

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|------------------------------|--|
| 24-Loch-Platte | Falcon, Heidelberg |
| Autoklaveeinrichtung | Heraeus, Osterode |
| CO ₂ -Brutschrank | Heraeus, Osterode |
| Einmal-Kanülen | Braun Melsungen |
| Einmal-Spritzen | Braun Melsungen |
| Einmal-Spritzenvorsatzfilter | Schleicher und Schuell, Deutschland |
| Falcon Röhrchen (50 ml) | Falcon, Heidelberg |
| Gewebekulturflaschen | Nunc, Brand Products |
| Hämozytometer | Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg |
| Handschuhe | Mikrotouch, Johnson & Johnson, USA |
| Innenlochsäge | Modell 1600, Leitz, Wetzlar, Deutschland |
| Kühlbox | Electrolux RC 1600 |
| Kunststoff Objektträger | Diaplust, Hamburg |
| Laminar-Flow-Bank | Antair BSK, Heraeus, Osterode |
| Magnetrührer Variomac | H+P Labortechniksystem München |
| Mikroskop | Leica Typ DM IL (Routinemikroskop) |
| Nahtmaterial | Seralon, Ethicon, Hamburg |
| Nylonnetz (250 µm) | Reichelt Chemietechnik, Heidelberg |
| Peristaltikpumpe | Ismatec 52 IPN |
| Petrischalen | Cellstar, Labortechnik, Nürtingen |
| Pipettierhilfe | accu-jet, Brand, Wertheim |
| Poliergerät | Exakt GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| Präzisionswaage | Sartorius LA 2305, Deutschland |
| Serologische Pipetten | Falcon, Heidelberg |
| Skalpelle | Bard Parker, Becton Dickson |

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| Spannform | BAM, Dr. Berger |
| Spinnerflaschen | Wheaton, USA |
| Sterile Spitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Ultramikrotom | Ultracut E, Leica, Wien, Österreich |
| Wärmekammer | Heraeus, Osterode |
| Zentrifuge | Beckman GS-6R-Centrifuge |

2.1.2 Reagenzien und Lösungen

| | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| Ascorbinsäure (fest) | Merck, Darmstadt |
| Braunol® | B.Braun, Melsungen |
| Collagenase II | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| Collagenase P | Boeringer, Mannheim |
| Ethanol 96% | Merck, Darmstadt |
| FCS | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| Fibringel | Tissucol Duo S1 |
| Ham's F-12 Medium | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| HANK's Salt Solution | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| Hepes (1 M) | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| Hyaluronidase (fest) | Roth, Karlsruhe |
| Ketamin (50 mg/ml) | Parke-Davis, Berlin |
| L-Glutamin (200 mM) | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| L-Prolin | Sigma Cellculture, St. Louis, USA |
| Methylblau | Sigma- Aldrich, Steinheim |
| NaCl (0,9%) | Braun, Melsungen |
| Nystatin (fest) | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| P/S (10000U/10000 µg/ml) | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| PBS-Dulbecco | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| RPMI 1640 Medium | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| Technovit® | Kulzer & Co., Wehrheim, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Trypanblau (0,2%) | Waldeck (Chroma) GmbH & Co KG, Münster, Deutschland |
| Trypsin/EDTA (10×) 0,5% / 0,2% in PBS (10×) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | Seromed Biochrom KG Berlin |
| Xylazin (2%) | Bayer, Leverkusen |

2.1.3 Medien

Ham's F-12 Medium (1×)

Zusätze: 10 mg/l Phenolrot, 1,176 g/l NaHCO₃, kein L-Glutamin

HANK's Salt Solution (1×)

Zusätze: Phenolrot, kein Ca²⁺, Mg²⁺

Ham's F12-Medium (Zellkulturmedium)

Zusätze: 5% FCS (inaktiviert 56 °C, 30 Minuten), 70 mg/ml Prolin, Glutamin (steril
filtriert), 5 ml Penicillin/Streptomycin, Heparin

RPMI 1640 Medium (1×, Zellkulturmedium)

Zusätze: 10% FCS (inaktiviert 56 °C, 30 Minuten), 5 ml Penicillin/Streptomycin,
Nystatin (Spatelspitze)

2.1.4 Zusammensetzung des Fibrinklebers

Eine Fertigspritze Kleberproteinlösung tiefgefroren 1 ml, enthält:

- 80-120 mg Humanplasmafraktion, 70-110 mg Fibrinogen, 10-50 IE Blutgerinnungsfaktor XIII, 2-9 mg Plasmafibronektin, 0,02-0,08 mg Plasminogen, 3000 KIE Aprotinin (bovin),
- Hilfsstoffe: Natriumcitrat, Natriumchlorid, Glycin, Humanalbumin, Heparin, Triton, Kreatin, Wasser für Injektionszwecke

Eine Fertigspritze Thrombinlösung tiefgefroren 1ml, enthält:

- 500 IE Thrombin (human), 5,88 mg Calciumchlorid \times 2H₂O
- Hilfsstoffe: Natriumchlorid, Glycin, Wasser für Injektionszwecke

2.1.5 Enzymmix

Für 1 kleine Spinnerflasche:

- 30 ml RPMI-Medium mit 10% FCS, P/S, 1 mg/ml Collagenase P, 0,1 mg/ml Hyaluronidase, 0,1 mg/ml Collagenase II

2.1.6 Materialien zur Implantatherstellung

- Hydroxylapatit: sterile Reaktionspackung aus Pulver (Tricalciumphosphat) und Flüssigkeit (Natriumphosphat)
- PGA-PLLA Polymervlies, steril, 10×10×2 mm

2.2 Chondrozytengewinnung und Zellkultur

2.2.1 Gewinnung der bovinen Chondrozyten

Rinderfußgelenke und -kniegelenke (1-2 Tage alt) wurden aus einer Metzgerei in Alt-Glienicke geliefert. Die Gelenkareale wurden mit 70% Alkohol gereinigt und der Knorpel mittels Skalpell abgeschält. Die abgeschälten Knorpelstücke wurden in einem mit RPMI-Medium gefüllten Falcon-Röhrchen aufbewahrt. Das Medium wurde anschließend abgesaugt, die Knorpelstücke mit 70% Alkohol gespült und mit PBS-Lösung gründlich gewaschen. Nachdem die PBS-Lösung abgesaugt war, konnten die Knorpelstücke mit ca. 5-10 ml Medium in eine sterile Petrischale überführt und mittels zweier Skalpelle in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert werden. Die Knorpelstücke wurden in eine autoklavierte Spinnerflasche überführt und der Enzymmix steril zugegeben. Die Spinnerflasche wurde auf einen Magnetrührer gestellt und über Nacht erfolgte die enzymatische Verdauung unter Rühren auf kleiner Stufe bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Am Tag darauf wurde die Zellsuspension durch ein ca. 4×4 cm großes Nylonnetz, das zuvor mit Alkohol 70%

desinfiziert worden war, in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1800 U/min. für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in HANK's-Lösung resuspendiert und zentrifugiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Dann wurde das Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl bzw. Vitalität mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.2 Zellzählung im Hämozytometer

Zur Vitalitätsbestimmung diente die Trypanblau-Methode. Vitale Zellen nehmen Trypanblau nicht auf. Der Farbstoff dringt in geschädigte Zellen ein und färbt deren Zellkern und Zytoplasma blau an. Es wurden 10 μ l Zellsuspension mit 10 μ l Trypanblau gemischt und in die Neubauer-Kammer pipettiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden mit Hilfe der 40fachen Vergrößerung 4 \times 16 kleine Quadrate (entspricht einem großen Quadrat) ausgezählt und daraus das arithmetische Mittel für ein großes Quadrat bestimmt. Mit nachstehender Formel wurde die Zellzahl ermittelt, wobei Z die durchschnittliche Anzahl gezählter Zellen in einem großen Quadrat ist:

$$Z \times 2 \times 5 \times 10^4 = \text{Zahl der gewonnenen Zellen}$$

Der Faktor 2 entspricht der Verdünnung, der durch die Zugabe des Trypanblau entstanden ist. Es wurde eine Fläche von 1 mm² ausgezählt. Daraus ergibt sich ein Faktor von 10⁴, um die Zellen auf 1 ml beziehen zu können. Da die Zellen in 5ml Medium aufgenommen wurden, muss der Faktor 5 einbezogen werden, um die Gesamtzellzahl in einem Röhrchen zu erhalten.

2.2.3 Zellkultur

Zur Kultivierung der isolierten Chondrozyten wurde das Zentrifugat in RPMI 1640 (P/S, 2 mM Glutamin, 10% FCS) resuspendiert, um dann ca. 5-6 Millionen Zellen in jede Kulturflasche (Fläche=175 cm²) auszusäen. Die Chondrozyten wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert, der erste Mediumwechsel erfolgte nach ca. 24 Stunden, nachdem die Zellen auf dem Boden der Kulturflaschen adhärent waren, danach alle 2 Tage unter sterilen Bedingungen. Das Passagieren der Chondrozyten erfolgte bei konfluentem Bewuchs (Abb. 4). Hierzu wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS gespült. Dann wurde eine Trypsin/EDTA- Lösung (1×) in die Kulturflasche gegeben und diese für 5 Minuten im Brutschrank erwärmt. Um die Zellen vollständig zu lösen, wurden die Zellkulturflaschen leichten Erschütterungen ausgesetzt, welche den Ablösevorgang forcieren sollten. Die Trypsinierung der Zellen konnte anschließend mit einer entsprechenden Menge RPMI-Medium (10% FCS, P/S) gestoppt werden und der Inhalt der Flasche mittels einer Pipette homogenisiert und in ein Röhrchen zur Zentrifugation überführt werden. Das Zentrifugieren erfolgte bei 1800 U/min. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert und das Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert, um so die genaue Zellzahl zu bestimmen. Die Zellen wurden auf neue Kulturflaschen verteilt und bis zu drei Mal passagiert, bevor die Implantate gefertigt wurden.

2.3 Herstellung der Implantate

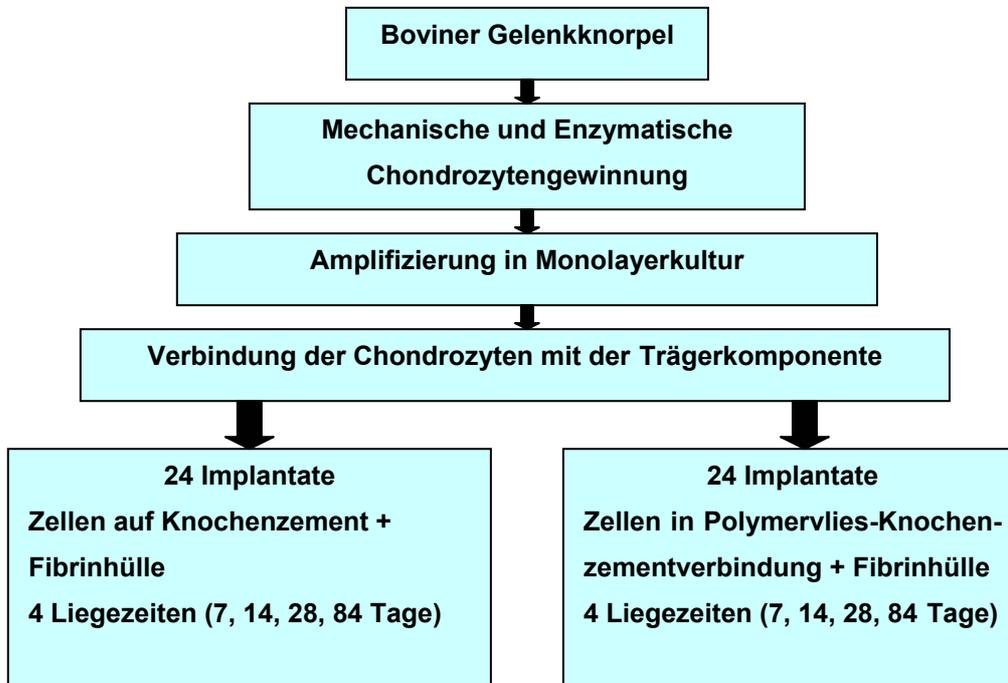


Abb. 1: Schema zur in vitro Herstellung der Implantate.

2.3.1 Die leeren Implantate

Bei der Herstellung der Implantate wurden 24 vorgefertigte Polymervliese mit einer Größe von 10×10 mm und einer Höhe von 2 mm fest mit dem Kalziumphosphat Knochenzement verbunden. Für die 24 anderen Implantate wurden nur Blöcke aus Zement in einer metallenen Form gefertigt. Die Herstellung ist, bis auf das Einbringen des Vlieses in den Zement, identisch mit den folgenden Ausführungen. Für die Implantate mit Polymervlies wurde unter sterilen Bedingungen der Zement von Hand angemischt. Dabei wurden die Pulver- und die Flüssigkeitskomponente zusammengegeben und mit einem Mörser mit ca. 2 Umdrehungen pro Sekunde insgesamt 2 Minuten lang durchmischt. Nach dem Mischen lag eine homogene pastenförmige Konsistenz vor. Die so entstandene Paste wurde nun mit einem Spatel in die aus Metall gefertigte Spannform mit den Abmessungen 10×10×6 mm gegeben. Innerhalb eines Zeitraums von 5 Minuten wurden die Vliese in der Oberfläche des Zements verankert. Dabei wurden sie mit Hilfe eines Stempels ca. 1

mm in die noch weiche Masse gepresst (Abb. 5a und b). Anschließend härteten die so hergestellten Implantate in ihrer Spannform in einem sterilen Transportbehälter für 10 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C und 5% CO₂ aus. Nach dieser Aushärtungsphase wurden die Implantate steril in 24-Loch-Platten mit jeweils ausreichend Medium (RPMI, FCS 10%, P/S) überführt und im Wärmeschrank bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Nach dem Erreichen der endgültigen Festigkeit nach 24 Stunden verblieben sie bis zur weiteren Verarbeitung steril im Wärmeschrank.

2.3.2 Beladen der Implantate mit Chondrozyten

2.3.2.1 Implantate mit Polymervlies

Die aus der Zellkultur gewonnenen Zellen wurden nach der 3. Passage unter sterilen Bedingungen auf die vorher gefertigten Implantate ausgesät. Es wurde eine Zellkonzentration von 30 Mio. Zellen/ml verarbeitet. Bei den verwendeten Vliesen von 10×10 mm und einer Höhe von nunmehr ca. 1 mm ergibt sich ein Volumen von ca. 100 µl für ein einzelnes Vlies, so dass 3 Mio. Zellen pro Implantat benötigt wurden. Diese 3 Mio. Zellen wurden mit Fibrinogen im Verhältnis 1:2 gemischt, d.h. pro Vlies eine Zellsuspension von 67 µl und 33 µl Fibrinogen. Das Thrombin wurde mit PBS 1:10 verdünnt und pro Implantat ca. 250 µl Thrombinlösung benötigt. Die Zell-Fibrinogensuspension ist mit Hilfe einer sterilen Pipette auf den Vliesanteil der Implantate gegeben worden, bis das Vlies vollständig und ohne sichtbare Lufteinschlüsse mit Flüssigkeit vollgesogen war. Anschließend ist mit Hilfe einer sterilen Pipette tropfenweise Thrombinlösung auf das Vlies gegeben worden, bis es vollständig mit Thrombin benetzt war. Um die Polymerisation des Fibrins zu gewährleisten, wurden die Implantate für 5 Minuten steril in den Wärmeschrank (37 °C, 5% CO₂) gegeben (Abb. 6).

2.3.2.2 Implantate ohne Polymervlies

Wie bei den Implantaten mit Vlies, wurde das gleiche Volumen und die gleiche Zellkonzentration verwendet. Die Implantatoberflächen wurden mit der Fibrinogen-Zellsuspension beimpft und danach wurde mit der Thrombinlösung eine

Polymerisierung des Fibrinogens und damit eine Verankerung auf dem Zement erreicht. Die Implantate kamen dann ebenfalls bei oben genannten Bedingungen in den Brutschrank.

2.3.3 Vorkultivierung der Implantate

Die fertigen mit Chondrozyten beladenen Implantate wurden zur Vorkultivierung steril in Zellkulturkammern (Minutissue) überführt. Es handelte sich bei diesen Zellkulturkammern um den Teil eines geschlossenen Perfusionskammersystem, welches mit Hams F12 Medium (FBS, P/S, Prolin, Ascorbin, HEPES) zur Ernährung der Zellen befüllt war (Abb. 7). Dieses System bestand aus einer auf 4 °C gekühlten Flasche mit frischem Medium, einer Peristaltikpumpe mit einer Durchlaufzeit von 1 ml/h, der Perfusionskulturkammer, welche im Brutschrank auf 37 °C erwärmt wurde und einer Auffangflasche für das verbrauchte Medium. Nach 14 Tagen Vorkultivierung in diesen Systemen, wurden die Perfusionskammern unter sterilen Bedingungen geöffnet. Die Implantate wurden einzeln in mit Hams F12 Medium (FBS, P/S, Prolin, Ascorbin, HEPES) befüllte Falcon Röhrchen überführt, welche steril für den Transport verschlossen wurden. Die Implantate wurden in diesen Falconröhrchen steril in einer Wärmebox bei 37 °C zum Operationssaal transportiert.

2.4 Tierexperimente

2.4.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden Nacktmäuse, Stamm CD1 nu/nu homozygot, weiblich (Charles River Wiga, Sulzfeld), mit einem Gewicht zwischen 23,5 g und 40,1 g verwandt. Die Mäuse sind Träger einer Mutation im nude-Gen und zeichnen sich durch Haarlosigkeit und Thymusaplasie und damit einer fehlenden T-Zellpopulation aus. Dadurch ist dieser Stamm nicht immunkompetent und toleriert Allo- und Xenotransplantate. Die Mäuse wurden in durchsichtigen Polycarbonkäfigen (Makrolon[®]) auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Die Raumtemperatur betrug 26 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 60%, die Belichtung 12 h/Tag. Die Ernährung erfolgte mit Altromin[®] Zuchtfutter (Altromin, Gesellschaft für Tierernährung

mbH, Lage) und Leitungswasser⁹⁷. Die Tiere wurden von Fachpersonal betreut. Insgesamt wurden 24 Mäuse, 6 pro Liegezeit, untersucht. Der Tierversuch wurde 1999 durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin mit der Genehmigungs-Nummer G 0149/99 genehmigt.

2.4.2 Betäubung der Versuchstiere

10 ml Ketamin (50 mg/ml) wurden mit 1,6 ml Xylazin (2%) gemischt. Aus dieser Lösung wurden 250 µl in eine 1 ml Spritze aufgezogen und mit 750 µl NaCl (0,9%) verdünnt. Nach dem gründlichen Mischen wurden 250 µl pro Maus injiziert.

2.4.3 Operationsverfahren

2.4.3.1 Implantation

Die Vliese wurden aus der 24-Loch-Platte zur Aufbewahrung in ein Falconröhrchen mit Ham's F12-Medium überführt. Der Operationstisch wurde mit Tüchern doppellagig bedeckt, um ein Auskühlen der betäubten Mäuse zu verhindern und einen sauberen Untergrund zu gewährleisten. Das Betäubungsmittelgemisch wurde intramuskulär in die Außenseite der Hinterbeine gespritzt. Die Wirkung der Betäubung trat individuell, spätestens nach 10 Minuten ein. Die Mäuse wurden bäuchlings auf den Operationstisch gelegt und der Rücken der Maus mit einer Jodlösung großzügig desinfiziert. Anschließend wurde mit einer chirurgischen Pinzette die Haut des Tieres angehoben und quer in der Nackenfalte mit der Schere inzidiert. An diesem Bereich des Rückens erfolgte nun eine stumpfe subkutane paravertebrale Präparation auf beiden Seiten. In die so geformten Taschen wurden nun jeweils links und rechts ein Implantat mit und eines ohne Vlies mit der Pinzette unter die Haut, möglichst weit vom Schnitt, Richtung Schwanz geschoben, so dass die Implantate suprailiakkal positioniert waren (Abb. 8). Das Implantat wurde so orientiert, dass die Knorpelphase zur Muskelfaszie zeigte. Der Wundverschluss erfolgte durch drei Einzelknopfnähte mit Seralon. Die Wunde wurde nochmals mit einer Jodlösung großzügig betupft. Das Implantat behinderte die Maus nicht in ihren Bewegungen. Die postoperative Therapie erfolgte mit Paracetamol Sprühpflaster.

2.4.3.2 Explantation

Die Versuchstiere wurden nach 7, 14, 28 und 84 Tagen in eine Kammer gegeben, die mit CO₂ gefüllt war. Nachdem der Herz- Kreislaufstillstand eingetreten war, wurden die Implantate mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette entnommen und für die weitere Verwendung aufgeteilt. Es wurden 5 Implantate für die Lichtmikroskopie aufgearbeitet, die verbleibende Probe wurde für andere Experimente verwendet, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren.

2.5 Präparation

Die Proben für die Lichtmikroskopie wurden in Formaldehyd-Lösung nach Lillie fixiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Daraufhin wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Äther-Chloroform entfettet. Schließlich wurden die Proben über vier weitere Stufen in Methylmetacrylat eingebettet. Nach mehrtägigem Aushärten des Kunststoffes in einem 38 °C warmen Wasserbad wurden die gewonnenen Kunststoffblöcke mit Hilfe einer Handsäge und einer Handfeile getrimmt, diese kleineren Kunststoffblöcke wurden nun mit Technovit (Kulzer & Co., Wehrheim, Deutschland) auf einem Metallteller montiert. Es wurde dabei versucht, eine möglichst optimale Ausrichtung der Längsachse des Implantates zum Metallhalter und somit zur späteren Schnittführung zu erreichen. Der Objekthalter wurde in die zugehörigen Innenlochsäge (Modell 1600, Leitz, Wetzlar, Deutschland) eingespannt. Vor jedem Schnitt wurde ein Kunststoff Objektträger (DIAPLUS) direkt mit Sekundenkleber (Instandbond GmbH, Berlin, Deutschland) auf den in die Innenlochsäge eingespannten Präparateblock geklebt. Mit der Innenlochsäge wurden von den Implantaten Schnitte von 50 µm Dicke angefertigt. Die so gewonnenen Schnitte wurden anschließend unter mikroskopischer Kontrolle auf einem halbautomatischen Poliergerät (Exakt GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit Nass-Schleifpapier einer 2000er Körnung poliert. Anschließend wurden pro Implantat ein Schnitt nach Giemsa und ein Schnitt nach von Kossa und Paragon gefärbt. Die Färbung wurde entsprechend den von Gross und Strunz entwickelten Modifikationen angewandt³⁷.

2.6 Auswertung

2.6.1 Qualitative Auswertung

Die einzelnen Schnitte der Implantate wurden nach der histologischen Färbung qualitativ begutachtet, wobei das Augenmerk besonders auf der Gewebe- und Materialantwort lag. Bei der Gewebeantwort galt es die Reaktion des Nacktmausgewebes zu untersuchen. Die morphologischen Veränderungen standen bei der Materialantwort im Vordergrund. Besonderes Interesse galt der Knorpelschicht der Implantate, hier wurde die Regeneration bzw. Integration untersucht.

2.6.2 Histologischer Score

Um eine semiquantitative Auswertung der Histologie vornehmen zu können, wurde, in Anlehnung an den von Wakitani¹⁰² definierten Score für Gelenkknorpel, ein Score für gezüchteten Knorpel im Subkutanmodell benutzt. Jedes lichtmikroskopische Implantat wurde nach den folgenden Merkmalen bewertet: Zellmorphologie, Matrixfärbung, Oberflächenregularität, Knorpeldicke und Stabilität des Implantats. Modifizierungen wurden an den Kriterien „Knorpeldicke“ und „Integration“ vorgenommen. Die Knorpeldicke wird, im Gegensatz zu Wakitani, nicht nach der Dicke des Knorpels in der angrenzenden, natürlichen Knorpelschicht, sondern nach der Anzahl der Zellschichten bewertet. Entsprechend dem Subkutanmodell konnte die Einheilung des Transplantates in einen osteochondralen Defekt nicht beurteilt werden. Statt dem Kriterium „Integration“ bei Wakitani, nach dem die Einheilung des Transplantates in den Rand des Defekts beurteilt wird, wurde die Stabilität des Implantates bewertet. Darunter werden die mechanische Stabilität des Zements und der Verbleib der eingebrachten Zellen am ursprünglichen Ort subsumiert. Von den ermittelten Werten wurde für jede Liegezeit der Mittelwert errechnet. Je kleiner die Punktzahl, desto besser war das Ergebnis in der jeweiligen Kategorie. Ein niedriger Score bedeutet demnach hohe Ähnlichkeit zu hyalinem Gelenkknorpel und eine hohe Transplantatstabilität. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da der Score nicht linear angelegt, bzw. nicht zwischen den 5 Kategorien vergleichbar ist.

| Kategorie | Punkte |
|--|-----------|
| Zellmorphologie | |
| Hyaliner Knorpel | 0 |
| Überwiegend hyaliner Knorpel | 1 |
| Überwiegend Faserknorpel | 2 |
| Überwiegend kein Knorpel | 3 |
| Kein Knorpel | 4 |
| Matrixfärbung (Metachromasie) | |
| Normal (im Vergleich zum normalen Knorpel) | 0 |
| Gering reduziert | 1 |
| Deutlich reduziert | 2 |
| Keine Metachromasie | 3 |
| Oberflächenregularität | |
| Glatt ($> 3/4$) | 0 |
| Moderat ($> 1/2 - 3/4$) | 1 |
| Irregulär ($1/4 - 1/2$) | 2 |
| Hochgradig irregulär ($< 1/4$) | 3 |
| Knorpeldicke | |
| > 10 Zellschichten | 0 |
| 5–10 Zellschichten | 1 |
| < 5 Zellschichten | 2 |
| Stabilität des Implantats | |
| Zellen bzw. Vlies am ursprünglichen Ort, Zementstruktur erhalten | 0 |
| Zellen/Vlies nicht am ursprünglichen Ort <u>oder</u> Zementstruktur zerstört | 1 |
| Zellen/Vlies nicht am ursprünglichen Ort <u>und</u> Zementstruktur zerstört | 2 |
| Maximale Punktzahl | 14 |

Tab. 1: Histologischer Score für Knorpeldefekte nach Wakitani¹⁰², modifiziert.

2.6.3 Histomorphometrie

2.6.3.1 Messungen

Definiert wurde das Implantatbett als eine idealisierte Fläche, basal der Knochenzement und apikal die sich anschließende Knorpelschicht, die vermessen wurde. Die Höhe der Knorpelschicht wurde an je einem lichtmikroskopischen Schnitt der Implantate, immer an den Rändern und alle 100 µm senkrecht zur Oberfläche des Knochenzements, morphometrisch in Mikrometer bestimmt. Als Maß für eine glatte Oberfläche wurde aus den Werten der Knorpelhöhen die Varianz bestimmt. Dabei wurde eine hohe Varianz als unregelmäßige Oberfläche gewertet. Des

Weiteren wurden die Flächen der matrixbildenden Bereiche in der Knorpelschicht relativ in Flächenpunkten (nicht-metrische, lineare Computereinheit) bestimmt. Dabei wurden jeweils zwei lichtmikroskopische Schnitte jedes Implantates vermessen. Da es zwischen den einzelnen Präparaten Abweichungen in der Breite gab, wurde zusätzlich die Breite gemessen und die Fläche auf die ursprüngliche Transplantatbreite von 10 mm bezogen, um die Präparate vergleichbar zu machen. Die vollständige Auflistung der vermessenen Parameter kann dem Anhang entnommen werden (Kapitel 6.2). Die Messungen wurden mit der modifizierten Software Morph[®] (Systec, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Als Hardware-Umgebung diente ein herkömmlicher PC. Ein Matrox[®] Grafik Board (Rauscher GmbH, München, Deutschland) stellte die Verbindung zu einer handelsüblichen Video-Kamera her, über die die zu vermessenden Bildausschnitte eingespielt wurden.

2.6.3.2 Auswertung

Zunächst wurde mit Hilfe einer explorativen Datenanalyse die Verteilung der Messparameter bestimmt. Für die Messwerte der Flächen lag eine Normalverteilung vor, somit wurde mit Hilfe des T-Tests für nicht verbundene Stichproben eine Überprüfung der Nullhypothese durchgeführt. Da die Messwerte für die Knorpelhöhen und deren Varianz nicht normalverteilt waren, erfolgte die Überprüfung der Nullhypothesen mit dem Mann-Whitney U-Test. Die Auswertung erfolgte mit dem Software Programm SPSS[®] 11.5 (SPSS inc., Chicago, USA). Da der Test für jede Liegezeit durchgeführt wurde und sich damit bei einem Mehrfachvergleich der Fehler 1. Art erhöht, wurde eine Signifikanzniveauekorrektur nach Bonferroni durchgeführt. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit α ergab sich damit $\alpha' = \alpha/n$, wobei n für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche steht. Im vorliegenden Fall ergibt sich damit für α' 0,0125 (bei einer zu Grunde liegenden Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5%), da 4 Liegezeiten miteinander verglichen wurden. Bei Unterschreitung des jeweiligen kritischen Wertes für α wurde die jeweilige Nullhypothese (die Gruppen unterscheiden sich nicht bezüglich der untersuchten Parameter) abgelehnt. Geringgradige Überschreitungen von α wurden als Trend gewertet.