

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Biomaterialträger

Die Kalziumkarbonate wurden vor der Zellbeimpfung nicht weiter präpariert und wie von den Herstellern geliefert verwendet. Im Vergleich zu den Kalziumkarbonaten (Kalzit, Biocoral[®]) stellte sich die Implantatherstellung mit Hilfe der abbindenden Trägermaterialien als aufwendiger dar (Abb. 4,5,7). Zum einen konnten die Materialien nur in den entsprechenden Abbindeintervallen verarbeitet werden, zum anderen war eine reproduzierbare Inkorporierung von Vliesfasern in den entsprechenden Trägermaterialien für die Auswertung erforderlich (Abb. 5b). Im Vergleich zueinander besaßen die verwendeten abbindenden Materialien in ihrer Verarbeitungsphase unterschiedliche Konsistenzen: Während das Kalziumsulfat – TCP unabhängig von der Außentemperatur in einer exothermen Reaktion aushärtete, und dabei von einem vergleichsweise liquiden Zustand sehr schnell in den festen Zustand überging, ließen sich die Kalziumphosphatzemente über eine längere Zeitspanne verarbeiten. Auffällig war der Konsistenzunterschied der beiden Zemente nach Mischung der jeweiligen festen und flüssigen Phase. Der Kalziumphosphatzement I (Biobon[®]) stellte sich während der Verarbeitungsphase als eindeutig „flüssiger“ dar, während die Konsistenz des Kalziumphosphatzementes II (Norian SRS[®]) eher trockenen und krümeligen Charakter besaß. Ein direkter Einfluss der initialen Konsistenz auf das Aushärteverhalten bzw. die spätere Homogenität des jeweiligen Materials konnte nicht beobachtet werden. Wurde die Verarbeitungszeit geringfügig überschritten, konnten die Polymervliesfasern nicht mehr vollständig inkorporiert werden. Es kam dann im Verlauf zur Separation der Anteile im Interface meist bei der Herausnahme aus der Gussform oder während der Vorbereitung zur Zellbeimpfung. Dieses Phänomen wurde bei der Verarbeitung aller drei Trägermaterialien beobachtet. Diese Biphasen wurden nicht mit Zellen versehen sondern aus dem Experiment genommen.

Während das Kalziumsulfat – TCP unabhängig von der Umgebungstemperatur nur im trockenen Milieu aushärtete, fand die Aushärtung der Kalziumphosphatzemente im feuchten Milieu bei 37 °C statt. Durch Herabsetzen der Temperatur auf unter 10 °C während der Verarbeitungsphase konnte das Intervall der freien Formbarkeit von 5 auf ca. 10 min. verdoppelt werden, so dass die Kalziumphosphatzemente in dieser verlängerten Phase ihre modellierbaren Eigenschaften behielten. Eine rapide

Aushärtung (unter 2 min.) erfolgte erst bei Erhöhung der Umgebungstemperatur. So wurden die Transplantate nach Einwalken der Vliese im Brutschrank (37 °C) zum Aushärten gebracht (Abb. 4).

Für das Herauslösen der Transplantate aus den Edelstahl-Gussformen musste ein möglichst gleichmäßiger Druck auf das gegossene Implantat ausgeübt werden, damit die seitliche Haftung der Form überwunden werden konnte, ohne dass das Implantat in dieser noch nicht vollständig durchgehärteten Phase zerbrach, was in Vorversuchen meist mittig (im Bereich der Gussformnaht) geschah. Reproduzierbare Ergebnisse konnten unter Einsatz von speziell angefertigten Gussformen aus Teflon erreicht werden. Die Implantate ließen sich dann leicht aus der Gussform herauslösen (Abb. 4).

Durch das Einbringen von Zuckern und Salzen und dem anschließenden Auswaschen dieser Substanzen nach Abbinden der Materialien konnten verschiedene volumenbezogene Porositäten hergestellt werden. Allerdings konnten mit dieser Technik keine streng interkonnektierenden Poren hergestellt werden. Zum Teil verblieben Reste der Platzhalter (Zucker und Salze) im Implantat. Eine Auswirkung dieser Reste auf die Zellen nach erfolgter Beimpfung war nicht auszuschließen. Ein intaktes Interface zwischen Vlies und Trägermaterial konnte nach den Auswaschvorgängen praktisch nicht erreicht werden. Diese Versuchsreihe wurde daher nicht weiter verfolgt (Abb. 12).

3.1.1 Variation der Abbindezeiten

Durch die Vermehrung der flüssigen Phase um 20 % (nach Absprache mit dem Hersteller) bei Kalziumphosphatzement I konnte die Verarbeitungszeit um ca. 50 % verlängert werden. Die ohnehin schon im Vergleich zum Kalziumphosphatzement II geringere Viskosität des frisch angemischten Kalziumphosphatzements I konnte dadurch zusätzlich herabgesetzt werden. Dies führte zu einer initial besseren Integration der Vliesfasern beim Aufbringen der Polymervliese in dem abbindenden Material. Zusätzlich konnten Anzahl und Größe der beobachteten Luftporen reduziert werden. Nach Aushärtung der Implantate aus Kalziumphosphatzement I in den unterschiedlichen Mischungsverhältnissen konnte in der manuellen Prüfung kein Unterschied bezüglich der Endfestigkeit festgestellt werden. In der mikro- und ma-

kroskopischen Auswertung ergaben sich bei den fertig kultivierten Implantaten gleicher Perfusionszeit ebenfalls keine Unterschiede. Insbesondere die bei den Implantaten beobachteten Interfaceseparationen standen in keinem Zusammenhang mit der Vermehrung der flüssigen Phase.

3.1.2 Interface: Technik & Stabilität

Die Gruppe der hier verwendeten Kalziumkarbonate muss wegen der unterschiedlichen Verfahren der Transplantatherstellung von der Gruppe der abbindenden Materialien getrennt betrachtet werden.

3.1.2.1 Kalziumkarbonate

Da der verwendete Aragonit im Gegensatz zum soliden Kalzit eine poröse Struktur aufweist, vergrößert sich die Kontaktfläche im Interface. Bei dem verwendeten Kalzit mit seiner glatten Oberfläche entspricht die Berührungsfläche im Interface zwischen Vlies-Zellkonstrukt und Kalzitträger der Fläche der Oberseite des Kalzitquaders und beträgt damit maximal 1 cm^2 , da es in einigen Präparaten im Randbereich zu leichten Ablöseerscheinungen kam (Abb. 13a). Die poröse Eigenschaft des Biocorals[®], die ein Eindringen (Abb. 13b) der Fibrinogen-Zellsuspension ermöglicht, legt eine Vergrößerung der Berührungsoberfläche mit daraus resultierender mechanischer Verankerung und Erhöhung der Interfacestabilität nahe.

Die Oberfläche des porösen Aragonits wurde wie folgt berechnet:

Die Dichte von reinem Aragonit (ρ_A) beträgt $2,9 \text{ g/cm}^3$, die des porösen Biocorals[®] ρ_B $1,35 \text{ g/cm}^3$ (Angaben des Herstellers). Ein Biocoral[®]-Zylinder mit einem Durchmesser von 4 mm besitzt eine Stirn- bzw. Grundfläche (A_G) von $A_G = r^2 \cdot \pi = 0,22^2 \cdot \pi = 0,1257 \text{ cm}^2$. Geht man von einer Eindringtiefe (h_E) der Zellfibrinogensuspension von nur $500 \text{ }\mu\text{m}$ in die interkonnektierenden Poren (in allen Präparaten erreicht) (Abb. 13b) aus, so ergibt sich ein Volumen (V_{ZA}) für den penetrierten Zylinderanteil.

$$V_{ZA} = r^2 \cdot \pi \cdot h_E = 0,1257 \text{ cm}^2 \cdot 0,05 \text{ cm} = 0,00628 \text{ cm}^3$$

Nach Angaben des Herstellers ist die Oberfläche des verwendeten Aragonits (A_A) größer als 1 m^2 pro Gramm Biocoral[®]. $A_A \geq \frac{1 \text{ m}^2}{1 \text{ g}}$.

Für die Dichte eines Körpers gilt $\rho = \frac{m}{V}$.

Nach Umstellen der Formel berechnet sich die Masse des betroffenen Zylinderanteils

(m_{ZA}) wie folgt: $m_{ZA} = \rho_B \cdot V_{ZA} = 1,35 \frac{g}{cm^3} \cdot 0,00628 cm^3 = 0,0084823 g$

Die Kontaktfläche (A_{ZA}) zwischen dem Biomaterialträger und der Fibrinzellsuspension beträgt durch die Porosität damit

$$A_{ZA} \geq \frac{1m^2}{1g} \cdot m_{ZA} = \frac{1m^2}{1g} \cdot 0,0084823 g = 0,0084823 m^2 = 84,823 cm^2$$

Bei einem Verhältnis von $\frac{A_{ZA}}{A_G} = \frac{\geq 84,823 cm^2}{0,1257 cm^2} \geq 674,8051$ kommt es durch die Porosität

demnach zu einer über 670fachen Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Aragonit und der Fibrinzellsuspension. Eine entsprechende Stabilisierung des Interfaces ist dadurch zu erwarten (Abb.13b). Eine Abhebung vom Trägermaterial im Randbereich war nicht zu beobachten. Durch die sehr geringen Abmessungen der Aragonitträger konnten die entsprechend kleinen Vlieskonstrukte nicht immer optimal auf der Stirnfläche zentriert werden, so dass nicht bei allen Implantaten ein stufenloser Übergang zwischen Knorpel- und Knochenphase hergestellt werden konnte. Bei den in den Glasröhrchen kultivierten Implantaten war dieses Phänomen geringfügiger ausgeprägt, was auf die Schienung während der Kultur zurückgeführt werden konnte (Abb. 8).

3.1.2.2 Abbindende Materialien

Während die Interface-Stabilität bei den Kalziumkarbonaten zunächst lediglich durch den Fibrinkleber gewährleistet wurde (später dann zunehmend durch die Matrixbildung der chondrozytären Zellen), wurde sie in der Gruppe der abbindenden Trägermaterialien durch die zusätzliche Inkorporierung von Vliesfasern in das Material um ein vielfaches erhöht (Abb. 7,9). Durch diese Verankerung einzelner Faserschlaufen des Polymervlieses entstand nach Aushärtung ein Komposit aus zwei Biomaterialien. Bei allen aus abbindenden Materialien hergestellten Implantaten reichte die Eigenstabilität des Interfaces aus, das Eigengewicht des Trägermaterials zu halten, wenn die Implantate mit einer Pinzette am Vlies emporgehoben wurden. Erst ein Reißen am Vlies führte zur Ablösung einzelner Vliesfasern bzw. in einigen Fällen zur Ablösung des gesamten Vlieses. Eine Stabilität des Interfaces ist also bei Abwesenheit des Fibrins bereits vorhanden. Durch die Beimpfung mit der Zellfibrinogensuspension

sion und der anschließenden Fixierung durch Thrombin (wie bei den Kalziumkarbonaten) wird diese Stabilität noch erhöht. Die Oberfläche der abbindenden Trägermaterialien besitzt zwar keine vordefinierte Porosität, wie der zu den Kalziumkarbonaten gehörende Aragonit, allerdings besteht neben einer Mikroporosität eine unregelmäßige Oberfläche. Mit der Vergrößerung der Kontaktfläche erfolgt auch hier eine Stabilitätserhöhung des Interfaces im Vergleich zu einem Trägermaterial mit glatter Oberfläche (Abb. 14).

3.2 Zellisolation

Nach 16-18 Stunden Digestion der zuvor mechanisch zerkleinerten Knorpelstücke fand sich in der Regel eine milchige Suspension aus isolierten Zellen und Matrixbestandteilen. In einigen Fällen war der Knorpel allerdings unzureichend verdaut, was auf unterschiedliche Chargen mit entsprechend unterschiedlichen Enzymaktivitäten der verschiedenen Kollagenasen zurückgeführt werden kann. Nach Abfiltration der noch festen Bestandteile wurden diese erneut in frisch angesetzten Enzymcocktail eingebracht und erneut in Spinnerflaschen für weitere 12 Stunden verdaut. Die Suspension war dann ebenfalls milchig und es wurde wie zuvor beschrieben filtriert und gewaschen. Auf diese Weise wurde die Anzahl der Zellen bei ihrer Gewinnung mehr als verdoppelt. Die Vitalität der Zellen beim ersten Ansatz lag im Durchschnitt bei 85,3 %. Der zweite Ansatz produzierte eine Vitalität von durchschnittlich 97,6 % (Abb. 15). Je nach digestierter Knorpelmenge ergaben sich nach dem Primärverdau Zellzahlen von bis zu 30×10^6 Zellen pro Spinnerflasche.

3.3 Monolayerkultur – Zellvermehrung

Nach der Isolation wurden die morphologisch zunächst runden, in Medium schwimmenden Zellen, in Monolayerkultur gebracht. Nach bereits wenigen Stunden adherierten die ersten Zellen am Boden der Kulturflaschen und bildeten Ausläufer, so dass sie ein fibroblastenähnliches Erscheinungsbild aufwiesen (Abb. 6d). Nach 48h adherierte der größte Teil der vitalen Zellen. Die beim ersten Mediumwechsel (nach 48 Stunden) noch nicht am Boden adherierenden Zellen besaßen eine Vitalitätsrate von durchschnittlich 6,25 %. Nach 6-9 Tagen konnte in der Phasenkontrast-Mikroskopie ein fast vollständig konfluenter Zellrasen beobachtet werden (Abb. 6d). Die Zellen wurden dann zur ersten Passage trypsinisiert. Während der Trypsinierung tendierten die Zellen zum Teil dazu, sich membranartig vom Boden der Kulturflaschen

abzulösen. Dies schien insbesondere dann zu erfolgen, wenn bereits eine vollständige Konfluenz der Zellen am Boden der Zellkulturflaschen eingetreten war. Die sich vervielfältigenden Zellen begannen dann, dreidimensional in eine zweite Schicht zu wachsen. Erst nach mechanischer Bearbeitung (Klopfen an die Tischkante) und Fortführung der Trypsinierung konnten die chondrozytären Zellen von einander getrennt und so isoliert werden. Die Vitalität der Zellen nach der ersten Trypsinierung belief sich durchschnittlich auf 96,4 % (Abb. 15). Während der 2. respektive 3. Passage konnten keine Unterschiede bezüglich der Vitalitätsgrade festgestellt werden. Die Zellzahlen der vitalen Zellen wurden pro Passage ungefähr verdrei- bis vervierfacht.

3.4 Makroskopische Implantatbetrachtung

Das Erscheinungsbild der Knorpeloberfläche schien besonders bei den Kulturzeiten bis 28 d stark zu differieren. Nur bei einigen Implantaten waren Fibrinanteile bereits nach 14 d soweit degradiert bzw. abgebaut, dass Vliesfasern makroskopisch aus der knorpeligen Implantatoberfläche herausragten. Dieses Phänomen war bei zunehmender Kulturzeit rückläufig, so dass nach 42 d nur noch vereinzelt überstehende Vliesfasern zu beobachten waren. In der Regel kam es allerdings zu keinem Herausragen der Vliesfasern aus der Knorpelphase, so dass unterschiedliche Degradationszeiten der Fibrinkomponente angenommen werden mussten. Die Degradationszeiten des Fibrinklebers schienen direkt von dem jeweiligen Ansatz (Fibrincharge und Zellen) bzw. vom Ansatz des Kulturmediums abhängig zu sein: Implantate, die aus der gleichen Fibrinogen-Zellsuspension hergestellt wurden bzw. mit Medium der gleichen Charge fetalen Kälberserums versorgt wurden verhielten sich bezüglich ihres makroskopischen Erscheinungsbildes der Knorpelphase konform. Eine Abhängigkeit von den jeweiligen Trägermaterialien konnte nicht gefunden werden.

Nach Kulturzeiten von 70 bzw. 84 d erschien die knorpelige Phase der Präparate makroskopisch überwiegend homogen und wies einen milchigen Charakter auf. Die Oberfläche erschien in den meisten Präparaten überwiegend eben und besaß einen spiegelnden, glatten Charakter. Neben diesen morphologischen Ähnlichkeiten zu nativem Gelenkknorpel erschien das kultivierte Gewebe palpatorisch ebenfalls druckelastisch, allerdings insgesamt weicher. Vliesbestandteile waren makroskopisch nicht mehr zu erkennen.

Wurden chondrozytäre Zellen in Fibrin ohne Vlies auf die Biomaterialträger aufgebracht (Vorversuche), war nach 84 d die knorpelige Schicht auf den Trägermaterialien zu einem dünnen Film geschrumpft, der palpatorisch einen geleeartigen Charakter besaß. Im Gegensatz dazu kam es unter Verwendung von Polymervliesen nur zu einer minimalen Höhenminderung der knorpeligen Phase. Insgesamt stellte sich das Erscheinungsbild der knorpeligen Phase als unabhängig von der Art des Trägermaterials heraus. Die zu prüfende Interfacestabilität hingegen war direkt von der Art des Trägermaterials und seinen Eigenschaften abhängig.

3.4.1 Kalziumkarbonate

Makroskopisch kam es während der verschiedenen Kulturzeiten bis 84 d zu keiner nennenswerten Veränderung von Erscheinungsbild und manuell geprüfter Konsistenz der beiden Trägermaterialien. Degradationserscheinungen, die Auswirkung auf die für die Materialien charakteristische Konsistenz und Stabilität hätten, konnten während der manuellen Prüfung auch nach 84 d Perfusionskultur bei 37 °C bei keinem der beiden Kalziumkarbonatträger festgestellt werden. Die ursprüngliche Form der Trägermaterialien blieb erhalten. In einem Fall kam es bei einem Präparat (Kulturzeit 14 d) zu einer artifiziellen mechanischen Abscherung der Knorpelschicht von einem Kalzitträger. Dies war auf das Abrutschen und anschließende schnelle, unkontrollierte Nachfassen mit der Pinzette während der Herausnahme der Präparate aus der Kulturkammer zurückzuführen. Zu einer spontanen Ablösung des mit chondrozytären Zellen besetzten Vlieses kam es nicht.

Die Oberfläche der knorpeligen Phase erschien mit ansteigender Kulturzeit zunehmend milchig-homogen. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen Implantaten der Trägermaterialgruppen Aragonit und Kalzit festgestellt werden. Bei der makroskopischen Interfacebetrachtung fiel eine herstellungsbedingte Inkongruenz im Randbereich einiger Aragonit-Implantate auf. Dies konnte auf die sehr kleinen Abmessungen (Tabelle 1) der Trägermaterialien und entsprechend der Vliese zurückgeführt werden.

3.4.2 Abbindende Materialien

Nach der Herstellung der Komposite und Sprengung der Gussformen fanden sich im Randbereich der Trägermaterialien zum Teil kleine Lufteinschlüsse, die als höhlenartige Vertiefungen imponierten. Lagen herstellungsbedingt größere Defekte im Be-

reich der abgebundenen Trägermaterialien vor, wurden diese Implantate aus dem Experiment genommen. Nach PMMA-Einbettung der lichtmikroskopischen Präparate konnten nach einem initialen Sagitalschnitt noch vor der Färbung deutliche Unterschiede bezüglich der Auslaugungserscheinungen beobachtet werden. Während bei KPZ I gleichartige Auslaugungserscheinungen von allen Seiten des Trägers imponierten, ergaben sich bei KPZ II bezüglich der Auslaugungsphänomene deutliche Unterschiede zwischen der vlieszugewandten Seite und den freien Flächen des Kalziumphosphatträgers. Der KPZ II wies in den vliesfreien Abschnitten ohne durchgeführte histologische Färbung einen rötlichen Farbton auf, während der KPZ I in den zentralen Abschnitten seine ursprüngliche weiße Farbe behielt (Abb. 16). Der basale Anteil der Vliese, also die initiale Schicht der inkorporierten Fasern, schien sich bei KPZ I kaum von denen der Oberfläche, aber deutlich vom Rest des Trägermaterials zu unterscheiden. Bei KPZ II war eine deutliche Zweischichtung zu beobachten: Unter der knorpeligen oberen Schicht lagen Vliesfasern weiterhin fest verankert im Trägermaterial (Abb. 16a).

Die makroskopischen Beschaffenheiten der Komposite nach Beimpfung mit der Fibrinogen-Zellsuspension, der anschließenden Fixierung mit verdünntem Thrombin und Auspolymerisierung des Fibrins bei 37 °C im Brutschrank und nach erfolgter Perfusionskultur werden unter den einzelnen Materialien beschrieben.

3.4.2.1 Kalziumphosphat I

Nach dem Abbinden besaß das Trägermaterial im Vergleich zu den anderen verwendeten abbindenden Materialien eine eher grobkörnige Struktur mit entsprechender Oberfläche, wirkte dabei aber nicht bröckelig. Im Verlauf der Perfusionskultur kam es allerdings bei über 90 % der aus Kalziumphosphat I hergestellten Transplantate zu einer Insuffizienz des Interfaces. Im Bereich der tiefliegenden Vliesfasern konnte eine Spaltbildung beobachtet werden, so dass sich die Knorpelphase mit Vlies und oberflächlicher Zementschicht in fast allen Fällen vom Rest des Trägermaterials löste. Zwischen der Herstellung bis zur Entnahme nach 7 Tagen Perfusionskultur schien das Interface noch ausreichend stabil. Auch während der Aufbereitung für die Histologie löste sich nach einer Kulturzeit von lediglich 7 Tagen keines der Vliese.

Nach 14 Tagen Perfusionskultur allerdings waren die Vliese inklusive Interface zum überwiegenden Teil bereits vollständig vom Trägermaterial abgelöst. Bei einigen Implantaten bestanden noch teilweise stabile Brücken während sich von einer Seite her schon eine komplette Ablösung des Vlieses vom Biobon[®] vollzogen hatte. Keines der Präparate dieses Trägermaterials konnte nach 28 Tagen Kulturzeit mit einem suffizienten Interface aufwarten. Die Anteile des Kalziumphosphatzementes, die sich oberhalb der Spaltbildung, also im Vliesbereich befanden, wirkten bröckelig und aufgelockert. Die darunter liegende Masse des Trägermaterials schien allerdings noch zusammenhängend und fest. In der manuellen Prüfung wirkte das Trägermaterial allerdings im direkten Vergleich zum Kalziumphosphat II brüchiger und damit weniger belastungsstabil. Kleine Anteile konnten durch Manipulation mit einer anatomischen Pinzette an den Kanten herausgelöst werden. Eine Abhängigkeit dieser Insuffizienz von der Vermehrung der flüssigen Phase um 20 % zur Verlängerung der Abbindezeit (nach Absprache mit dem Hersteller) konnte in Vergleichsuntersuchungen nicht gefunden werden.

3.4.2.2 Kalziumphosphat II

Im Vergleich zu Kalziumphosphat I wirkte das ausgehärtete Material homogener und besaß eine glattere Oberfläche an den der Gussform zugewandten Seiten. Es kam in dieser Gruppe auch nach 84 d Perfusionskultur nicht zu einer Insuffizienz des Interfaces. Die Fasern waren nach wie vor fest in dem sie umgebenden abgebundenen Zement verankert. Das Gewicht des Trägermaterials wurde problemlos gehalten, wurde das gesamte Transplantat an der knorpeligen Phase emporgehoben. Es musste ein Vielfaches der Gewichtskraft aufgewendet werden, um das Vlies mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette vom Trägermaterial abzulösen. Auch das Ablösen von Materialanteilen von den Kanten des Implantates war bei Kalziumphosphat II nur unter erhöhtem Kraftaufwand möglich, wobei sich kein wesentlicher Unterschied bei der Prüfung zwischen den verschiedenen Kulturzeiten ergab.

3.4.2.3 Kalziumsulfat / TCP

Das Trägermaterial, das initial in einem trockenen Umgebungsmilieu aushärtete, besaß die Konsistenz harter Kreide. Nach Beimpfung erweichte das Trägermaterial im Verlauf der Perfusionskultur, so dass es bereits nach 7d eine pastenartige Konsistenz hatte. Die eingebrachten TCP-Partikel unterlagen dieser Erweichung nicht und behielten ihre ursprüngliche Form bei. Am Boden der Kulturkammer konnte mit zu-

nehmender Kulturzeit eine entsprechende Sedimentation beobachtet werden. Das Interface war damit ebenfalls insuffizient. Es bildete sich makroskopisch eine knorpelähnliche milchige Schicht auf dem erweichten Trägermaterial aus, die bereits nach 28 Tagen eine festere Konsistenz als das Trägermaterial selbst aufwies. Die weiteren Versuche wurden wegen dieser Materialinsuffizienz nicht fortgesetzt. Eine stabile subchondrale Verankerung in der endgültigen Anwendung erschien nicht möglich.

3.5 Lichtmikroskopische Untersuchung

Bei der Aufarbeitung für die Lichtmikroskopie kam es bei einigen Präparaten zu einer unvollständigen Penetration von PMMA in das entsprechende Trägermaterial. Ein Herausfallen von zentralen Anteilen des Trägermaterials aus den einzelnen Präparaten (Sägeschnitten) war die Folge. Da dieser Bereich die für die Lichtmikroskopische Betrachtung zweitrangig war und der Interfacebereich ausreichend penetriert war, wurden diese Präparate für die Interfaceauswertung mit einbezogen. In den folgenden PMMA-Einbettungen wurde die Penetrationszeit um 50 % verlängert.

3.5.1 Knorpelphase

3.5.1.1 Degradation der Polymervliese

Die Degradation der Vliesbestandteile verlief kontinuierlich. Während nach 42 d große Anteile der Fasern aus Polyglykolid-Polylaktid degradiert waren, konnten Polydioxanonklebepunkte (Abb. 1,13) beinahe unverändert nachgewiesen werden. Fasern, die in Polydioxanonklebepunkten bzw. in den Kalziumphosphatzementen lagen, waren dabei deutlicher abgrenzbar als „freiliegende“ Fasern. Ein Zusammenhang zwischen Degradationszeit und verwendetem Trägermaterial konnte nicht festgestellt werden, allerdings schien die Degradation bei den inkorporierten Vliesfaseranteilen in KPZ I einer schnelleren Degradation zu unterliegen, was sich in einer zunehmenden Spaltbildung zwischen Polymervliesfaser und KPZ I widerspiegelte (s. 3.5.2.3).

3.5.1.2 Zell-/ Matrixmorphologie

Eine Redifferenzierung chondrozytärer Zellen zu einer chondrozytentypischen ovalären bis runden Morphologie konnte in fast allen Präparaten beobachtet werden. Diese Redifferenzierung fand sich vor allem bei Zellen, die in den Abschnitten zwi-

schen den Polymervliesfasern lagen (Abb. 17-22). Anteile des Fibrins konnten nach 7 d Kulturzeit noch in allen Präparaten nachgewiesen werden. Die Degradation des Fibrinklebers unterschied sich allerdings erheblich. Sie war dabei weniger vom Trägermaterial des Implantates abhängig als von der Fibrincharge bzw. von der FCS-Charge des verwendeten Mediums. Mit Zunahme der Kulturzeit konnte eine zunehmend metachromatisch anfärbbare Matrix in Form von Zellhöfen beobachtet werden (Abb. 17a,20b,22). Diese matrixreichen Zellhöfe überschritten sich zum Teil, bzw. kommunizierten miteinander, so dass sich dort gleichmäßig verteilt Zellen in homogenen Matrixarealen fanden. In einigen Präparaten konnten Zellen, teilweise in Nestern liegend, beobachtet werden, die in unmittelbarer Nähe des jeweiligen Trägermaterials ihre Matrix produzierten. Die Zellen adherierten zum Teil direkt auf der Materialoberfläche bzw. lagen in Poren der Trägermaterialien (Abb. 21c). Auch in der Nähe von Polymervliesfasern konnten vitale Zellen nachgewiesen werden, die metachromatisch anfärbbare Matrix erzeugten. An der Oberfläche der knorpeligen Schicht fanden sich in fast allen Präparaten lang gestreckte fibroblastenähnliche vitale Zellen (Abb. 21d). Einige Zellen stellten sich in den verschiedenen Färbungen als avital bzw. fragmentiert nur noch als Zellbestandteile dar. Dieser Zelluntergang schien in keinem Zusammenhang mit der Zelldichte bzw. der -verteilung zu stehen, die zum Teil eine erhebliche Varianz aufzeigten. Eine Abhängigkeit von den verschiedenen Trägermaterialien konnte dabei ebenfalls nicht festgestellt werden. Die Zellverteilung erschien am homogensten in den Vorversuchen, bei denen keine Polymervliese zum Einsatz kamen. In den Vliesen konnten immer wieder zellreichere und -ärmere Areale gefunden werden.

3.5.2 Interface

Die durch die Herstellung der Polymervliese bedingten Unregelmäßigkeiten von Form und Oberfläche der Vliese führten zum Teil zu unterschiedlichen Abständen zwischen Biomaterialträger und aufliegendem Vlies. In der Regel lag die Mitte der Vliese dem Trägermaterial direkt auf, während in den Randbereichen zum Teil ein größerer Abstand verzeichnet wurde. Das Erscheinungsbild der Interface stellte sich den Eigenschaften der verschiedenen Trägermaterialien entsprechend dar und soll im Folgenden separat vorgestellt werden.

3.5.2.1 Aragonit

Das Penetrieren der Zellsuspension in das poröse Trägermaterial war in allen Präparaten zu beobachten: Die Penetrationstiefe lag dabei zwischen 0,5 und 2,5 mm, im Durchschnitt bei 1,1 mm (Abb. 13b). In den Sägeschnitten konnten innerhalb der Poren matrixproduzierende vitale chondrozytäre Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13). Direkt an der Oberfläche des Trägermaterials adherierende Zellen produzierten zum Teil ebenfalls metachromatisch anfärbbare Matrix (Abb. 18,19). In einigen Präparaten lagen Polymervliesfasern dem Trägermaterial Aragonit direkt auf, zum Teil ragten sie geringfügig in die Poren des korallinen Materials hinein (Abb. 13). Der zunächst durch Fibrin und nach längeren Kulturzeiten entsprechend durch Matrixbestandteile überbrückte Abstand zwischen dem PGLA Gerüst und dem Trägermaterial betrug in keinem der Präparate mehr als 150 µm. Die maximalen Abstände wurden dabei nur in den Randbereichen gemessen, während die Vliese im Zentrum in der Regel direkt auf den Aragonitträgern auflagen.

In den nach von Kossa / Paragon gefärbten Materialien wurde eine inhomogene Anfärbung des Trägermaterials beobachtet. Weniger stark gefärbte, lichtbrechende Partikel mit scharfen Kanten lagen in einer homogen schwarz anfärbbaren, die Oberfläche des porösen Materials bildenden, Struktur (Abb. 18). Das Trägermaterial zeigte ab einer Kulturzeit von 7 d im Interfacebereich Auslaugungsphänomene an seiner Oberfläche (Abb. 18b). Dadurch wurden kristalline Substrukturen an der Oberfläche erkennbar.

3.5.2.2 Kalzit

Eine Adhärenz von chondrozytären Zellen an der Oberfläche dieses Kalziumkarbonatträgers konnte in allen Präparaten beobachtet werden. Diese adherenten Zellen, als auch solche, die im Bereich des Interfaces nicht direkt an der Oberfläche des Trägermaterials adherierten, waren zum Teil bereits nach 14 d von metachromatisch anfärbbaren Höfen umgeben (Abb. 17a). Metachromasie direkt an der Oberfläche dieses Trägermaterials konnte zum Teil ebenfalls nachgewiesen werden. Nach Kulturzeiten von 42 d lagen vitale chondrozytäre Zellen überwiegend gleichmäßig verteilt zwischen Polymerfasern ohne an diesen zu adherieren (Abb. 17b,c).

3.5.2.3 Kalziumphosphatzement I

Vitale chondrozytäre Zellen konnten in unmittelbarer Nähe von PGLA-Polymervliesfasern und Teilen des Trägermaterials KPZ I, zum Teil adherierend, beobachtet werden. In einigen Bereichen lagen die Zellen in Nestern und waren von konfluierenden metachromatisch anfärbbaren Höfen umgeben (Abb. 20). In der kleinsten Vergrößerung (Übersicht) zeigte sich bereits nach 14 Tagen Perfusionskultur eine deutliche Spaltbildung im Bereich des Interfaces (Abb. 23a). Das die Vliesfasern umgebende Trägermaterial wirkte mit zunehmender Kulturzeit aufgelockerter (Abb. 23b). In den meisten Präparaten war ein direkter Kontakt zwischen Polymerfasern und Trägermaterial nur noch vereinzelt nachweisbar. Es fand sich eine zirkumferente Spaltbildung zwischen Faserbündel und Trägermaterial (Abb. 23c). Die bereits makroskopisch nachweisbaren Auslaugungserscheinungen imponierten nach den unterschiedlichen Färbungen entsprechend in den lichtmikroskopischen Untersuchungen: In der Alzian / PAS Färbung glich die Intensität der überwiegend violetten Anfärbung von Anteilen des Kalziumphosphatzementes im Bereich des Vlieses dabei der oberflächlichen Schichten der Seitenflächen (ohne Polymervlies) dieses Trägermaterials. Ein deutlicher Unterschied der Anfärbung bestand hingegen bei den Anteilen aus der Mitte des Trägers, die sich überwiegend homogen blau färbten (Abb. 23a, b). Eine Auflockerung des Materials konnte in diesem Bereich nicht beobachtet werden.

3.5.2.4 Kalziumphosphatzement II

Polymervliesfasern und Trägermaterial standen auch nach den langen Perfusionskulturzeiten weiterhin in festem Verbund. Eine Spaltbildung konnte auch mikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Der überwiegende Anteil der Polymerfasern stand in direktem Kontakt mit dem Trägermaterial KPZ II (Abb. 24). Einzelne Fasern und Faserbündel waren bis zu einer Tiefe von mehr als 1000 μm nachweisbar (Abb. 24a). Metachromatische zum Teil konfluierende Höfe umgaben runde bis ovaläre vitale chondrozytäre Zellen in unmittelbarer Nähe von Polymervliesbestandteilen und Trägermaterial. Zum Teil wurden an dem KPZ II adherierende Zellen beobachtet, die auch in diesem Bereich Matrix produzierten. An der Seitenfläche eines Trägers in einer Pore, die vermutlich durch einen Lufteinschluss bei der Herstellung des Implantates entstanden war, fanden sich mehrere vitale Zellen in der sie umgebenden Matrix (Abb. 21c).

3.5.2.5 Kalziumsulfat / TCP

Auch bei diesem Trägermaterial konnte lichtmikroskopisch eine gute Zellverträglichkeit nachgewiesen werden. Zellen, zum Teil in Nestern liegend, waren von metachromatisch anfärbbaren Höfen umgeben, die teilweise konfluieren, so dass in diesen Bereichen eine homogene Matrix zu beobachten war (Abb. 22). Da das Trägermaterial bereits nach 7d vollständig erweicht war, konnte kein fester Verbund zwischen Polymervlies und Träger nachgewiesen werden. Einzelne Fasern waren von Anteilen des erweichten Kalziumsulfat / TCP-Gemisches umgeben, die allerdings in keinem festen Kontakt zu dem Rest des Trägers standen.

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Präparation für die Elektronenmikroskopie gestaltete sich schwierig. Die Präparate mussten für die Untersuchung auf die richtige Größe gebracht werden ohne das zu untersuchende Interface dabei zu beschädigen. Dies gelang nur in wenigen Fällen. Im Bereich des Interfaces konnten allerdings Interaktionen der Zellen mit den Biomaterialträgern beobachtet werden. Die Zellen lagen nach 28 d in der von ihnen produzierten Matrix in unmittelbarer Nähe von kristallinen Strukturen der Biomaterialträger. In Bereichen, in denen die produzierte Matrix dem Trägermaterial direkt auflag, konnte keine Spaltbildung beobachtet werden (Abb. 25). Bei höheren Vergrößerungen konnten in der Matrix neben lang gezogenen fibrillären Filamenten und nadel-förmigen elektronendichten Strukturen kleinere rundliche Granula beobachtet werden (Abb. 25b).

3.7 Rasterelektronenmikroskopie

Sowohl die Darstellung der nativen Polymervliese (Abb. 1) als auch die der kultivierten Implantate stellte sich auf Grund der Thermolabilität des Materials als schwierig dar. Artefaktbildungen wie Risse in der Besputterung und Beschädigung des darunter liegenden Materials konnten nicht ausgeschlossen werden. In der glatt erscheinenden Oberfläche der Knorpelphase zeichneten sich Zellkörper und Fasern des Polymervlieses ab. Die Zellen erschienen dabei gleichmäßig verteilt und ohne eine besondere Affinität zu den Polymerfasern in der sie umgebenden Matrix zu liegen (Abb. 26). Wurde das Interface aufgebrochen, lagen matrixproduzierende Zellen in direkter Nähe von Trägermaterial und Polymervliesfasern. Die Zellen kommunizierten im

Bereich des Interfaces über ein fibrilläres Netzwerk aus Fibrinresten und neuproduzierter Matrix miteinander (Abb. 27).

3.8 Weitere Ergebnisse

3.8.1 Mediumzufuhr in Experiment I

Die wegen des Glasröhrchens seitlich begrenzte Mediumzufuhr (Abb. 8), im Gegensatz zur vollständigen Umspülung des Implantates, hatte weder auf das makroskopische noch auf das mikroskopische Erscheinungsbild der Präparate Einfluss. Die Zellen lagen in beiden Gruppen zum größten Teil gleichmäßig verteilt vor. Ein Unterschied bezüglich der Orientierung der Zellen bzw. ihrer produzierten Matrix konnte nicht festgestellt werden. Die Mediumversorgung, die ausschließlich von der Knorpel- bzw. von der Knochenseite erfolgte, hatte somit keinen Einfluss auf die Differenzierung des Gewebes.

3.8.2 Kristallographische Röntgenanalyse

In der Kristallographie der Ausgangsmaterialien konnten folgende chemische Zusammensetzungen ermittelt werden: Bei dem Kalziumphosphatzement I (Biobon[®]) handelt es sich um einen reinen Brushit [$\text{CaPO}_3(\text{OH}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]. Im Ausgangsmaterial des Kalziumphosphatzements II (Norian SRS[®]) konnte neben dem Hauptbestandteil Trikalziumphosphat (TCP) [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] auch Kalziumpyrophosphat [$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$] nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kalziumphosphatzementen handelte es sich bei dem untersuchten Aragonit (Biocoral[®]) kristallradiographisch um einen reinen Kalziumkarbonat [CaCO_3] (Abb. 28). Nach dem Abbinden des Kalziumphosphatzements I (Biobon[®]) und anschließender Schüttelbadbehandlung zur gleichmäßigen Umspülung mit Simulated Body Fluid (SBF) über 24 Stunden bei 37 ° konnte kristallradiographisch Hydroxylapatit (HA) [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] als Hauptbestandteil neben Trikalziumphosphat (TCP) [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] nachgewiesen werden. Nach 28 Tagen im Schüttelbad unter gleichen Konditionen ergab sich in der Analyse ein reiner Hydroxylapatit (HA) [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] (Abb. 29).

3.8.3 Wasserstoffionenkonzentration der verbrauchten Medien: Vergleich der beiden Kalziumphosphatzemente

Zum Zeitpunkt der Entnahme der Biphasen aus der Kulturkammer wurde eine pH-Bestimmung des Mediumablaufs durchgeführt. Während das verbrauchte Medium

der Präparate aus KPZ I nach 28 Tagen zum Teil einen pH > 8 aufwies, blieb der pH bei KPZ II deutlich darunter und lag um die pH 7,7. In jedem Falle aber kam es bei beiden Materialien zu Verschiebungen des pH in den basischen Bereich (Abb. 30). Die sauren Zerfallsprodukte der Polymervliese, als auch die in der Regel sauren Metabolite des Zellstoffwechsel führten unter Perfusionskultur gemeinsam mit den Kalziumphosphatzementen zu keiner pH-Verschiebung in den sauren Bereich.