

3 Ergebnisse

3.1 Osteochondrale Biphasen ohne PGLA-Vlies

3.1.1 7 Tage Liegezeit

3.1.1.1 Makroskopie

Nach der Explantation war die ursprüngliche Zellschicht als milchig glänzende Schicht erkennbar (Abb. 9). Makroskopisch ist bei den gefärbten Schnitten an keinem der Präparate dieser Liegezeit eine Knorpelschicht erkennbar. Allerdings sieht man oft schon ohne zu Hilfenahme des Mikroskops Risse im Zement. Die Risse sind dabei in den von Kossa und Paragon Präparaten dunkel angefärbt. Die oberflächlichen Schichten des Quaders sind stärker gefärbt. Meistens ist der Zementblock glatt begrenzt, es gibt jedoch auch Präparate mit einer sehr unregelmäßigen Oberfläche. Die Haut der Nacktmaus umschließt bei den meisten Implantaten über die Hälfte der Oberfläche, da sie zusammen mit dem Implantat entfernt wurde, dem sie anhaftete. Bei einem Teil der Präparate erkennt man ohne Mikroskop eine dünne fibröse Schicht, die kräftig gefärbt ist und sich von der Haut ausgehend um das Implantat legt.

3.1.1.2 Lichtmikroskopie

Mikroskopisch ist überwiegend eine dünne Zellschicht auf der mit Zellen beimpften Seite des Zements zu erkennen. Diese ist durchschnittlich 5 Zellschichten dick, wird aber zum Rand hin dünner. Die Grundsubstanz um die Zellen ist wechselnd dicht und somit unterschiedlich angefärbt. Es zeigt sich Metachromasie und vereinzelt sind knorpeltypische Zellhöfe um die Zellen zu erkennen. Es gibt aber auch ein Präparat mit sehr wenig angefärbter Grundsubstanz und wenig Metachromasie der extrazellulären Matrix. Die Dichte der Zellen in der Schicht mit knorpelähnlicher Morphologie schwankt von gering bis mittelgradig. Die Morphologie der Zellen ist innerhalb dieser Schicht nicht homogen. Die Zellen sind teils stark entrundet und weisen nur schwach gefärbte Zellkerne auf. Die Zellen sind oval bis spindelig und in eine metachromatische Grundsubstanz eingebettet, wobei sie ein Fibrozyten

ähnliches Aussehen annehmen. Im Zytoplasma sind Granula erkennbar und Zellteilungen sichtbar. Ebenso sind vereinzelt Zellen mit stark entrundeten und geschrumpften Zellkernen zu sehen. Zudem ist das Zellplasma nur sehr schwach gefärbt. Diese Morphologie weist auf untergegangenen Zellen hin. Die Schicht mit Knorpelzellen in direktem Kontakt mit dem Knochenersatzmaterial („Knochen-Knorpel-Interface“) ist ebenso uneinheitlich. Die Oberfläche der Zellen, die Zellkern-Zellplasma-Relation, die Zelldichte und das Verteilungsmuster der Zellen schwanken innerhalb der Knorpelschicht. Zellen in der Nähe der Zementoberfläche zeigen eine intensivere Färbung ihrer extrazellulären Substanz (Abb. 10). Eine Kalzifizierung zwischen diesen Zellen ist aber nicht erkennbar. An Bruchstücken des Zements lagern sich ebenfalls knorpelige Zellen an (Abb. 11).

Die Unterschiede in der Struktur des Knochenzements zwischen den einzelnen Präparaten fallen geringer aus als die Unterschiede bezüglich Knorpelbeschaffenheit und Infiltration. Wie makroskopisch schon sichtbar, sind auch im Mikroskop viele Risse in dem Material erkennbar. Man kann allerdings zwischen alten Rissen, die bei der Verarbeitung, dem Aushärtungsprozess und während des Versuchs entstanden sind und zwischen Fixationsrissen und Artefakten, die während der histologischen Aufarbeitung entstanden sind, unterscheiden. Alte Risse sind aufgrund der Anfärbbarkeit in der von Kossa und Paragon Färbung erkennbar. Man erkennt in dieser Färbung außerdem sehr dunkel bis schwarz angefärbte Randbereiche des Zements. Diese kommen vermehrt an dem Zement-Knorpel-Interface als auch am Zement-Haut-Interface vor. Auffallend sind viele Hohlräume im Zement, die teils wie Luftblasen oder Artefakte durch Schrumpfung erscheinen (Abb. 12).

Die Haut in der Umgebung der Implantate ist in allen Präparaten erhalten. Man erkennt dichte Haarfollikel und die glatte Muskulatur in der Haut, sowie Talgdrüsen und subkutanes Fettgewebe mit Blutgefäßen. Das elastische Bindegewebe der Haut ist in beiden Färbungen zu erkennen. An der Unterseite der Haut in Richtung des Knochenzements ist in allen Präparaten eine Schicht aus Fibrozyten zu erkennen, die sehr dicht angeordnet sind. Dieses Narbengewebe überzieht von der Haut ausgehend das Implantat in den meisten Präparaten bis über die Schicht des

artifiziellen Knorpels. In einem Präparat sind Blutgefäße über der Knorpelschicht sichtbar. Ansonsten sind in der überwiegenden Anzahl der Präparate Blutgefäße am Rand des Implantats sichtbar, sowie Infiltrate mit Mastzellen und Leukozyten. An den Seiten des Implantats finden sich gehäuft Bereiche, in denen Zellen mit einer knorpeligen Differenzierung vorhanden sind. Diese Zellen sind meist gruppiert und imponieren als vereinzelte Zellinseln. Die Grundsubstanz zeigt Metachromasie. Diese Zellen liegen stets unterhalb der beschriebenen Fibrozytenschicht (Abb. 13).

3.1.2 14 Tage Liegezeit

3.1.2.1 Makroskopie

Wie nach 7 Tagen, lässt sich bei der Implantatentnahme nach 14 Tagen eine knorpelähnliche Schicht auf einer Seite des Implantates erkennen. Sie ist homogen, milchig glänzend und ohne Risse. Der Knochenzement ist in seiner Struktur und Form erhalten und zeigt keine großen Risse oder Spalten. Die bei allen Implantaten mitentfernte Haut zeigt sich unauffällig.

3.1.2.2 Lichtmikroskopie

In allen Präparaten ist eine sich metachromatisch anfärbbare Schicht an der Oberseite der Implantate erkennbar. Es ist eine mittlere bis hohe Dichte der Zellen in dieser Schicht zu sehen. Die Höhe dieser Schicht ist allerdings sehr unterschiedlich und reicht von zwei bis drei, bis hin zu zehn Schichten. Es zeigt sich also ein schichtartiger Aufbau mit parallel zur Oberfläche angeordneten Zellen. Ausbuchtungen und Unregelmäßigkeiten an der Oberfläche des Knochenzements sind mit Zellen ausgefüllt. Zum Rand hin nimmt die Dicke der Knorpelschicht ab und die Zelldichte sinkt ebenso. Bei allen Implantaten finden sich außerhalb von der ursprünglichen Chondrozytenschicht separierte Zellen, die ein ähnliches morphologisches Bild zeigen, wie die Zellen in der oben genannten Schicht. In allen Präparaten ist extrazelluläre Matrix in der ursprünglichen Knorpelphase vorhanden und angefärbt. Die Morphologie der Zellen ist aber wie nach 7 Tagen uneinheitlich (Abb. 14). Die Zellen sind teilweise entrundet. Ein großer Teil der Zellkerne ist nicht

rund und sehr polymorph. Vereinzelt zeigen sich Zellteilungen und es sind Chondrone zu sehen. Es gibt jedoch auch Präparate mit Zellen, deren Aussehen knorpeltypisch ist und deren Morphologie sehr homogen ist. Es sind nirgends Verkalkungszeichen der Zellen erkennbar und Fibrozyten in der Knorpelschicht sind nur in einem Präparat in geringer Zahl zu sehen. In einem Präparat zeigt sich eine Infiltration von Makrophagen. In allen weiteren sind keine oder nur sehr geringe Infiltrationen von Entzündungszellen ersichtlich.

Im Gegensatz zu 7 Tagen sind in nur einem Implantat in der von Kossa und Paragon Färbung Zeichen von Auslaugung zu erkennen. Man findet einen dunkler angefärbten Bereich des Zements an der Seite, die mit Zellen beimpft worden war. In allen Präparaten zeigen sich Risse, in einem ein Längsriss quer zur Oberfläche. Zudem ist das Knochen-Knorpel-Interface nicht plan, es weist überall Ausbuchtungen und feine Unebenheiten auf. Die Haut zeigt keine besonderen Veränderungen im Vergleich zu 7 Tagen. In einem Präparat sieht man auf der Seite der Haut eine 5 Zellen hohe knorpelähnliche Schicht. In einem anderen ist eine Kapillarisation sichtbar (Abb. 15).

3.1.3 28 Tage Liegezeit

3.1.3.1 Makroskopie

Bei Implantatentnahme zeigt sich wiederum ein strukturell erhaltener Zementquader mit einer aufgelagerten milchigen, dem nativen Gelenknorpel ähnlichen Schicht. Auf den gefärbten Sägeschnitten erkennt man ohne Zuhilfenahme des Mikroskops in einem Teil der Präparate eine Knorpelschicht. In der Überzahl fällt dabei ein brüchiger Knochenzement auf. Zum Teil sind Auslaugungszeichen sichtbar. Die Färbelösung ist allerdings nicht gleichmäßig in die zu färbenden Strukturen penetriert und die Transplantate erscheinen dadurch oft inhomogen. An der Haut waren keine Unregelmäßigkeiten bei der Explantation ersichtlich.

3.1.3.2 Lichtmikroskopie

Analog zu den vorangegangenen Liegezeiten zeigt sich in den unterschiedlichen Mäusen auch ein ungleiches histologisches Bild. Zum einen finden sich Präparate mit gleichmäßig angeordneten knorpelähnlichen Zellen in einer relativ hohen Schicht von 10-20 Zellen und einer mittleren Zelldichte. Es gibt aber auch Implantate mit deutlich weniger als 10 Zellschichten und geringer Zelldichte. In allen Präparaten erkennt man angefärbte interterritoriale Substanz. Diese kann aber selbst in einem Implantat differieren und sich unterschiedlich darstellen. Die Zellen haben eine rundlich ovale bis flach spindelige Form, die Fibrozyten ähnlich ist. Man erkennt abgestorbene Zellen und Zellen, bei denen der Kern ungefärbt bleibt. Die überwiegende Zahl der Zellen stellt sich dennoch als vital dar. Die Abgrenzung zwischen Chondrozyten und Fibrozyten ist schwierig, da sie teils sehr dicht benachbart sind (Abb. 16). Verkalkungszeichen lassen sich nirgendwo finden. Im Interface zwischen Zement und Knorpel zeigt sich ein enger Kontakt zwischen den Zellen und dem Zement und man erkennt Chondrone (Abb. 17). Die Zellen und die interterritoriale Substanz sind gerade in diesem Bereich sehr intensiv angefärbt. Trotzdem ist die Morphologie der Zellen größtenteils nicht knorpeltypisch. In keinem Schnitt sind Entzündungszellen innerhalb der Knorpelphase zu sehen. Teilweise sieht man Gefäße oberhalb der Knorpelphase (Abb. 18). Es findet sich wiederum überall eine bindegewebsartige Kapsel, die die Implantate einhüllt.

Wie makroskopisch schon ersichtlich, weist der Knochenzement strukturell keine Veränderungen auf. Es finden sich nur in einem Präparat Auslaugungszeichen, die an der Hautseite sichtbar sind. Die Haut weist überall dichte Haarfollikel auf und ist dicht kapillarisiert. Es finden sich vereinzelt Entzündungszellen im Gewebe um das Implantat. In einem Präparat finden sich wiederum knorpelähnliche Zellen rings um den gesamten Zementblock.

3.1.4 84 Tage Liegezeit

3.1.4.1 Makroskopie

Ohne Vergrößerung fällt in mehreren histologischen Schnitten eine prominente Schicht auf dem Zement auf. Man erkennt eine Wölbung dieser Schicht mit dem Maximum in der Mitte des Objekts. Der Block ist zumeist glatt begrenzt und weist nur in wenigen Präparaten brüchige Bereiche auf. Häufig sieht man feine Haarrisse. In den von Kossa und Paragon Färbungen sieht man schwarze Bereiche, die für Auslaugung sprechen. Die Haut zeigt sich überwiegend dünner als in den vorherigen Liegezeiten.

3.1.4.2 Lichtmikroskopie

In nahezu allen Präparaten ist, im Vergleich zu den anderen Liegezeiten, eine sehr dicke Schicht von neuem Knorpel erkennbar. Die Bereiche zwischen den Zellen sind zum Teil kräftig angefärbt. Überall erkennt man einen schichtförmigen Aufbau und die Zellanordnung und Morphologie differieren in Abhängigkeit vom Abstand zu dem Knochenzement. Nur selten erkennt man Knorpelzellen, die in Chondronen angeordnet sind. Metachromatische Bereiche finden sich allerdings nur wenige in der Giemsa Färbung. Die Morphologie der Zellen in der Knorpelschicht ist wiederum sehr uneinheitlich. Es finden sich zwar rundliche Zellen, meist ist deren Zellkern aber schwach gefärbt und diese Zellen sind größer als die anderen. Die Überzahl der Zellen ist oval bis spindelförmig. Die Zellkerne finden sich oft entrundet und pyknotisch vor. Zudem finden sich in einem Teil Zellen mit gelappten Kernen, was auf eine Infiltration von Leukozyten hindeutet. Direkt im Interface finden sich gehäuft fibrozytenähnliche Zellen (Abb. 19). Die Morphologie schwankt sehr stark, man findet abgestorbene Zellen und Leukozyten in einigen Präparaten und erkennt überwiegend einen dichten Kontakt der Zellen zum Zement (Abb. 20). Auffällig ist die sehr geringe Metachromasie trotz der zum Teil kräftig angefärbten Grundsubstanz.

Der Knochenzement zeigt nach 84 Tagen an der Oberfläche eine angegriffene Struktur und man erkennt an den Randbereichen, die frei von Chondrozyten sind,

Zellen, die in die Oberfläche des Zements penetriert sind und mit dem Material interagieren (Abb. 21). Der Farbstoff dringt somit in die obersten Schichten des Zements ein. Risse und Spalten sind in der von Kossa und Paragon Färbung schwarz, zum Teil erkennt man starke Auslaugungen. Überwiegend ist die Integrität erhalten geblieben und nur in einem Präparat erkennt man lose Bruchstücke des Zements.

Die Haut ist in einem Teil deutlich atrophiert und man sieht als Reaktion deutlich weniger Haarfollikel an der dem Knorpel gegenüber liegenden Seite. Zudem ist die Dicke dann deutlich geringer als zuvor. Die Bindegewebsschicht ist nach wie vor erhalten, erstreckt sich zumeist auch um das gesamte eingebrachte Material. Gefäße erkennt man vor allem an der Seite der Implantate. Der Knorpel ist an keiner Stelle vaskularisiert. Als Ausnahme ist ein Präparat zu nennen, bei dem implantierten Zellen nicht an der ursprünglichen Seite zu finden sind sondern am Rand. Dort sind ebenfalls proteinhaltige Exsudate und eine Einsprossung von Kapillaren zu sehen. Die Substanz zeigt aber kaum metachromatische Bereiche und die Zellmorphologie ist nicht knorpelähnlich. Zudem findet man viele untergegangene Zellen und Leukozyten (Abb. 22).

3.2 Osteochondrale Biphasen mit PGLA-Vlies

3.2.1 7 Tage Liegezeit

3.2.1.1 Makroskopie

Bei der Präparation wurde die Haut zumeist nicht von dem Zementblock gelöst und kann damit histologisch befundet werden. Bei allen Präparaten ist makroskopisch immer das PGLA Vlies erkennbar, jedoch ist die Dicke der Knorpelzellschicht nur schwer einzuschätzen. Je nach Präparation kann man makroskopisch eine teilweise bis vollständig erhaltene Hautschicht erkennen, die die Unterseite des Zements umgibt. Dabei ist eine unterschiedliche Anfärbbarkeit im von Kossa und Paragon Präparat zu erkennen. Die Ober- und Unterseiten des Zements sind teilweise kräftiger angefärbt. Auch sind Lufteinschlüsse erkennbar. Das Material erweist sich

nach der histologischen Aufarbeitung teilweise als sehr brüchig.

3.2.1.2 Lichtmikroskopie

Die Knorpelschicht stellt sich in den unterschiedlichen Präparaten sehr heterogen dar. Die Zelldichte ist sehr gering und an einigen Stellen des Transplantats sind die Zellen nur vereinzelt zu lokalisieren. Selbst wo sich eine größere Dichte zeigt, sieht man keine Regelmäßigkeit der Anordnung, wie bei nativen Chondrozyten. Es finden sich entrundete und zytoplasmaarme Zellen. Die Zellkerne sind häufig unregelmäßig und nur gering angefärbt. Es gibt aber auch Präparate in denen die Zellen auf der Knorpelseite gleichmäßig angeordnet sind und in einer mittleren Dichte vorkommen. Meistens ist interzelluläre metachromatische Substanz sichtbar, jedoch stellen sich die Bereiche zwischen den Zellen oft als nur schwer anfärbbar dar. In der Nähe von Vliesfasern finden sich aber häufig metachromatische Bereiche (Abb. 23). In vielen Fällen sind Zellkerne ebenfalls nicht gefärbt. Oft finden sich knorpelähnliche Zellen nur oberhalb der Vliesschicht. Verkalkungen von Zellen und Fibrozyten innerhalb der Knorpelschicht fehlen. Nur vereinzelt finden sich Entzündungszellen. Der Bereich mit Zellen in direktem Kontakt zum Knochenzement ist sehr unregelmäßig und die Zelldichte sehr gering. Bisweilen finden sich in einigen histologischen Schnitten gar keine Zellen in diesem Bereich. Die Klebestellen (Polydioxanon) der Vliesfasern sind ebenfalls noch sichtbar. In allen Präparaten ist das Vlies sichtbar, jedoch ist es unterschiedlich stark abgebaut worden und die Dichte der Fasern bleibt nicht konstant. Es finden sich auch brüchige Fasern. Häufig finden sich Bruchstücke des Zements im Niveau der eigentlichen Knorpelschicht. Überwiegend erweist sich das Vlies als gut verankert (Abb. 24).

Die Auslaugung des Zements ist überwiegend gering. Man erkennt im Übergang zum Vlies ein brüchiges Material und losgelöste Zementbestandteile innerhalb des PGLA Vlieses. Vereinzelt sieht man Lufteinschlüsse im Zement. Risse sind von Farbstoff infiltriert.

Die Haut weist histologisch keine Besonderheiten auf. Zwischen der Haut und der

Zementoberfläche findet sich überall eine narbige Schicht. Zumeist erstreckt sich dieses Reaktionsgewebe um das gesamte Implantat. In den einzelnen Präparaten zeigen sich dabei unterschiedliche Dicken und Ausbreitungen dieser Schicht. Auch an den Seiten des Blockes zeigen einige Präparate, dass Zellen unterhalb der Narbenschicht zu sehen sind. Dabei zeigt sich eine leichte Metachromasie. Oberhalb des Narbengewebes finden sich lockeres Bindegewebe und Blutgefäße mit zum Teil zellhaltigen Infiltraten (Abb. 25).

3.2.2 14 Tage Liegezeit

3.2.2.1 Makroskopie

In allen Präparaten ist die Vliesstruktur erhalten und ohne Mikroskop sichtbar. Allerdings kann man die Dicke der Knorpelschicht nicht einschätzen. Die Struktur des Zements zeigt sich unverändert. Der Zement an der Hautseite der Präparate ist zum Teil kräftig angefärbt. Bei einigen Präparaten sieht man Einkerbungen und Unregelmäßigkeiten an der Oberfläche im Bereich zwischen Zement und Vlies. In einem Präparat erkennt man eine kräftig gefärbte Narbenschicht, die das gesamte Implantat umschließt.

3.2.2.2 Lichtmikroskopie

Nur in einem Präparat kommt eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Vlies mit einer relativ hohen Dichte vor. In den anderen Präparaten stellen sich die Zellen nur gering verteilt in der Vliesschicht dar und sind meist oberhalb des Vlieses in einer dünnen Schicht zu finden. Dort sind die Zellen aber nicht gleichmäßig verteilt, sondern finden sich gruppiert oder nur in bestimmten Bereichen. Die Zellen zeigen selten knorpelähnliche Formen. Es finden sich überwiegend fibrozytenähnliche Zellen und Zellen mit kleinen Kernen und einer unregelmäßigen Oberfläche. Selten sind Zellen mit einem metachromatischen Zellhof zu finden. Die Zahl der Fibrozyten übersteigt in einigen Präparaten die Zahl der Zellen mit einer knorpeligen Differenzierung. Der Kontaktbereich zwischen Zellschicht und Zement ist zellarm, größtenteils ist die Zelldichte sehr gering und abschnittsweise fehlen Zellen. Es

finden sich zum Teil losgelöste Fasern und Bruchstücke zwischen den Vliesfasern. Das Vlies ist nur in der Hälfte der Präparate gut verankert, in einem Fall ist es komplett vom Knochenzement gelöst (Abb. 26). Die Degradation des Vlieses ist gering. Die Klebepunkte der Fasern sind regelmäßig gefärbt und sichtbar.

Auslaugungszeichen des Hydroxylapatits sind gering und kaum in der von Kossa und Paragon Färbung nachweisbar. Wie schon oben beschrieben sieht man einen zerfallenen Zementblock, insbesondere im Bereich der Verankerungszone des Vlieses. Diese Veränderungen sind aber zum großen Teil keine vitalen Reaktionen, sondern schon während der Herstellung der Implantate oder der Vorkultivierung entstanden. Vitale Reaktionen erkennt man aber häufig an freien Bruchstücken des Zements, die einen engen Kontakt zu den implantierten Zellen zeigen.

Das umgebende Gewebe zeigt in einem Fall eine stärkere Kapillarisation und es sind Zellen fibröser Differenzierung sichtbar (Abb. 27). Des Weiteren zeigt sich überall eine Schicht aus Narbengewebe. Teilweise ist diese Schicht intensiv gefärbt und hüllt das gesamte Präparat ein. Oberhalb dieser Narbenschicht sieht man unauffällige Haut mit ihren Anhangsgebilden und Haarfollikeln. Starke Entzündungsreaktionen mit zellulären Infiltraten sind bei dieser Liegezeit nicht zu finden.

3.2.3 28 Tage Liegezeit

3.2.3.1 Makroskopie

Im Gegensatz zu den Präparaten nach 14 Tagen, erkennt man nach 28 Tagen in den von Kossa und Paragon Färbungen viele sehr dunkle Bereiche im Zement. Vor allem sind Bereiche am Vliesübergang und die Ränder sehr intensiv gefärbt. Es fallen aber auch Zonen in der Mitte des Materials auf, an welche der Farbstoff gebunden hat. Überwiegend sind Risse und Artefakte durch Schrumpfung des Objekts vorhanden. An der Oberfläche zeigen sich viele aufgelockerte Bereiche. Das Vlies ist überall sichtbar, jedoch lässt sich makroskopisch wenig gefärbte knorpelige Substanz

erkennen.

3.2.3.2 Lichtmikroskopie

Die Zellanordnung der Knorpelschicht stellt sich analog zu der nach 14 Tagen dar. Nur in einem Teil der Präparate finden sich Zellen um die Vliesfasern herum angeordnet. Die Metachromasie um die Zellen herum ist ungleichmäßig und gering. Vermehrt finden sich die gezüchteten Zellen an der Oberfläche des Vlieses, wobei auch hier die Dicke der Schicht und die Dichte der Zellen, sowie der Anteil an gefärbter Grundsubstanz schwanken. Im Interface zwischen Knochenzement und Vliesfasern findet sich ebenfalls eine geringe Zelldichte und wenig angefärbte Grundsubstanz. Auch hier sind in einem Teil der Implantate kaum Zellen vorhanden. Man erkennt viele untergegangene Zellen, Zellen mit geschrumpften Kernen und Zelltrümmer (Abb. 28). Charakteristisch ist eine unterschiedliche Zelldichte der Chondrozyten. Häufig sind Zellplasma und Kern nur schwach gefärbt. Die Zelloberfläche ist im Vergleich zu normal konfigurierten Chondrozyten unregelmäßig. Zellen dieser Morphologie sind untergegangene Chondrozyten. Zwischen diesen Zellen finden sich zusätzlich Zellen mit gelappten Kernen, was auf eine Infiltration und Entzündung hinweist. Ein Großteil der Zellen in der Knorpelphase zeigt sich als fibrozytär dedifferenziert und produziert nach Färbung nach Giemsa nur sehr wenig knorpeltypische metachromatische extrazelluläre Matrix.

Die Auslaugung des Zements ist unterschiedlich, aber meist gering. Man sieht an einem Implantat einen stark angefärbten Rand, sonst sind die Degradationszeichen weniger ausgeprägt. Man erkennt Zellen in Lakunen und Poren an der Oberfläche des Zements, die sich direkt an den Hydroxylapatit angelagert haben (Abb. 29). Die Integration des Vlieses in den Zement ist überwiegend unvollständig, zum Teil ist kein Kontakt mehr zu sehen (Abb. 30). Wiederum befinden sich Bruchstücke des Zements in der Ebene der Knorpelschicht. Das Vlies ist überwiegend erhalten, man erkennt aber eine Abnahme der Faserdicke und Faserdichte. Die Polydiäxononklebepunkte sind prominent und weniger degradiert als PGLA. Das Verhältnis Polydioxanon zu PGLA steigt somit an.

Das Gewebe um das Implantat zeigt zum Teil viele Gefäße und Kapillareinsprossungen, sowie geringe Infiltrationen von Leukozyten. Die Bindegewebskapsel enthält in einigen Präparaten eine besonders hohe Dichte an Fibrozyten, wodurch sie sich stark anfärbt. Überwiegend umgibt das Bindegewebe das gesamte eingebrachte Material, in nur einem Fall ist es nicht durchgehend.

3.2.4 84 Tage Liegezeit

3.2.4.1 Makroskopie

An einem Teil der Implantate kann man eine dicke, intensiv gefärbte Zone über der Knorpelschicht erkennen. Die Haut ist durchgehend sichtbar und teilweise auch sehr dick. Auf einem histologischen Schnitt erkennt man ein losgelöstes Zementbruchstück. Das Vlies ist im Gegensatz zu den vorangegangenen Liegezeiten nicht mehr zu erkennen. Man erkennt aber in einigen Präparaten kräftig gefärbte Zonen.

3.2.4.2 Lichtmikroskopie

Markant zeigt sich nach 84 Tagen eine fast vollständige Degradation der Vliesfasern. Die Zellanordnung über dem Zement ist wieder sehr unregelmäßig, die Schichtdicke des Knorpels ebenfalls gering. Die implantierten Zellen kommen in einer mittleren Dichte vor. Sie finden sich aber zum Teil über dem degradierten Vlies, was bedeutet, dass der durch Degradation entstandene Raum nicht durch Proliferation der implantierten Zellen ausgefüllt wurde. In allen Präparaten findet man Grundsubstanz. Die Interterritorien zeigen aber überwiegend nur mäßig viel Metachromasie. Die Morphologie der Zellen schwankt wiederum von rundlich oval bis hin zu spindeligen Elementen. Man findet entrundete Zellen, geschrumpfte Kerne und Zelluntergänge. Die schwankende Zelldichte und ein unterschiedliches histologisches Bild der Zellen innerhalb eines Präparates sind sehr auffällig (Abb. 31). Zum Teil findet man eine hohe Zahl an fibrozytären Zellen. Das Interface weist große Lakunen durch die Einbringung des Vlieses auf. Es stellt sich sehr uneinheitlich dar und ist durch Bruchstücke des Zements zerklüftet. Es zeigt sich in diesem Bereich eine sehr

aufgelockerte Struktur, in der die Zelldichte gering ist und sich Zonen mit angefärbter Grundsubstanz nur schwer ausmachen lassen. Die Polydioxanonpunkte sind erhalten geblieben, zeigen aber schon Degradationserscheinungen und Risse. Insgesamt nimmt das Polydioxanon ein im Verhältnis zu den Chondrozyten großes Volumen ein. Es zeigen sich keine Verkalkungen der Chondrozyten und keine Entzündungszellen in der Knorpelschicht.

Wie in den Präparaten ohne PGLA Vlies, zeigt sich nach 84 Tagen, dass Zellen sehr dicht an der Oberfläche des Zements sitzen und tief in die durch Degradation entstandenen Räume eindringen, wo sie proliferieren und Matrix synthetisieren (Abb. 32). Trotzdem zeigen sich in der von Kossa und Paragon Färbung nur wenige Bereiche, die eine intensive Schwarzfärbung aufweisen. Die Strukturänderungen zeigen sich wie beschrieben vor allem im Knochen-Knorpel-Interface, wo viele Bruchstücke zwischen den Zellen verteilt sind. In den anderen Bereichen zeigt sich nach wie vor ein kompaktes Material mit geringem Substanzverlust an der Oberfläche.

Am Rand der Implantate liegen bei einigen Präparaten Zellen mit metachromatischen Umgebungen. Man sieht ebenfalls eine geringe Zahl Leukozyten und andere Entzündungszellen und Gefäße am Rand der Implantate. Die Haut und ihre Anhänge sind unauffällig und zeigen weniger atrophische Zeichen als bei den Implantaten ohne Vlies nach 84 Tagen. Wie makroskopisch schon ersichtlich sind alle Implantate von einer Kapsel eingehüllt. Die Dicke dieser Schicht zeigt in den verschiedenen Liegezeiten keine Veränderung.

3.3 Histologischer Score

Liegezeit in Tagen	Zell- morphologie	Matrix- färbung	Oberflächen- regularität	Knorpel- dicke	Transplantat- stabilität	Score
Biphasen ohne Vlies						
7	2,20	1,60	0,60	1,80	1,20	7,40
14	2,00	1,75	0,50	1,50	0,75	6,50
28	2,00	1,40	0,20	1,20	0,80	5,60
84	2,17	1,67	0,33	0,83	1,00	6,00
Biphasen mit Vlies						
7	2,67	2,17	2,00	0,83	0,83	8,50
14	2,50	1,50	1,50	1,00	1,50	8,00
28	2,20	1,80	1,60	0,80	1,00	7,40
84	2,25	1,50	1,00	0,50	0,75	6,00

Tab 2: Ergebnisse des modifizierten histologischen Scores nach Wakitani¹⁰².

Für die Kategorie „Zellmorphologie“ zeigt die Vlies-Gruppe eine Verbesserung im Verlauf von 84 Tagen. Die Gruppe ohne Vlies hat nach allen Entnahmezeitpunkten einen besseren Punktwert als die Vlies-Gruppe, es tritt aber kaum eine Steigerung im Laufe der Zeit auf. Nach 84 Tagen unterscheiden sich beide Gruppen nur um 0,08 Punkte. Nach dem Schema in Tab.1, Seite 32, bedeutet das, dass die Implantate ohne Vlies nach allen Zeitpunkten überwiegend Faserknorpel aufweisen. Die Gruppe mit Vlies weist nach 7 Tagen überwiegend keinen Knorpel auf. Nach 84 Tagen findet man dann überwiegend Faserknorpel in dieser Gruppe.

In der Kategorie „Matrixfärbung“ verbessert die Vlies-Gruppe nach 84 Tagen ihren Punktwert. Die Gruppe ohne Vlies verbessert diesen zwar auch nach 28 Tagen, jedoch ist der Wert nach 84 Tagen schlechter als zu Beginn. Nachdem die Vlies-Gruppe nach 7 Tagen schlechter abschneidet, ist der Wert nach 84 Tagen um 0,17 Punkte leicht besser. Nach 84 Tagen ist in der Gruppe ohne Vlies die Matrixfärbung damit deutlich reduziert, in der Vlies-Gruppe nach dem letzten Entnahmezeitpunkt

gering bis deutlich reduziert.

In der Kategorie „Oberflächenregularität“ verbessern beide Gruppen ihren Punktwert im Verlauf von 84 Tagen, wobei sich die Vliesgruppe stark verbessert (von 2,00 auf 1,00). Das Niveau ist in der Kontrollgruppe ohne das Vlies nach allen Entnahmezeitpunkten hoch und unterscheidet sich deutlich von der Vlies-Gruppe. Die Oberfläche ist bis auf den 7-Tage Entnahmezeitpunkt glatt und kommt damit nativen Gelenkknorpel nahe. Die Oberfläche der Vlies-Gruppe ist irregulär und nur nach 84 Tagen moderat glatt.

Die Knorpeldicke verbessert sich in beiden Gruppen nach 84 Tagen, in der Kontrollgruppe sogar nach jedem Entnahmezeitpunkt. Die Gruppe mit Vlies liegt von Beginn an auf einem höherem Niveau und schneidet durchgehend besser ab. Von 7 bis 28 Tagen finden sich durchschnittlich 5-10 Zellschichten, nach 84 Tagen mehr als 10 Schichten. Die Präparate ohne das Vlies beginnen nach 7 Tagen mit deutlich geringeren Dicken von unter 5 Schichten. Nach 28 und 84 Tagen verbessert sich das Ergebnis auf durchschnittlich 5-10 Zellschichten.

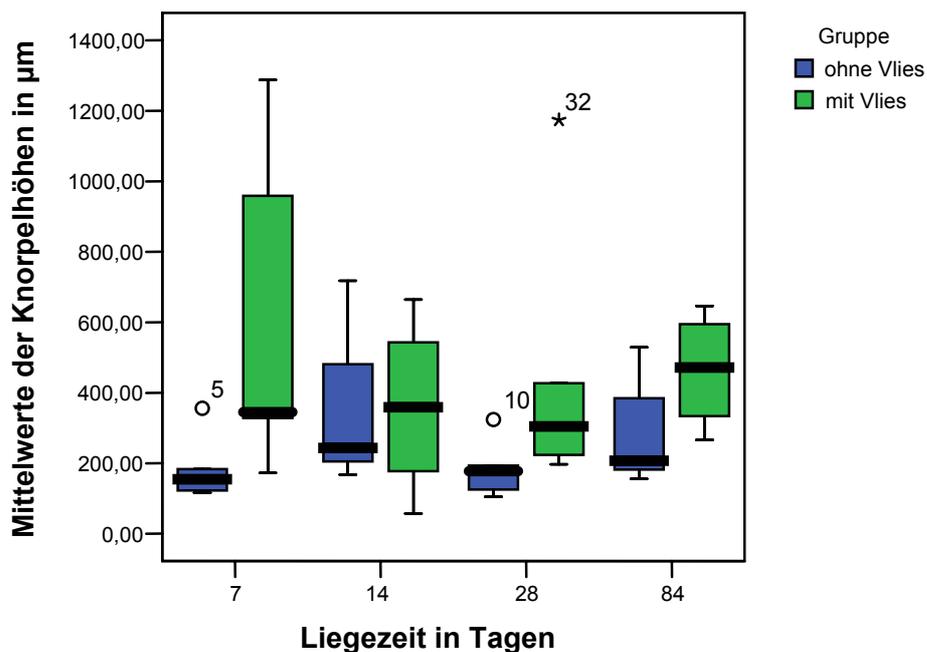
Die Kategorie „Transplantatstabilität“ zeigt für beide Gruppen eine Verbesserung nach 84 Tagen. Allerdings schwanken die Ergebnisse vor allem in der Vlies-Gruppe und verschlechtern sich zwischenzeitlich. Die Vlies Gruppe zeigt für 7 und 84 Tage ein besseres Resultat. Nach 14 und 28 Tagen schneidet die Gruppe ohne Vlies besser ab. Es zeigt sich durchschnittlich nach allen Entnahmezeitpunkten, dass die Zellen bzw. das Vlies nicht am ursprünglichen Ort sind oder die Zementstruktur zerstört ist. Dabei ist diese verminderte Stabilität in der Gruppe ohne Vlies darauf zurückzuführen, dass die Zellen nicht am ursprünglichen Ort sind, bei der Vlies-Gruppe überwiegend auf eine zerstörte Zementstruktur.

In beiden Gruppen weist das Gesamtergebnis eine erhebliche Differenz zum hyalinen Gelenkknorpel auf. Im Verlauf zeigt sich die Tendenz, dass die Knorpeldicke und die Oberflächenregularität in beiden Gruppen zunehmen. Die Zellmorphologie bleibt sowohl mit als auch ohne Vlies auf einem schlechten Niveau.

In der Kategorie „Matrixfärbung“ kann die Vlies-Gruppe sich im Vergleich zwar verbessern, aber insgesamt zeigt sich nahezu immer eine deutlich reduzierte Metachromasie. Der Score verbessert sich für die Vlies-Gruppe nach jedem Entnahmezeitpunkt, während sich in der Kontrollgruppe ohne Vlies, beginnend mit einem besseren Score, am Ende eine geringe Verschlechterung zeigt. Tendenziell nähern sich beiden Gruppen einander an. Nach 84 Tagen gibt es keinen Unterschied mehr.

3.4 Histomorphometrie

3.4.1 Knorpelhöhen

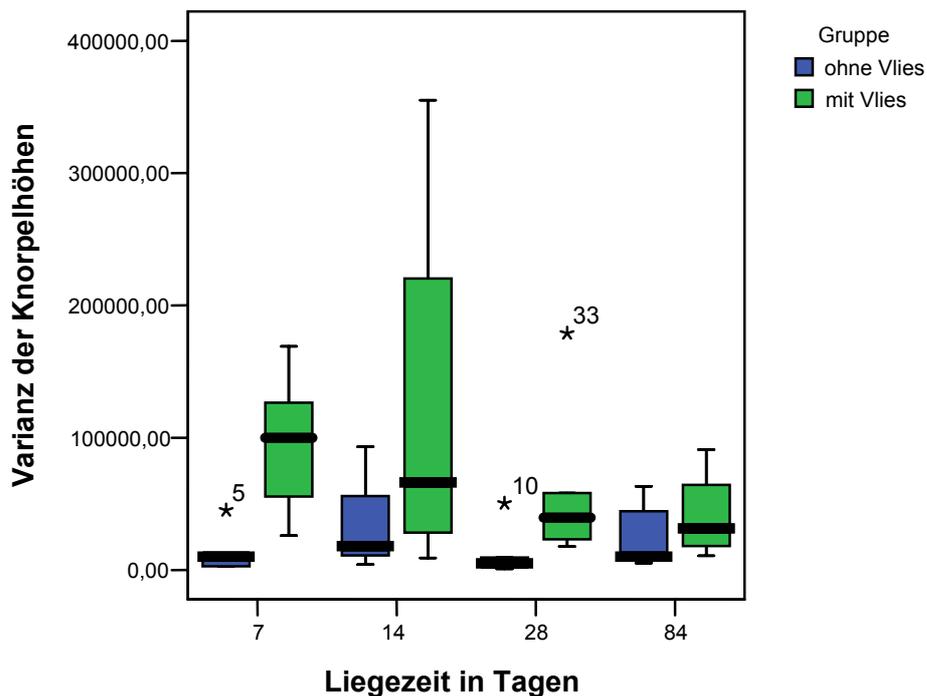


Grafik 1: Boxplot der Mittelwerte der Knorpelhöhen.

Es ergaben sich für die einzelnen Liegezeiten uneinheitliche Ergebnisse, wobei allerdings die Mittelwerte in der Gruppe mit Vlies stets größer waren, als in der Kontrollgruppe. Im Einzelnen ergab sich nach 7 Tagen: $n=5$, $p=0,076$, nach 14 Tagen: $n=4$, $p=0,773$, nach 28 Tagen: $n=5$, $p=0,047$ und nach 84 Tagen: $n=5$ und $p=0,086$. Damit wird zu allen Messzeitpunkten das Signifikanzniveau von $\alpha'=0,0125$ verfehlt. Klammert man hier den Messzeitpunkt nach 14 Tagen einmal aus, erreichen

die Werte trotz der geringen Stichprobe ein p von deutlich unter 10%. Man kann diese Ergebnisse also als Trend dahingehend werten, dass mit Vlies eine höhere Knorpelschicht in diesem Tiermodell erreicht wurde (Statistik im Anhang, Kapitel 6.2).

3.4.2 Regelmäßigkeit der Knorpeloberfläche

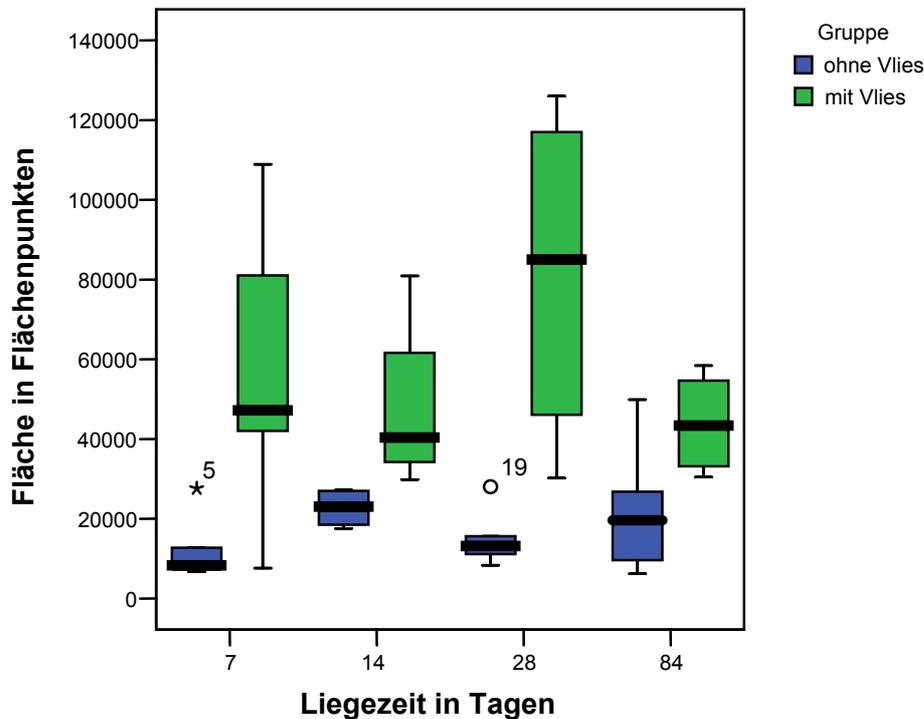


Grafik 2: Boxplot der Varianz (Oberflächenregularität) der Knorpelhöhen.

Da häufig mikroskopische Unregelmäßigkeiten der Oberfläche bei den Präparaten mit Vlies gesehen wurden, erfolgte eine zusätzliche statistische Untersuchung des Datensatzes der Knorpelhöhen. Als glatte Oberfläche wurde eine möglichst niedrige Varianz gewertet. Die Varianzen wurden von der jeweiligen Liegezeit gemittelt und ein Vergleich der Varianzen von Präparaten mit und ohne Vlies vorgenommen. Im Gegensatz zur Knorpelhöhe fällt hier das Ergebnis etwas eindeutiger aus. Die Nullhypothese, das heißt die Varianzen der Präparate mit Vlies sind nicht größer, als ohne Vlies, darf nicht verworfen werden. Im Einzelnen ergeben sich folgende Werte: Nach 7 Tagen: $n=5$, $p=0,016$, nach 14 Tagen: $n=4$, $p=0,386$, nach 28 Tagen: $n=5$, $p=0,047$ und nach 84 Tagen: $n=5$ und $p=0,327$. Insgesamt ist hier ebenfalls ein Trend ablesbar, der die Beobachtung der schlechteren Oberflächenregularität im

histologischen Score der Vlies-Gruppe zusätzlich stützt.

3.4.3 Knorpelfläche



Grafik 3: Flächen der matrixbildenden Knorpelschicht, relativ in Flächenpunkten

Bezüglich der Flächen der Knorpelschichten, zeigt sich, trotz deutlich größerer Mittelwerte der Gruppe mit Vlies, nur nach 28 Tagen ein signifikantes Ergebnis mit $n=5$ und $p=0,0120$. Allerdings liegen auch die anderen Werte für p nicht so weit vom Signifikanzniveau entfernt, so dass man hier aufgrund der sehr kleinen Fallzahl insgesamt von einem sehr deutlichen Trend, bei sogar einem signifikanten Unterschied, sprechen kann. Die weiteren Werte sind für 7 Tage: $n=5$ und $p=0,036$, 14 Tage: $n=4$ und $p=0,073$ und nach 84 Tagen bei $n=5$ ein p von $0,080$.

Die morphometrische Analyse der Präparate zeigt weitestgehend Deckungsgleichheit mit dem histologischen Score in den Kategorien „Knorpeldicke“ und „Oberflächenregularität“. Die beobachteten Eigenschaften ließen sich zwar statistisch nicht eindeutig belegen, aber festigen die subjektive Analyse des Scores.