Chondrozyten	gering-mittelgradig degenerierte Chondrozyten	gering-mittelgradig degenerierte Chondrozyten	
1. Passage	mittelgradig degenerierte Chondrozyten, Kernschatten	hochgradig degenerierte Chondrozyten	mittel-hochgradig degenerierte Chondrozyten	mittelgradig degenerierte Chondrozyten	
2. Passage	mittelgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	
3. Passage	mittel- bis hochgradig degenerierte Chondrozyten	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	
4. Passage	gering-mittelgradig degenerierte Chondrozyten	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	hochgradig degenerierte Chondrozyten, nicht klar auszumachende Substanz: Fibrin oder untergegangene Knorpelmatrix	-	

5.2.3 *In vitro* Kultivierung verschiedener Transplantate

Mit Hilfe von Schweinechondrozyten aus dieser Studie wurden Transplantate konstruiert, die parallel *in vitro* kultiviert wurden (Tabelle 12). Bei einem Transplantat (*) stammten die Zellen von einem Schwein einer vorherigen Studie. Zwei Transplantate, die nach der Methode der Versuchstiergruppe 1 gebaut und kultiviert worden waren, zeigten eine Knorpelbildung mit degenerativen Chondrozyten in nicht knorpelspezifischer Anordnung der Chondrone (Abbildung 56). Die sich in einem anderen Präparat in der HE-Färbung nur schwach violett anfärbende Knorpelmatrix war arm an elastischen Fasern und zahlreiche im Untergang begriffene Chondrozyten und Kernschatten waren auszumachen. Ein ähnliches Bild mit stärker angefärbten Zellen lieferte eine Alcianblau Färbung (Abbildung 57). Vergleichbare Resultate lieferten auch die parallel zur Versuchstiergruppe 2 *in vitro* kultivierten Konstrukte: zunächst erkannte man mittelgradig, später hochgradig veränderte Chondrozyten.

Tabelle 12: *In vitro* Kultivierung verschiedener Transplantate parallel zur *in vivo* Studie

Methode entsprechend der	Konstrukt	<i>in vitro</i>	Beobachtungen
Versuchstiergruppe 1	Ethisorb® + Fibrin + Chondrozyten*	10 Monate	minderwertiger Knorpel (Abbildung 56, B und D)
	Fibrin + Chondrozyten	16 Tage	degeneriert veränderter Knorpel, Fibroblasten (Abbildung 57, A und B)
Versuchstiergruppe 2	Fibrin + Chondrozyten	3 Monate	hochgradig degenerierte Chondrozyten, Kernschatten
	Kieselgelfasern + Fibrin + Chondrozyten	1 Tag	mittelgradig degenerierte Chondrozyten
	Fibrin + Chondrozyten	1 Tag	mittelgradig degenerierte Chondrozyten

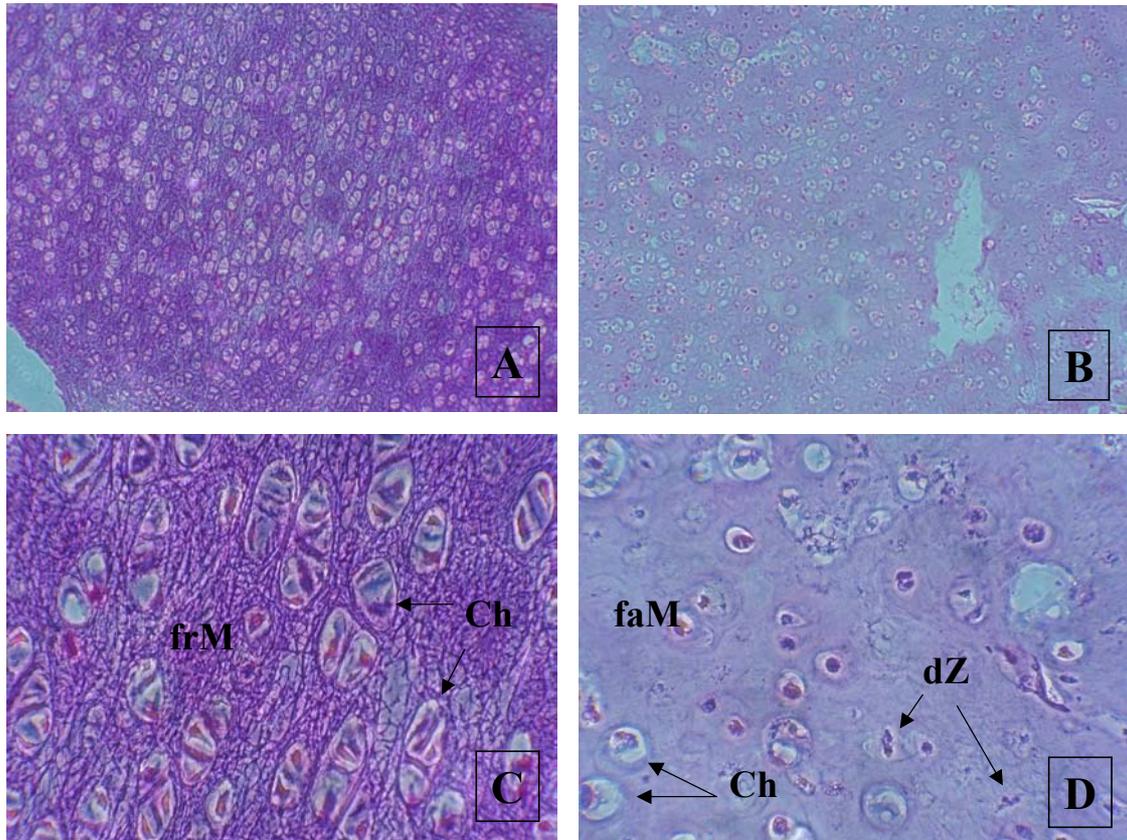


Abbildung 56, A-D: HE-Färbung; A: nativer Knorpel, 100fache Vergrößerung; B: *in vitro* Knorpel nach zehnmonatiger Kultivierung, 100fache Vergrößerung; C: nativer Knorpel, 400fache Vergrößerung; D: *in vitro* Knorpel nach zehnmonatiger Kultivierung, 400fache Vergrößerung; frM: Knorpelmatrix reich an elastischen Fasern, Ch: Chondron, faM: faserarme Knorpelmatrix, dZ: degenerierte Knorpelzelle

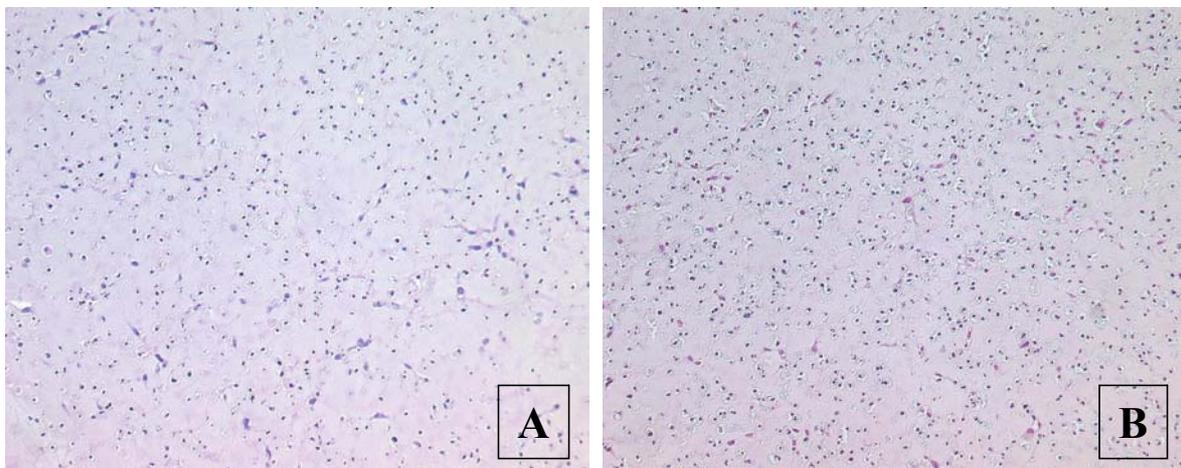


Abbildung 57, A, B: Konstrukt mit Zellen von Schwein, Tag 16 *in vitro*; Transplantat Fibrinkleber und Chondrozyten, 4fache Vergrößerung; A: HE-Färbung, B: Alcianblau Färbung; blau: pyknotische Chondrozytenkerne