

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vor der Implantation

Die Implantate wurden nach der 14-tägigen Vorkultivierung steril unter der Laminar Air Flow dem Perfusionskammersystem entnommen und wie oben beschrieben steril in Transportbehälter überführt. Makroskopisch sahen die Implantate sauber und glatt aus, es gab keinerlei Anzeichen für eine Infektion oder Risse in der Knochenphase. Die Knorpelphase stellte sich erhaben und glänzend dar (Abb. 10). Das zusätzlich in das Perfusionskammersystem verbrachte Kontrollimplantat zeigte nach der histologischen Aufarbeitung im lichtmikroskopischen Bild eine Knorpelphase mit einer sehr hohen Zelldichte, eine sehr gute Verankerung der Vliesfasern in der darunter liegenden Knochenphase und eine sehr homogene Knochenphase. Auch das dem Zellkultursystem entnommene Nährmedium zeigte unter dem Mikroskop keinerlei Anzeichen für eine Infektion.



**Abb. 10** Implantat nach Entnahme aus dem Perfusionskammersystem

### 3.2 7 Tage Liegezeit

#### 3.2.1 Nach der Explantation

Alle Tiere zeigten bereits nach 3 Tagen ein unauffälliges Gangbild. Bei der Explantation war nur bei einem Kaninchen ein Erguss und ansonsten bei keinem Tier Rötungen oder andere Entzündungszeichen zu erkennen, die Operationsnarben waren ohne Verwachsungen gut verheilt. Bei einem Tier war die Patella eines Gelenkes luxiert. Die Implantate stellten sich nach Eröffnung des Kniegelenkes allgemein gut fixiert dar,

lediglich ein Implantat hatte nach lateral keinen Knochenkontakt und war etwas locker. Der Defekt der Knorpelschicht war durch die Implantate sehr gut aufgefüllt, es bestand bei fast allen Tieren ein gleichmäßiger Übergang zwischen nativem Knorpel und der Knorpelphase des Implantates. In der Farbe waren die Knorpelphasen der Implantate uneinheitlich, teilweise stellten sich die Knorpelphasen wie der native Knorpel blass bläulich dar, einige Implantate erschienen aber auch dunkler und uneinheitlicher.

### **3.2.2 Lichtmikroskopie**

#### **3.2.2.1 Implantate mit Zellen**

Nach der oben beschriebenen histologischen Aufarbeitung zeigten sich mikroskopisch bei den Implantaten mit Chondrozyten die Vliesfasern, ihre Klebepunkte und ihre Verankerung in der Knochenphase (Abb. 11). Im oberen, in den freien Gelenkraum hineinragenden Bereich des Vlieses wurde eine zunehmende Entrundung der Fasern beobachtet, auch die Färbbarkeit der einzelnen Fasern nahm ab. Der Knochenzement sah homogen aus, die Seitenränder waren glatt und scharf begrenzt. Zwischen den Vliesfasern war eine massive Zellansammlung zu beobachten (Abb. 12,13). Unter diesen zahlreichen Zellen befanden sich viele Zelltrümmer und Zellschatten von untergegangenen Zellen. Das zur In-Vitro- Immobilisation der Chondrozyten auf die Vliesphase gegebene Fibrin war deutlich zu erkennen. Das Fibrinnetzwerk war partiell kondensiert oder aufgelöst. Auch im Randspalt neben dem Implantat war ein Fibrinnetzwerk zu erkennen (Abb. 14). In der Randzone des Bohrloches neben dem Implantat fand bei allen Präparaten, welche mit präexistentem Knorpel eingesetzt wurden, eine deutliche Fremdkörperreaktion statt, es fanden sich zahlreiche polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen. Ebenfalls befanden sich in dieser Randzone abgescherte Bestandteile des trabekulären Knochens als Fragmente der Bohrung (Abb. 15,16). Erythrozyten und Kapillarreste waren in der Umgebung des Implantates zu erkennen. Ebenfalls in diesem Randspalt befand sich bei den meisten Präparaten dieser Liegezeit ein dunkel gefärbtes Exsudat, in welchem sich viele Fettzellen befanden, die von Makrophagen umgeben waren und teilweise zu Ölzysten vakuolisierten. Bei einem Präparat dieser Gruppe gab es Kontakt zwischen dem Implantat und dem gebildeten Knochen (Abb. 17).

### 3.2.2.2 Implantate ohne Zellen

Auch bei den Implantaten, welche ohne präexistente Knorpelzellen eingesetzt wurden, waren die Vliesfasern und ihre Klebepunkte deutlich zu erkennen. Die Verankerung der Vliesfasern in der Zementphase war auch hier zu erkennen. Es fiel auf, dass bei der Herstellung der Implantate in den freien Anteil des Vlieses sehr viel Zement gedrückt wurde (Abb. 18). Die Zementphase erschien auch in dieser Versuchsgruppe sehr kompakt, die Seitenränder waren glatt und scharf begrenzt. Hier zeigten sich, anders als in der Gruppe mit Zellen, mesenchymale Zellen auf der Zementoberfläche (Abb. 19). In bis zur Implantatoberfläche reichenden Zellproliferaten bildeten sich trabekuläre mineralisierende Areale aus, was für eine Differenzierung der Zellen in Richtung von Osteoblasten spricht. Demgegenüber stellten sich in einigen Präparaten Bereiche mit devitalisiertem Knochen dar, in welchem die Knochenzellen nicht anfärbbar sind. Genauso wie in der Gruppe mit Zellen sah man in dieser Versuchsgruppe im Spalt zwischen Implantatbett und Implantat Organisationsgewebe, Blutkoagel und abgescherte trabekuläre Knochen. Bei einem Präparat war hier eine kleine Ansammlung von chondriformen Zellen zu sehen (Abb. 20). Im Vergleich zu den Implantaten mit Zellen erschien das Vlies ohne Zellen leer (Abb. 21). Es sind nur vereinzelt mononukleäre Zellen zu finden. Das Fibrin, welches vor der Kultivierung auf das Vlies gegeben wurde, war auch in dieser Gruppe deutlich zu erkennen und bildete genauso wie bei den Implantaten mit Zellen ein Fibrinnetzwerk, welches partiell kondensiert oder aufgelöst war. Auch der Randspalt neben dem Implantat zeigte wenige Entzündungszellen (Abb. 22).

### **3.3 14 Tage Liegezeit**

#### **3.3.1 Nach der Explantation**

Ein Versuchstier musste aufgrund einer Wunddehiszenz und eines Wunddebridements 6 Tage nach der Implantation nochmals narkotisiert werden, um einen erneuten Wundverschluss vorzunehmen. Ein weiteres Tier musste nach 7 Tagen aufgrund eines Seroms narkotisiert werden, auch hier erfolgte nach der Versorgung ein erneuter Wundverschluss. Ein drittes Tier dieser Liegezeit litt 7 Tage nach der Implantation an einem Ulkus am Hals, welches mit Gentamycin und Tardomyocel behandelt wurde. Bei der Explantation war nur ein Erguss bei einem Kaninchen und ansonsten bei keinem Tier Rötungen oder andere Entzündungszeichen zu erkennen. Die Operationsnarben waren ohne Verwachsungen gut verheilt. Bei der Eröffnung des Gelenks zeigte sich ein uneinheitliches Bild, der überwiegende Teil der Implantat-Knorpelflächen erschien gelblich und rau. Zwei Implantate zeigten eine bläulich schimmernde glatte Knorpelphase.

#### **3.3.2 Lichtmikroskopie**

##### **3.3.2.1 Implantate mit Zellen**

Bei der histologischen Auswertung der Implantate waren die Vliesfasern, ihre Verankerung im Zement und ihre Klebepunkte gut zu erkennen (Abb. 23). Allerdings fiel auf, dass die Vliesfasern dicht zusammengepresst waren. Zwischen den Vliesfasern lagen bei sehr vielen Implantaten Zementpartikel. Bei einer großen Zahl der Implantate nahmen daher Zementstrukturen ein großes Volumen des Vlieses ein (Abb. 24). Bei einem Präparat war die Vliesphase vollständig von der Zementphase abgelöst (Abb. 25). An Stellen, an denen die Vliesfasern offenbar resorbiert wurden, lagen vermehrt monozytäre Zellen. Die Zementphase der Implantate erschien jetzt im Allgemeinen rauer, und auch die Kanten wirkten poröser. In einem Präparat war ein Zement-Bruchstück in Resorption und dabei, in viele Partikel zu zerfallen (Abb. 26). Im Zement waren Risse zu erkennen, wobei man bei der Fixation entstandene Risse von diesen unterscheiden konnte. Die alten ließen sich von den neuen Rissen durch ihre Anfärbbarkeit speziell in der von-Kossa-Färbung unterscheiden. Am Rand des Implantatbettes war die Bildung von noch ungerichteten jungen Knochen zu beobachten, allerdings bestand nur bei wenigen Präparaten ein Kontakt zwischen dem

neuen Knochen und dem Implantat (Abb. 27, 28, 29). Bei dem überwiegenden Teil der Implantate waren sehr wenige Zellen im Vlies zu erkennen, bei einigen Präparaten waren an den Seitenrändern des Vlieses Zellhaufen zu finden. Bei einem Präparat fand sich im Randspalt ein kleiner Zellhaufen aus Chondrozyten mit erkennbarer metachromatischer Interzellulärsubstanz (Abb. 30). Bei einem anderen Präparat befand sich unter dem Implantat eine Ansammlung von Chondrozyten (Abb. 31). Bei dem überwiegenden Teil der Präparate waren im Spalt zwischen Implantat und dem Knochen viele Zellen zu erkennen. Es waren bei einigen Präparaten viele Riesenzellen und eine lymphozytäre Infiltration sichtbar. Auffällig war, dass es bei dieser Versuchsgruppe eine enorme Variationsbreite in der Reaktion gibt. Im Randspalt erkannte man bindegewebige Strukturen und Narbengewebe.

### **3.3.2.2 Implantate ohne Zellen**

Bei den Implantaten ohne Zellen zeigten sich im Vlies dieselben Probleme, größtenteils erscheinen die Vliesfasern sehr dicht zusammengepresst, und auch hier befand sich häufig viel Zement im Vlies. Das Vlies war bei dieser Versuchsgruppe viel stärker resorbiert worden als bei der Gruppe mit Zellen. Bei einigen Präparaten erkannte man bei Vliesfasern, welche von Zement oder Fibrinfasern umgeben waren, sehr deutlich ihre Volumenabnahme (Abb. 32). Größtenteils waren die Vliesfasern, ihre Verbindungspunkte und ihre Verankerung im Zement gut zu erkennen. Bei zwei Präparaten war die Verankerung des Vlieses im darunter liegenden Knochenzement nicht zu erkennen. Zwar sah man bei diesen Implantaten das Vlies, jedoch gab es direkt über dem Zement eine Zone ohne Vlies. Die Zementphase an sich erschien bei dieser Gruppe auch rauer und poröser als nach 7 Tagen. Die Knochenbildung war hier wesentlich weiter entwickelt als in der Gruppe mit Zellen. Man erkannte hier die gebildeten trabekulären Strukturen und die an den Zement gebundenen Knochenbälkchen (Abb. 33). Ein Großteil der Implantate dieser Gruppe war vom Knochen umbaut (Abb. 34). Zwischen den Vliesfasern hatte sich auch bei dieser Versuchsgruppe ein Fibrinnetzwerk ausgebildet, innerhalb dieses Netzwerkes sah man deutliche Leukotaxis. Ansonsten waren bei den Implantaten ohne Zellzusatz wenige Zellen in der Vliesphase. Mehr Zellen fanden sich im Randspalt zwischen Implantat und Knochen. Bei den meisten Präparaten zeigte sich in diesem Randspalt Organisationsgewebe, welches von vielen Gefäßeinsprossungen durchzogen war,

außerdem erkennt man bei einem Großteil leukozytäre Infiltration und Makrophagen (Abb. 39).

### **3.4 28 Tage Liegezeit**

#### **3.4.1 Nach der Explantation**

Bei der Explantation zeigten sich die Operationsnarben gut und ohne Verwachsungen verheilt. Nach Eröffnung des Gelenkspaltes zeigten 3 Tiere eine einseitige Arthrose, bei einem Tier war das Implantat sehr tief in das Bohrloch ins Mark gedrückt. Ein Implantat zeigte einen Defekt auf der cranialen Seite. Die Gelenkflächen sahen glatt aus, auch der Übergang Gelenkfläche Implantat war mit einer Ausnahme in derselben Ebene. Die Knorpelphase des Implantates erschien im Vergleich zum umgebenden Knorpelgewebe blasser und hatte häufig einen gelblichen Farbton.

#### **3.4.2 Lichtmikroskopie**

##### **3.4.2.1 Implantate mit Zellen**

Die Präparate dieser Versuchsgruppe zeigten ein sehr einheitliches Bild. In der Vliesphase waren bei fast keinem Präparat noch freie Vliesfasern auszumachen, lediglich vereinzelt waren Faserreste in einer Fibrin- oder Zement-Ummantelung zu erkennen (Abb. 36). Bei diesen Fasern war eine deutliche Abnahme des Durchmessers zu erkennen. Die Vliesfasern zur Verankerung in der Zementphase waren noch sehr gut zu sehen und hatten auch an ihrem Durchmesser nicht sichtbar verloren. In dem Bereich des Implantates, in dem sich die freien Vliesfasern befanden, sieht man sehr viele Zementpartikel, die bei der Herstellung des Implantates in die Vliesschicht gedrückt wurden, sie lagen nun ohne die bereits resorbierten Vliesfasern im Organisationsgewebe. Auf ihrer Oberfläche waren zahlreiche mehrkernige Riesenzellen auszumachen. Diese kleinen Zementpartikel wirkten viel poröser als die kompakte Zementphase. Die Zementphase stellte sich insbesondere in der von Kossa-Paragon-Färbung sehr dunkel dar und erscheint porös. Auch die Seitenränder zeigten viele kleine Einkerbungen und Auslaugungen und waren nicht mehr so glatt wie in den kürzeren Liegezeiten (Abb. 37). Die vorkultivierten Knorpelzellen der Vliesphase waren nicht mehr zu erkennen. In der Vliesschicht der Implantate zeigte sich in dieser Gruppe bei fast allen Präparaten Organisationsgewebe mit massiver Gefäßeinsprossung und

leukozytärer Infiltration. Auch im Spalt zwischen dem Implantat und dem Bohrlochrand war besonders an den Implantatenden eine teilweise sehr massive Zellinfiltration, bestehend aus Leukozyten, zu beobachten. Bei einem Großteil der Präparate kann man von einer starken Entzündung mit einer plasmazellulären Reaktion sprechen. Diese Reaktionen auf Bereiche des Implantates beschränkten sich auf noch nicht von Knochen umbaute Areale (Abb. 38). Häufig war dies der obere Anteil des Randspaltes und die Unterseite des Implantates. Die massive Reaktion an der Unterseite war umso stärker, je mehr bei der Implantation der Markraum eröffnet wurde. Die Knochenbildung war nach 28 Tagen schon sehr weit vorangeschritten, große Teile der Zementoberfläche waren an Knochen gebunden.

### **3.4.2.2 Implantate ohne Zellen**

Auch in dieser Gruppe sind die freien Vliesfasern fast vollständig resorbiert worden. Nur im dichten Fibrinnetzwerk oder zwischen Zementpartikeln waren noch Vliesfasern mit reduziertem Durchmesser zu erkennen. Die Vliesfasern, welche zur Verankerung tief in die Zementphase des Implantates gelangten, waren unverändert sichtbar. Wie oben bemerkt, zeigten sich in der ehemaligen Vliesschicht zahlreiche Zement-Partikel, welche bei der Herstellung der Implantate in die Vliesschicht gedrückt wurden. Diese sind hier nun vollständig von Organisationsgewebe umgeben und sehr stark resorbiert worden, was sich mit intensiver Anfärbung zeigte (Abb. 39). An den Partikeln waren zahlreiche mehrkernige Riesenzellen zu erkennen. Diese Zementstücke stellten sich besonders in der von-Kossa- und Paragon-Färbung sehr dunkel dar, dies spricht für die Verfügbarkeit von Kalzium und Phosphat und eine entsprechende Adsorption von Silber (Silbernitrat) aus der Färbelösung. Aber auch die Knochenphase der Implantate stellte sich einheitlich sehr porös dar, sie wirkte wesentlich rauer und weniger kompakt als bei den Implantaten aus kürzeren Liegezeiten. Auch die Seitenränder waren wie bei den Implantaten mit Zellen sehr zerklüftet und ausgelaugt. Die Bereiche der Implantate mit Vliesfasern waren bei allen Präparaten komplett von Organisationsgewebe mit einer massiven Gefäßeinsprossung aufgefüllt (Abb. 40). Dieses Organisationsgewebe führte dazu, dass die Defektfüllung auch mikroskopisch in derselben Ebene lag wie der native Knorpel. Bei einigen Präparaten war ein knorpelähnliches Gewebe aus diesem Organisationsgewebe entstanden. In der Randzone neben dem Implantat war besonders im oberen Bereich eine Zellinfiltration zu beobachten, zahlreiche Leukozyten

befanden sich hier in Umgebung des Implantates (Abb. 41). Allerdings fiel die Zellanhäufung nicht so massiv aus wie bei der Gruppe mit Knorpelzellzusatz. Bis auf eine Ausnahme waren die Implantate zu großen Teilen von neu gebildetem Knochen umgeben (Abb. 42). Die Umbauung des Implantates vom Knochen war bei dieser Gruppe wesentlich weiter vorangeschritten als in der Gruppe mit Zellen.

### **3.5 84 Tage Liegezeit**

#### **3.5.1 Nach der Explantation**

Die Operationsnarben waren bei allen Tieren sehr gut verheilt. Nach der Eröffnung des Gelenkspaltes zeigten sich bei keinem Tier Anzeichen für eine Infektion. Bei einigen Tieren war der Defekt kaum noch zu erkennen, die Knorpelschicht war in der gleichen Farbe und in derselben Konsistenz ausgebildet wie beim nativen Knorpel des Kaninchens (Abb. 43).

#### **3.5.2 Lichtmikroskopie**

##### **3.5.2.1 Implantate mit Zellen**

Bei den Präparaten dieser Versuchsgruppe zeigte sich im Resorptionsverhalten ein einheitliches Bild. Die freien Vliesfasern waren bei keinem der 6 Präparate mehr zu erkennen. Nur einige Vliesfaserstücke, welche von Zement-Partikeln umschlossen waren oder in der Zementschicht bei der Herstellung der Implantate verankert wurden, waren noch zu erkennen. Die Polydioxanon-Klebestellen, welche die einzelnen Vliesfasern untereinander verbunden haben, waren deutlich zu erkennen, sie waren allerdings im Vergleich zu den kürzeren Liegezeiten sehr viel brüchiger und wirkten weniger kompakt. Die Zement-Partikel, welche in die Vliesschicht hineingedrückt wurden, sind in dieser Versuchsgruppe in viele kleine Krümel zerfallen und besonders in der von-Kossa-Färbung sehr dunkel angefärbt. Auf der Oberfläche dieser Krümel waren zahlreiche mehrkernige Riesenzellen zu finden. Auch die Zementphase des Implantates war dunkel angefärbt und die Oberfläche erschien rau und porös, was auf eine starke Degradation hindeutet (Abb. 44). Bei einem Implantat war an der Unterseite ein großer Spalt zu erkennen, in welchen es eingeblutet hat (Abb. 45). Fast alle Implantate waren mit neu gebildeten Knochen umbaut. Lediglich ein Implantat hatte nur auf einer Seite Knochenkontakt. Bei diesem Implantat kam es zu einer Kapselbildung.



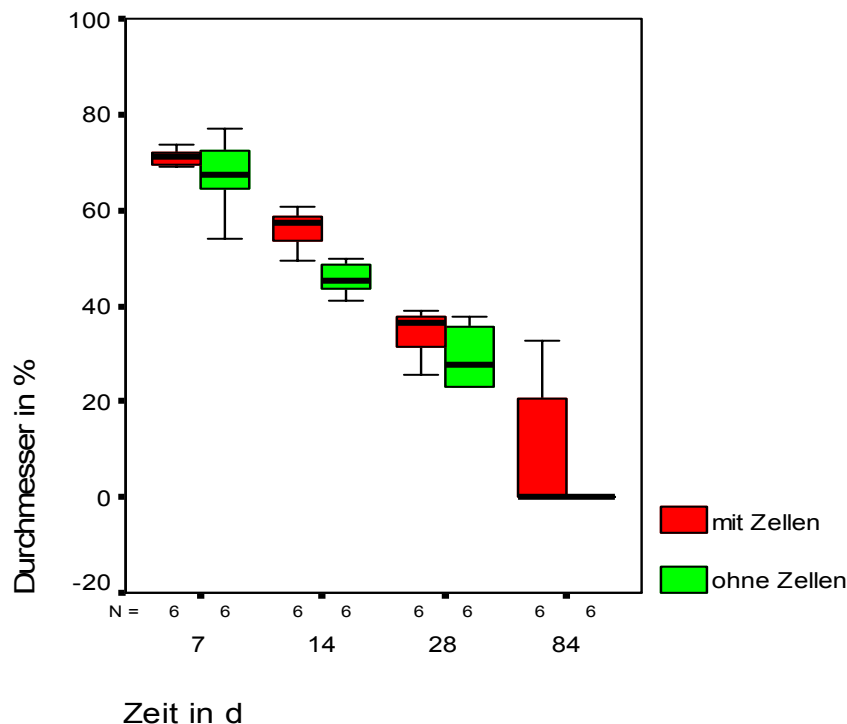
Diese bindegewebige Kapsel liegt dem Zement direkt auf, durch diese Kapsel kommt es bei diesem Implantat zu keinem Kontakt zwischen dem Implantat und dem neu gebildeten Knochen (Abb. 46). In der Vliesschicht zeigte sich bei den Präparaten ein sehr uneinheitliches Bild. Bei drei Implantaten befand sich an Stelle des Vlieses nun eine Schicht Organisationsgewebe mit Leukozyten und einsprossenden Gefäßen. Bei dem Rest waren in der Vliesschicht kleine Gruppierungen aus Knorpelzellen mit metachromatischer extrazellulärer Matrix zu finden (Abb. 47). Über dieser dünnen Knorpelschicht befand sich Knochen (Abb. 48), die Implantate waren komplett von Knochen umbaut (Abb. 49). Aus diesem neuen Knochen entstand an der Oberfläche hyaliner Knorpel, so dass die Defekte vollständig und in einer Ebene mit nativem Knorpel geschlossen waren. Mit einer Ausnahme kam es bei den Präparaten zu einer geringeren Zellinfiltration, welche sich meistens auf die oberen Abschnitte des Spaltes zwischen dem Implantat und dem Bohrlochrand beschränkt. Bei einem Präparat war es zu einer massiven Zellinfiltration mit Leukozyten gekommen (Abb. 50).

### **3.5.2.2 Implantate ohne Zellen**

Auch bei dieser Gruppe waren die freien Vliesfasern vollständig resorbiert, die Polydioxanonklebepunkte hatten im Vergleich zu den Präparaten aus kürzeren Liegezeiten an Volumen verloren. Die Zementphase war von feinen Rissen durchzogen und wirkt sehr rau und porös, die Seitenränder erscheinen ausgefranst, und stellten sich in der von-Kossa-Färbung sehr dunkel dar, was auf eine vermehrte Degradation hindeutet. Bei einigen Präparaten waren Zellen direkt auf der Zementoberfläche zu erkennen. Bei allen Präparaten war das Implantat fest von neu gebildetem Knochen umbaut, ein Implantat sogar auf der Vliesseite (Abb. 51). Ein Implantat war vollständig mit Knochen umbaut, welcher den Defekt damit verschließt (Abb. 52). Die Vliesphase war bei allen Präparaten von gefäßreichem Organisationsgewebe gefüllt. Durch dieses Organisationsgewebe waren die Defekte in derselben Ebene wie der native Knorpel zum Gelenkraum abgeschlossen. Bei einem Implantat zeigte sich in der Vlieszone eine Schichtung mit unterschiedlich vielen Fasern und Gefäßen. Im Randspalt zwischen Implantat und dem Bohrlochrand war vereinzelt kein Kontakt zwischen Implantat und neu gebildetem Knochen.

## 3.6 Histomorphometrie

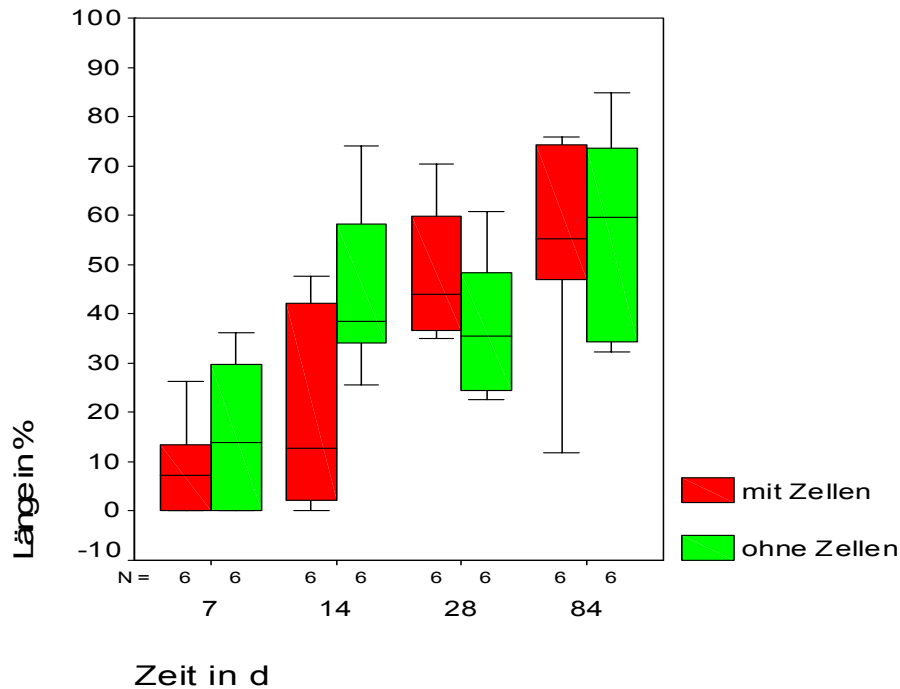
### 3.6.1 Durchmesser der Vliesfasern



**Grafik 1** Boxplot der Mittelwerte der Durchmesser der Vliesfasern. Angabe in % vom Ausgangswert; d= Zeit in Tagen. Die dünnen Striche markieren die Standardabweichung (SD), farblich unterlegte Boxen beinhalten die wahren Werte und der dicke Balken kennzeichnet den Mittelwert.

Es ergaben sich für die einzelnen Liegezeiten uneinheitliche Ergebnisse, wobei die Mittelwerte der Gruppe mit Zellzusatz in den ersten drei Liegezeiten höher waren als in der Gruppe ohne Zellen. Nach 84 Tagen sind in der Gruppe ohne Zellen die Vliesfasern vollständig resorbiert, in der Gruppe mit Zellzusatz zeigt sich eine größere Streuung. Zu allen Messzeitpunkten wurde das Signifikanzniveau von  $p=0,05$  verfehlt. Bei der geringen Stichprobe können die Ergebnisse dahingehend gewertet werden, dass die Degradation der Vliesfasern in der Gruppe ohne Zellzusatz stärker stattfindet und sich die Gruppen zum letzten Messzeitpunkt annähern.

### 3.6.2 Länge des Knochenkontaktes



**Grafik 2** die dünnen Striche markieren die Standardabweichung (SD), farblich unterlegte Boxen Boxplot der Mittelwerte der Länge des Knochenkontaktes zum Zementanteil. Angabe des Knochenkontaktes in % der gesamten Implantatlänge; d= Zeit in Tagen. Die beinhalten die wahren Werte und der dicke Balken kennzeichnet den Mittelwert.

In den einzelnen Liegezeiten ergaben sich uneinheitliche Ergebnisse, wobei sich für keine der Gruppen eine Bevorzugung ergab. Nach 84 Tagen waren in der Gruppe ohne Zellzusatz die Implantate geringfügig mehr mit Knochen umbaut. Zu allen Messzeitpunkten wurde das Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  verfehlt. Bei der geringen Stichprobe können die Ergebnisse dahingehend gewertet werden, dass sich kein signifikanter Nachteil beim Einwachsverhalten der Implantate durch den Zellzusatz ergibt.