

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Halle (Saale)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Plontke)**

Histologische Auswertung einer tierexperimentellen Studie zur
Integration von Hybridsystemen aus Polyethylen und autologen
Zellen in das Umgebungsgewebe

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
von Annekatriin Markwart,
geboren am 16.03.1980 in Halle-Dörlau

Betreuer:	PD. Dr. med. K. Hoffmann
Gutachter:	Prof. Dr. med. habil. D. Wohlrab Prof. Dr. rer. nat. habil. T. Groth PD Dr. med. K. Hoffmann (Weimar)
Eröffnungsdatum:	17.05.2011
Verteidigungsdatum:	26.06.2013

Referat

Polyethylen (PE, Medpor®) ist ein in der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie oft eingesetztes, gut verträgliches Knorpelersatzmaterial. Auf Grund seiner Eigenschaften – leichte Formbarkeit, bemerkenswerte Stabilität, Elastizität und schnellen Gewebeeinwuchs – wird es seit 20 Jahren zur Korrektur von Schädel- und Gesichtsverletzungen genutzt. Trotz der positiven Eigenschaften wird auch nach langen Zeiträumen immer wieder von Abstoßungsreaktionen berichtet (Ozturk et al., 2002; Sosna et al., 2003; Naumann et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde am Meerschweinchenmodell untersucht inwieweit die Funktionalisierung der Oberflächen des Polyethylens durch Kollagenbeschichtung bzw. Plasmabehandlung und nachfolgender Aufbringung von Kollagen II zu einer besseren Integration der Implantate in das Umgebungsgewebe führt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Vorbesiedlung des Implantats mit autologen Chondrozyten in Kombination mit der Oberflächenmodifikation von PE analysiert.

Zur Gewinnung autologer Chondrozyten wurde den Tieren aus der Ohrmuschel Knorpelgewebe entnommen. Die nach enzymatischer Verdauung isolierten Chondrozyten wurden in Monolayerkultur vermehrt und die PE-Proben nachfolgend mit diesen Zellen besiedelt. Die besiedelte Probe wurde in die Concha des Meerschweinchens implantiert. Eine in gleicher Weise oberflächenmodifizierte, unbesiedelte Probe wurde als interne Kontrolle in das andere Ohr eingebracht. Nach einem, sechs und zwölf Monaten wurden die Tiere getötet und die Implantate mit dem Umgebungsgewebe histologisch aufgearbeitet. Die mikroskopische Auswertung der histologischen Präparate zeigte bei den Sechs-Monats- und den Zwölf-Monats-Tieren deutliche Unterschiede zwischen den besiedelten und den nicht besiedelten Proben. Die Vorbesiedlung der Proben erbrachte ein gutes Knorpelwachstum und eine bessere Integration in das umliegende Gewebe. Diese Effekte erreichten in der statistischen Auswertung bei den Zwölf-Monats-Tieren das Signifikanzniveau. Die Modifizierung der PE-Proben mittels Sauerstoff-Plasma-Behandlung und Kollagen-II-Beschichtung zeigte in allen Gruppen mikroskopisch keinen signifikanten Effekt.

Markwart, Annetrin: Tierexperimentelle Studie zur Integration von Hybridsystemen aus Polyethylen und autologen Zellen in das Umgebungsgewebe. Halle, Univ. Med. Fak., Diss. 75 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. KNORPEL	1
1.1.1. KNORPELARTEN UND KNORPELLÄSIONEN	1
1.2. BIOMATERIALIEN	3
1.3. POLYETHYLEN ALS BIOMATERIAL	6
1.4. TRANSPLANTATIONSRSIKEN	7
1.4.1. BISHERIGER STAND DER FORSCHUNG	8
2. ZIELSTELLUNG	10
3. MATERIAL UND METHODEN	11
3.1. MATERIAL	11
3.1.1. POLYETHYLEN-PROBENVORBEREITUNG	11
3.2. VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG	11
3.3. OPERATIONSTECHNIKEN	12
3.3.1. ZELLISOLIERUNG UND ZELLKULTIVIERUNG	12
3.3.2. IMPLANTATION	12
3.3.3. EXPLANTATION	13
3.4. SCHNITTTECHNIK	13
3.5. FÄRBUNGEN	14
3.5.1. GIEMSA-FÄRBUNG	14
3.5.2. MASSON-GOLDNER-FÄRBUNG	15
3.5.3. HÄMATOXILIN-EOSIN-(HE)-FÄRBUNG NACH EHRlich	15
3.6. FLÄCHENBESTIMMUNG	15
3.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	16
4. ERGEBNISSE	17
4.1. MIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE	18
4.2. STATISTISCHE ERGEBNISSE	28
4.2.1. ANZAHL UND FLÄCHE DER FREMDKÖRPERRIESENZELLEN, T-TEST	28
4.2.2. VERGLEICH DER BESCHICHTUNGSGRUPPEN, POST-HOC-TEST, LSD	28
4.2.3. FREMDKÖRPERRIESENZELLEN UND MODIFIZIERTE PE-IMPLANTATE, ANOVA	28
4.2.4. KNORPELENTWICKLUNG, ANOVA	29
5. DISKUSSION	31
5.1. TISSUE ENGINEERING VON KNORPEL	31
5.1.1. IN VITRO KULTUR PRIMÄRER CHONDROZYTEN	32
5.1.2. POLYETHYLEN ALS NICHTRESORBIERBARE MATRIX	34
5.2. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG	36
6. KLINISCHE RELEVANZ	43
7. ZUSAMMENFASSUNG	44
LITERATURVERZEICHNIS	45
ANHANG	53
THESEN	75
CURRICULUM VITAE	

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG
DANKSAGUNG

Abkürzungsverzeichnis

μm	Mikrometer
3D	dreidimensional
ACI	Autologe Chondrozyten Implantation
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
Aqua dest	destilliertes Wasser
BEC	Basic expansion condition
bFGF	Basic fibroblastic growth factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bzw.	beziehungsweise
cm^3	Kubikzentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetales Kälber Serum
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
FKRZ	Fremdkörperriesenzelle
g	Gramm
GAG	Glycosaminoglycan
GBSS	Gey's balanced salt solution
GFSEC	Growth factor supplemented expansion condition
H_2O	Wasser
HLA	Human Leucocyte Antigene
HNO	Hals- Nasen- Ohren
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm^2	Quadratmillimeter
mm^3	Kubikmillimeter
mRNA	Mitochondriale Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSK	Meerschweinchenknorpel-Tier-Nummer
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF-bb	Platelet derived growth factor bb
PE	Polyethylen
PE_coll	Polyethylen mit Kollagen II beschichtet
PE_O ₂ -coll	Polyethylen mit Plasma behandelt und Kollagen II beschichtet
PMMA	Polymethylmethacrylat
Po_OII	Polyethylen mit Kollagen II beschichtet
Po_OO	Polyethylen ohne Oberflächenmodifikation
Po ₄ _O3II	Polyethylen mit Sauerstoff-Plasma behandelt und Kollagen II beschichtet
PTFE	Polytetrafluorethylen
PU	Polyurethan
rpm	Rotation per minute
sec	Sekunden
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight-Polyethylen

W
z.B.

Watt
zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Knorpel

Histologie

Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben. Er ist morphologisch gekennzeichnet durch Knorpelzellen (Chondrozyten) und eine charakteristische Interzellulärsubstanz (extrazelluläre Matrix) (Junqueira et al., 1991).

In der Lichtmikroskopie sieht man Chondrone (Territorien), bestehend aus jeweils einer Gruppe von runden oder ovalen Knorpelzellen mit stark basophiler Knorpelkapsel (Chondroitinsulfat) (Leonhardt, 1990). Die Chondrone sind in die Interzellulärsubstanz eingebettet und lassen sich durch hell erscheinende Knorpelhöfe deutlich von dieser abgrenzen (Kühnel, 1992).

Subperichondral ist diese Gliederung aufgehoben. Das Perichondrium, bestehend aus langgestreckten Fibrozyten und Kollagenfasern, geht allmählich in das eigentliche Knorpelgewebe über. Dabei strahlen die Bindegewebsfasern des Knorpels in das Perichondrium ein.

Reifes Knorpelgewebe ist avaskulär und wird auch als bradytrophes Knorpelgewebe bezeichnet. Der gesamte Stoffwechsel erfolgt durch Diffusion über die extrazelluläre Matrix. Dabei gelangen die Nährstoffe vom gefäßreichen Perichondrium zum Knorpelgewebe (Leonhardt, 1990).

Die extrazelluläre Matrix besteht aus Kollagen, Proteoglykanen, Wasser und einer geringen Menge Mineralien. Das Kollagen macht 50% des Trockengewichts und 90% des Proteingehaltes des Knorpels aus.

Die Kollagenbildung erfolgt über eine von den Chondroblasten synthetisierten Vorstufe, dem sogenannten Tropokollagen. In der Knorpelgrundsubstanz wird Tropokollagen zu Kollagen umgewandelt und in diese eingebettet. Hauptsächlich wird Kollagen II gebildet.

Im Knorpel vorkommende Glykosaminoglykane sind Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. Chondroitinsulfat kann bis zu 40% des Trockengewichts von Knorpelgewebe ausmachen (Löffler, 1990). Typische physikochemische Eigenschaften der extrazellulären Matrix sind die Gewährleistung einer reibungslosen Gelenkfläche, die Fähigkeit mechanischen Kräften ohne Deformation zu widerstehen und impulsartige Kräfte zu absorbieren. Knorpelgewebe kann je nach Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz Druck- und/oder Zugkräfte kompensieren und damit stoßdämpfend und elastisch wirken.

1.1. 1. Knorpelarten und Knorpelläsionen

Man unterscheidet drei verschiedene Knorpelarten. Die am häufigsten vorkommende Knorpelart ist hyaliner Knorpel gefolgt von elastischem- und Faserknorpel.

Das Vorkommen der einzelnen Knorpelarten ist in Tabelle 1 dargestellt (Leonhardt, 1990; Milz et al., 2002).

Tabelle 1 Knorpelarten und ihr Vorkommen

Hyaliner Knorpel	Elastischer Knorpel	Faserknorpel
Gelenkknorpel	Ohrmuschel	Zwischenwirbelscheiben
Rippenknorpel	Äußerer Gehörgang	Symphysis pubica
Wachstumsfugen	Tuba auditiva	Teilen von Disci und Menisci
Atemwege	Epiglottis	Teile der Gelenke
Nase	Teile des Kehlkopfskelettes	Anteile der Trochlea
Trachea	Kleinste Bronchialknorpel	
Große Bronchien		
Kehlkopf		

Die einzelnen Knorpelarten unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix.

In der Trockensubstanz enthält hyaliner Knorpel 40% Kollagenfasern, das Proteoglykan Chondroitinsulfat sowie ca. 7% wasserunlösliche Eiweiße.

Elastischer Knorpel enthält, neben Kollagen II, elastische Fasernetze, die eine gelbliche Eigenfarbe besitzen. Diese umgeben die Chondrone, ziehen durch die Interzellulärsubstanz und strahlen in das Perichondrium ein. Die elastischen Fasern bedingen die hohe Biegefestigkeit dieser Knorpelart.

Faserknorpel ist eine Mischform aus Knorpel und Bindegewebe. Hauptsächlich besteht er aus unmaskiert vorliegendem Kollagen I, Grundsubstanz ist kaum vorhanden. Wegen des geringen Anteils an Grundsubstanz wird er auch als Bindegewebsknorpel bezeichnet und erscheint azidophil. Die Kollagenfaserbündel des Typs I und II liegen dicht beieinander und sind unregelmäßig angeordnet. Zwischen ihnen liegen weit auseinander sehr zellarme Chondrone bzw. einzelne Chondrozyten. Faserknorpel besitzt kein Perichondrium und zeichnet sich durch eine hohe Druckfestigkeit aus.

Kommt es zur Knorpelläsion nach Wachstumsabschluss wird der Defekt durch Proliferation perichondraler Bindegewebszellen aufgefüllt. Diese Bindegewebszellen haben eine nur geringe Potenz zur metaplastischen Umwandlung in Chondrozyten (Schaefer et al., 2000; Brittberg et al., 1994; Radin et al., 1984).

Vor diesem Hintergrund entsteht die Suche nach geeigneten Knorpelersatzmaterialien.

1.2. Biomaterialien

Zu den wichtigsten Aufgaben der modernen Medizin gehört die Wiederherstellung bzw. der Ersatz von Zell-, Gewebs- und Organfunktionen. Oft wird durch Organtransplantationen oder durch Implantate eine Verlängerung des Lebensalters von Patienten oder eine Verbesserung ihrer Lebensqualität erreicht.

Die autologe Transplantation ist gekennzeichnet durch die Verwendung körpereigenen Gewebes zur Defektdeckung (Papa et al., 1994; Wustrow et al., 1991). Transplantate anderer Individuen, aber derselben Spezies werden als homologe Transplantate bezeichnet (Wustrow et al., 1991). Werden Gewebe oder Organe einer anderen Spezies verpflanzt, bezeichnet man dieses als heterologe (xenogene) Transplantation (Kornberg et al., 1999; Wustrow et al., 1991). Alloplastische Transplantate sind Fremdmaterialien, die zum Verbleib im Körper implantiert werden (Wustrow et al., 1991).

Als Knochen- und Knorpelersatz im Kopf-Hals-Bereich verwendet man verschiedene (Bio-)Materialien, z.B. Aluminiumoxidspangen (Bujia et al., 1994), Trikalziumphosphatkeramiken (Wiltfang et al., 2002), Hydroxylapatit, Granulate, Zemente (Henkel et al., 2002; Reddi et al., 1999), Titan (Kuttenberger et al., 2001), Kohlefaserverbundwerkstoffe (Saringer et al., 2002; Zeilhofer et al., 1997) und andere (Graham et al., 2001; Herzog et al., 1994; Juraha, 1992; Pak, et al., 1998; Raphael et al., 1999).

Biomaterialien werden eingeteilt nach ihrer biomechanischen Funktion (Gewebeersatz, Gelenkflächenersatz, Stabilisierung), nach ihrer Funktionsdauer (Dauerimplantate, wie z.B. Gelenkprothesen, temporäre Implantate, z.B. Osteosyntheseimplantate) und nach ihrer biologischen Stabilität (biostabile Implantate, z.B. Gelenkprothese, biodegradierbare Materialien, z.B. resorbierbares Nahtmaterial). Das Ziel ist die Erhaltung der Biofunktionalität über lange Zeiträume. Dabei sind Materialeigenschaften notwendig, die für die Erfüllung der Funktion im Gewebe dienlich sind. Zum Beispiel Abriebfestigkeit bei Gelenkersatzmaterial, ausreichende mechanische Stabilität und Elastizität bei Knorpel- und Knochenersatzmaterialien (Temenoff et al., 2000; Wise, 2000).

Da die technischen Anforderungen je nach Einsatzort und Funktion differieren, werden verschiedene Materialien aus verschiedenen Stoffklassen verwendet.

Dazu gehören vor allem polymere Kunststoffe, die zu den organischen Materialien zählen, sowie Keramiken und Metalle, die beiden letzteren sind mineralische Werkstoffe (A. Berghaus, 1992).

Im biologischen Milieu finden sich eine Vielzahl von verschiedenen Ionen und biologischen Makromolekülen welche längerfristig Abbaureaktionen (z.B. Korrosion

von Metallen, Versprödung von Polymeren) und damit Materialermüdung bewirken können.

Diese Abbaureaktionen können bei bestimmten Materialien erwünscht sein (resorbierbares Nahtmaterial), nicht jedoch bei Dauerimplantaten bei denen dadurch die Langzeithaltbarkeit eingeschränkt würde. Dabei sollen Biomaterialien ihre Funktion erfüllen, ohne das Gewebe zu beeinträchtigen (Ratner, 2001; Naumann et al., 2003).

Die Gewebeintegration der Biomaterialien ist abhängig von Struktur und Oberfläche. Es wird unterschieden zwischen soliden oder porösen Strukturen. Letztere begünstigen die Nährstoffversorgung aus der Umgebung und damit das Einwachsen von Gewebestrukturen.

Der Abbau degradierbarer Materialien wird durch eine poröse Struktur beschleunigt, andererseits ist der Vorteil von z.B. porösen Keramiken der potenzielle Einwuchs von Knochen, welcher wiederum die Stabilität des Materials erhöht. Die bei Keramiken am besten dafür geeignete Porengröße liegt bei ca. 500 μm .

Die Oberfläche von Biomaterialien kann rau oder glatt sein. Eine raue Oberfläche ermöglicht die bessere Verankerung des Materials im Gewebe. Durch Beschichtung erlangen die Materialien oft eine höhere Rauigkeit, dadurch wird die Adhäsion von Gewebe zusätzlich begünstigt (Klee et al., 1999).

In Tabelle 2 werden einige Polymere sowie deren medizinische Anwendung aufgeführt.

Tabelle 2 Beispiele für den Einsatz von Polymeren

Nicht resorbierbare Polymere	
Silikon	<ul style="list-style-type: none"> - Weichteilersatz (plastische Chirurgie) - künstliche Fingergelenke (Orthopädie) - (temporäre) Platzhalterfunktion: Paukenröhrchen, laryngotracheale Stents, Tracheal-T-Röhrchen
Polyurethan (PU)	<ul style="list-style-type: none"> - Künstliche Herzklappen, Herzschrittmacher, intraaortale Ballons und Katheter (Gefäßchirurgie)
Polytetrafluorethylen (PTFE) = Goretex, Teflon	<ul style="list-style-type: none"> - Gefäßprothese (Gefäßchirurgie) - Bandersatzmaterial (Orthopädie)
Poly(methylmethacrylat) PMMA	<ul style="list-style-type: none"> - Knochenzement in Hüftendoprothetik - Intraocularlinse (Augenchirurgie) - Künstliche Herzklappen (Gefäßchirurgie)

EINLEITUNG

Polyethylen (PE) Ultra-high-molecular-weight-Polyethylen (UHMWPE) Low-density-Polyethylen Poröses Polyethylen	<ul style="list-style-type: none"> - Gleitwerkstoff in Hüft- und Kniegelenksendoprothetik - Ophthalmologische, rekonstruktive, kardiovaskuläre Chirurgie - Rekonstruktion von Sehnen (Neurochirurgie) - Herstellung von Hilfsmitteln zur Kontrazeption - Ossikulaprothesen (Mittelohrchirurgie) - Korrektur von Gesichts- und Schädeldefekten, Ohrmuschelrekonstruktion, Trachealersatz, Unterfütterung von Stimmlippen
Resorbierbare Polymere	
Polyactid	<ul style="list-style-type: none"> - Nahtmaterial - Im Bereich gering belasteter Frakturen Befestigung kleinerer Knochenfragmente (Kiefer- und Gesichtschirurgie)
Polyglycolid	<ul style="list-style-type: none"> - Nahtmaterial - Im Bereich gering belasteter Frakturen Befestigung kleinerer Knochenfragmente (Kiefer- und Gesichtschirurgie)

Polymere werden in resorbierbare und nicht resorbierbare Polymere unterteilt. Nicht resorbierbare Polymere werden auch als inert bezeichnet, d.h. sie werden im Körper nicht abgebaut und sind damit als permanente Implantate geeignet. Trotzdem können über die Zeit physikalische (Quellung, Versprödung durch Auswaschung von Weichmachern) oder chemische Abbauprozesse (oxidativ, enzymatisch, Hydrolyse) stattfinden. Dies nennt man Alterung. Daneben gibt es noch das so genannte "Kriechen" der Materialien: Damit wird die langsame temperaturabhängige Deformierung dieser unter Belastung bezeichnet. (Berghaus, 1992).

Verschiedene resorbierbare Trägermaterialien, wie Polylactidsäure, Polyglycolsäure oder PGLA (ein Copolymer aus Milchsäure und Hydroxyessigsäure), werden genutzt um auf diesen autologe Knorpeltransplantate zu züchten (Bujia et al., 1995; Perka et al., 2000; Claes et al., 2002). Da jedoch die neu generierte Knorpelmatrix bei weitem nicht über die natürliche Festigkeit verfügt, die diesem Gewebe sonst zugeschrieben wird, mangelt es diesen Transplantaten an langfristiger Formstabilität (Alini et al., 2003). Die Suche nach einem stabilen Gerüstmaterial, welches in gleichem Maße abgebaut wird, wie sich eine stabile Knorpelmatrix aus den aufgebrachtten Zellen entwickelt, besteht bis heute fort. Bisher wurde kein Durchbruch im klinischen Alltag erreicht (Röpke et al., 2006, Vats et al., 2003; Cancedda et al., 2003).

Nachteil dieser Stoffe ist die eben schon erwähnte geringe mechanische Festigkeit, die schlechte Steuerbarkeit der Abbauvorgänge und das Kriechen der Materialien unter mechanischer Beanspruchung.

1.3. Polyethylen als Biomaterial

Medpor®-Implantate sind aus linearem hochverdichtetem Polyethylen gefertigt. Polyethylen kommt bereits seit vielen Jahren in der Chirurgie zur Anwendung. Erste Studien zur Untersuchung der Eigenschaften dieses Materials wurden in den 1970er Jahren durch Klawitter et al. und Spector et al. durchgeführt (Klawitter et al., 1976; Spector et al., 1975). Es wird verwendet, um Schädeldefekte zu reparieren, Gesichtsdeformitäten wiederherzustellen, Ohr und Orbita wieder aufzubauen, wird als sphärische Orbitaprothese eingesetzt und genutzt, um Nasenfunktion und -form zu korrigieren (Romo et al., 1999). Seine vernetzte Struktur ermöglicht das Einwachsen des Gewebes. Die Porosität dieses Materials ist mit einer durchschnittlichen Porengröße $>100 \mu\text{m}$ und einem Porenvolumen im 50%-Bereich groß gehalten. Auf Grund der Materialfestigkeit kann es geschnitten werden, ohne dass der Porenaufbau zusammenbricht.

Tierversuche haben gezeigt, dass poröses Polyethylen (PE)-Material als chirurgisches Implantat das Einwachsen des Gewebes ermöglicht (Klawitter et al., 1976; Spector et al., 1975; Hashem et al., 2001; Iseri et al., 2006; Williams et al., 1997; Schoen et al., 2009). Histologische Analysen von Biopsien menschlicher Implantate zeigten ebenfalls ein Einwachsen des Gewebes. Dabei ist die klinische Signifikanz des Gewebewachstums je nach Anwendung und Anwendungsort des Implantats verschieden (Berghaus, 1992; Nam et al., 2006). Ihr Einsatz ist besonders in der kraniofazialen Rekonstruktion und Augmentation gut geeignet.

Alloplastische Implantate haben den Vorteil, dass eine unlimitierte Menge an Material zur Verfügung steht, sie verringern die Operationszeit und sind leichter zu handhaben. Dabei geben sie zusätzlich die Möglichkeit einer dreidimensionalen Rekonstruktion von Defekten (Naumann et al., 2003). Die PE-Implantate erlauben die Integration/das Einwachsen von umliegenden Geweben in das Implantat und beugen somit der Kapselbildung vor und vermindern das Aufkommen von Fremdkörperreaktionen über eine lange Zeitperiode (Berghaus, 1992). Diese biologische Stabilisierung macht die Fixation mittels Nähten oder Schrauben unnötig. Dabei behält es seine Form, was die Implantation erheblich erleichtert. Das ultradünne poröse Polyethylen-Implantat ist sehr gut biokompatibel und langlebig. Es zeigt den klaren Vorteil von alloplastischen Materialien gegenüber z. B. Knochentransplantaten auf, eine reduzierte Morbidität und weniger unerwünschte Effekte als andere Behandlungsmaßnahmen (Ozturk et al., 2005; Sevin et al., 2000; Cenzi et al., 2005). Trotzdem werden in verschiedenen Studien

immer wieder fibröse Kapselbildung, chronische Entzündung oder Abstoßung der Implantate beschrieben (v. Knoch et al., 2001; Niechajev, 1999; Carboni et al., 2002; Nam et al., 2006; Nizegorodcew et al., 1997; Nunez Sanchez et al., 2001).

1.4. Transplantationsrisiken

Die Transplantation von Geweben, Organen bzw. alloplastischen Materialien birgt immer das Risiko der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen.

Je nach Material und Rahmenbedingungen stellt die Implantation für das Gewebe immer einen mehr oder weniger starken Reiz dar. Dies variiert von einer Gewebereaktion, welche kaum von der normalen Wundheilung zu unterscheiden ist, bis zur Entstehung einer Fremdkörperreaktion mit Bildung einer derben fibrösen Kapsel oder chronischen Entzündungen und Granulombildung (Berghaus, 1992; Rotter et al., 2005). Dabei besteht zusätzlich die Gefahr, dass Zerfallsprodukte der Implantate beim Patienten allergische oder toxische Reaktionen hervorrufen (Raphael et al., 1999).

Die chronische Abstoßung ist eine protrahierte zelluläre Reaktion gegen das Transplantat mit obliterierender Vaskulitis, Intimaproliferation und Fibrose.

Avitale Implantate werden viel häufiger mit Pilzen oder Bakterien besiedelt, als das bei vitalen Transplantaten der Fall ist. Dieser Vorgang kann zum Verlust des Implantates führen (Graham et al., 2001; Juraha, 1992; Pak et al., 1998).

Der Organismus reagiert auf Fremdkörper, wie z.B. nicht oder nur schwer abbaubare Implantate oder Mykobakterien, durch Bildung charakteristischer Knötchen, so genannter Granulome.

Diese zeichnen sich durch eine hohe Dichte von Kollagenfasern, Fremdkörperriesenzellen, Fibroblasten, Plasmazyten und Histiocyten aus. Man unterscheidet Epitheloidzellgranulome, rheumatisch-rheumatoide Granulome und Fremdkörpergranulome. Fremdkörpergranulome bestehen aus zentralen Schaumzellen, ungeordneten Fremdkörperriesenzellen mit intrazellulärem Fremdkörper und einem umgebenden Lymphozytenwall. Sie entstehen als Reaktion auf Fremdkörper, wie z.B. Cholesterinkristalle, Urat, Mukus, exogene Fremdkörper (Implantate), bei der Asbestose, Silikose und als Fadengranulom.

Mehrkernige Langhans-Riesenzellen oder Fremdkörper-Riesenzellen sind Folge der Fusion von Epitheloidzellen. Riesenzellen können einen Durchmesser von 40-50 μm aufweisen und bis zu 50 Kerne besitzen. Riesenzellen werden unter anderem auch bei Vorliegen großer Mengen nicht abbaubaren Materials gebildet. Dabei befinden sie sich in enger Nachbarschaft zu den Fremdkörpern, wobei hier die Kerne scheinbar

ungeordnet im Zytoplasma liegen = Riesenzelle vom Fremdkörpertyp (Ramzi et al., 2001).

Zusammengefasst sind die Nachteile von Implantaten die potentielle Gewebeunverträglichkeit, welche auch nach Jahren noch auftreten kann, das mögliche Wandern im Organismus, die Degradation und Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften und die hohen Entwicklungs- und Folgekosten (A. Berghaus, 1992).

Bei der Verwendung xenogener Transplantate als Alternative zum humanen Transplantat besteht eine im Vergleich zu anderen Materialien deutlich erhöhte Resorptions- und Infektionsrate, sodass sich diese Methode der Transplantation nicht durchsetzen konnte (Brunner, 1993; Rettinger, 1992).

Die autologe Transplantation gilt derzeit als Goldstandard und ist das am häufigsten angewandte Verfahren mit den am ehesten zufriedenstellenden klinischen Ergebnissen (Brunner, 1993).

Nachteile der autologen Transplantate sind die begrenzte Verfügbarkeit, ein erhöhter operativer Aufwand (Kastenbauer, 1983; Rasp et al., 2000; Staudenmaier et al., 2001) sowie des Entstehen einer verminderten Gewebequalität des Transplantates, z.B. durch Verkalkungs- und sonstige degenerative Prozesse (Hammer et al., 1992). Ein weiteres Problem besteht darin, dass nicht in jedem Falle eine exakt defektgerechte Entnahme in Bezug auf Form und Größe möglich ist (Zeilhofer et al., 1997).

Die Lösung dieser Probleme wäre die Vermehrung des patienteneigenen Gewebes bis zur therapeutisch notwendigen Menge. Seit Jahrzehnten wird daran gearbeitet, Ersatzgewebe durch die Kultivierung humaner Zellen außerhalb des menschlichen Organismus herzustellen, um den Mangel an autologen Transplantaten zu beseitigen.

1.4.1. Bisheriger Stand der Forschung

Autogener Knorpel ist noch immer der Goldstandard in der plastisch rekonstruktiven Chirurgie der Nase und des äußeren Ohres (Park, 2000). Der Knorpel wird dabei aus der Rippe, dem Nasenseptum oder der Ohrmuschel entnommen (Nagata, 1994; Rettinger, 1992). Dafür wird in der Regel ein Zweiteingriff benötigt, welcher zusätzliche Risiken, wie Wundinfektionen, postoperative Schmerzen oder unzureichende postoperative kosmetische Ergebnisse, mit sich führen kann (Ohara et al., 1994; Herberhold et al., 1999). Außerdem steht nur eine begrenzte Menge patienteneigenen Knorpels zur Verfügung.

Knorpelgewebe ist avaskulär und besteht aus Chondrozyten, welche in einer extrazellulären Matrix aus Kollagenen, Proteoglykanen und nichtkollagenen Proteinen eingebettet sind. Die fehlende Blutversorgung sowie die geringe Chondrozytenzahl mit insgesamt niedriger mitotischer Aktivität bedingen das geringe Regenerationspotenzial des Knorpels (De Palma et al., 1966).

Da Knorpel nicht vaskularisiert ist, ernährt sich dieser durch Diffusion. Deshalb dürfen mögliche Trägerstoffe keine Diffusionsbarrieren darstellen. Zusätzlich ist eine adäquate räumliche Orientierung der Zellen eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Redifferenzierung von vermehrten Knorpelzellen bei der in-vitro-Herstellung von Knorpelgewebe. Am geeignetesten ist eine dreidimensionale Form und Porosität der Trägerstruktur (Armstrong et al., 1982; Bruder et al., 1998). Bisher werden dafür überwiegend resorbierbare Polymere genutzt.

1997 wurde an der HNO-Klinik der Charité Berlin erstmals ein Patient mit einer in vitro hergestellten Ohrmuschel versorgt. Jedoch blieb dieser bioartefizielle Knorpel nur für drei Wochen formstabil und wurde teilweise resorbiert (Haisch, 2001).

Polymere werden in der Medizin sehr vielseitig als Implantatmaterialien eingesetzt. Das poröse Polyethylen ist in der Kopf-Hals-Chirurgie ein bewährter Kunststoff (Berghaus, 1992; Berghaus, 1985). Das in Pulverform vorliegende ultrahochmolekulare Polyethylen wird durch einen Sinterprozess zu einem festen porösen Material zusammengefügt. Das entstandene Implantat besitzt eine poröse Struktur, umgebendes Gewebe kann in diese Poren einwachsen und somit zu einer festen Verankerung des Materials im Implantatlager führen. Besitzt das poröse Polyethylen eine entsprechende Stärke, ist es elastisch und nicht spröde, wie zum Beispiel Keramiken. Damit bietet es für Chirurgen die Möglichkeit, intraoperativ bearbeitet werden zu können, um das Implantat den Gegebenheiten anzupassen.

Die Basisstruktur von Medpor® ist eine einfache Kohlenstoff-Kette. Die Porengrößen differieren von 100-250 μm , wobei 50% größer als 150 μm sind, da in vorangehenden Studien gezeigt werden konnte, dass Porengrößen über 100 μm das Einwachsen von Gewebe begünstigen (Klawitter et al., 1976; Spector et al., 1975). Frühere Studien konnten ebenso zeigen, dass das Einwachsen von Fibroblasten Kapselbildung vorbeugt und das Implantat stabilisiert wird (Spector et al., 1976; Menderes et al., 2004). Trotzdem werden immer wieder Komplikationen beobachtet. Zu den häufigsten zählen persistierende Schmerzen, Parästhesien, Implantatabstoßung, Infektion und Implantatwanderung. In einer retrospektiven Analyse von 285 Implantaten untersuchten Cenzi et al. verschiedene Einflussgrößen um Fehlerquoten zu illustrieren (Cenzi, et al., 2005). Sie analysierten Alter, Geschlecht, zugrunde liegende Erkrankungen, Ort der Implantation, Art der Implantation, primäre Fixierungsmethode und Outcome der Implantate. Dabei konnte gezeigt werden, dass Implantate in Nase, Maxilla und Ohr ein erhöhtes Risiko an Komplikationen tragen (bis zu 14,8%).

2. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die positiven Eigenschaften von PE (Medpor®) durch Besiedlung mit autologen Chondrozyten verbessert werden können. Ein weiteres Ziel war die Verbesserung der Zell-PE-Kontakte durch eine geeignete Oberflächenmodifizierung (Beschichtung mit Kollagen II, bzw. Sauerstoff-Plasma-Behandlung und anschließende Kopplung von Kollagen II). Nach anschließender Besiedlung mit autologen Chondrozyten und Implantation der so modifizierten Proben in immunkompetente Meerschweinchen wurden die Tiere über einen Zeitraum von einem, sechs und zwölf Monaten beobachtet. Als Kontrolle wurden unbesiedelte oberflächenmodifizierte PE-Proben implantiert. Zur histologischen Beurteilung der Implantate wurden die Proben und die jeweiligen Kontrollen zu den genannten Zeitpunkten entfernt, histologisch aufgearbeitet und mikroskopisch ausgewertet.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Polyethylen-Probenvorbereitung

In dieser Studie wurde Medpor®, ein lineares high-density-Polyethylen mit einer Porengröße von 35-250 μm als nichtresorbierbares prothetisches Ersatzmaterial verwendet. Die Funktionalisierung mittels Sauerstoff-Plasma erfolgte mit Mikrowellen bei 300 W, 30 sec im Vakuum bei 6×10^{-3} mbar. Die Sauerstoffflussrate betrug 50 cm^3/min . Im Anschluss wurde 60 sec mit Sauerstoff gespült. Für den experimentellen Einsatz wurden PE-Proben von 6 mm Größe im Durchmesser ausgestanzt (Röpke et al., 2006).

Die Kollagenbeschichtung der so vorbereiteten Proben erfolgte durch Schütteln der PE bzw. Sauerstoffplasma-PE-Proben in einer Kollagen-II-Lösung (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) unter Zusatz von Cyclohexylcarbodiimid (2 mg) für drei Stunden, entsprechend dem Protokoll von Freshney R. I.: Tierische Zellkulturen. Berlin, New York. Walter de Gruyter, 1990. Im Anschluss wurden die Proben mit PBS gespült und getrocknet.

Vor der Besiedlung mit autologen Zellen wurden die Proben Plasma-sterilisiert. Alle weiteren Manipulationen erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Es kamen drei verschiedene PE- Proben zum Einsatz:

1. unmodifiziertes poröses PE
2. Kollagen-II-beschichtetes poröses PE
3. nach Sauerstoff-Plasma-Behandlung mit Kollagen II beschichtetes poröses PE

3.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden Aufzuchtmeerschweinchen Shoe:DH Dunkin-Hartley aus der Tierzucht Schönwalde GmbH verwendet. Das präoperative Gewicht betrug im Mittel 600 g. Die Tiere wurden prä- und postoperativ unter standardisierten Bedingungen gehalten, die Raumtemperatur lag bei 20° Celsius mit maximaler Abweichung von einem Grad Celsius. Die Tiere wurden zu zweit im Käfig gehalten und hatten eine Zwölf-Stunden-Tag-Nacht-Periodik. Als Nahrung erhielten sie Trockenfutter als Pellets, trockenes Brot und Wasser ad libitum. Es wurden 75 Tiere in drei Gruppen zu jeweils 17, 18 und einmal 19 Tieren (nach Ausschluss der Tiere, bei denen mindestens ein Implantat nicht wieder aufgefunden wurde) untersucht. Dabei wurde bei jedem Tier jeweils ein Defekt ausschließlich mit dem PE-Implantat und der zweite mit einem zuvor mit körpereigenen Knorpelzellen besiedelten PE-Implantat aufgefüllt.

3.3. Operationstechniken

3.3.1. Zellisolierung und Zellkultivierung

Nach dem Wiegen wurden die Tiere mit einer Mischung aus Ketavet (Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Rompun (Bayer, Leverkusen, Deutschland) [Ketavet 100 mg/ml + Rompun 2%-ig (1 ml + 0,15 ml)] intramuskulär in den rechten Oberschenkel anästhesiert und das Eingriffsgebiet rasiert. Zur Hautdesinfektion des Operationsgebietes wurde Cutasept (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) verwendet. Nach steriler Abdeckung des Operationsgebietes wurde der Ohrknorpel des rechten oder linken Ohres des Tieres mit einem Einmalskalpell freipräpariert und soviel Material wie möglich entnommen. Die Wunde wurde mit einer Vicryl-rapid-6.0-Naht verschlossen. Danach wurde das frisch gewonnene Knorpelstück bis zur Weiterverarbeitung in eine sterile GBSS-Lösung mit 1% Antibiotikum (Gemisch aus Penicillin und Streptomycin) eingelegt. Nach anschließender Entfernung anhängenden Muskel-, Fett- und Bindegewebes wurde das Knorpelstück in 1 mm² große Stücke zerteilt. Da es sich um sehr geringe Mengen handelte, erfolgte die weitere Aufarbeitung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Nach Entfernung des GBSS-Überstandes wurden dem Material 0,5-1 ml einer 0,8%-igen Hyaluronidase-Lösung zugegeben. Dieses Gemisch wurde dann für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, erneut 0,5-1 ml der Hyaluronidase-Lösung hinzugegeben und 15 Minuten inkubiert.

Es folgte das zweimalige Waschen mit 0,5-1 ml der Lösung aus GBSS und 1% Penicillin und Streptomycin, danach das viermalige Waschen mit 0,5-1 ml einer 0,25 %-igen Trypsinlösung in GBSS. Anschließend wurde das Gemisch mit 1 ml der 0,25%-igen Trypsinlösung bei 37° Celsius für 30 min. im Schüttelinkubator belassen. Danach wurde die Probe zweimal mit dem Gemisch aus GBSS und Penicillin/Streptomycin gewaschen und mit 0,5-1 ml einer 0,2 %-igen Collagenase in GBSS 5 Minuten bei 37° C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Probe erneut mit frischer Collagenaselösung über Nacht bei 37° Celsius inkubiert.

Nach Filtration durch ein Zellsieb erfolgte dann die Zentrifugation bei 1000 rpm für acht Minuten. Der Überstand wurde wiederum bis auf einen kleinen Rest abgenommen und das verbliebene Pellet mit Medium (DMEM) 20% FCS gemischt und nochmals unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Zur Vermehrung wurden die Zellen bis zur dritten Passage in Monolayer kultiviert und dann auf den vorbereiteten PE- Proben in einer Zelldichte von zwei bis drei Millionen pro Probe ausgesät und weitere 14 Tage in vitro kultiviert.

3.3.2. Implantation

Vor der jeweiligen Implantation wurden die Tiere wie oben beschrieben (s. 2.3.1) anästhesiert, das Operationsgebiet steril abgedeckt und die Narbe der Zellentnahmestelle aufgesucht, um das Implantat so weit wie möglich von der Gewebeentnahmestelle einzubringen. Danach erfolgte die Inzision entlang der Concha und das Einbringen der besiedelten PE-Probe. In das gegenüberliegende Ohr wurde in eine vorher präparierte Tasche zum direkten Vergleich eine entsprechend unbesiedelte PE-Probe gleicher Oberflächenmodifizierung implantiert. Das Operationsgebiet wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Um durch die Gewebsentnahme bedingte Effekte auf die histologische Auswertung auszugleichen, erfolgte die Implantation der besiedelten PE-Proben statistisch verteilt.

3.3.3. Explantation

Nach einem, sechs und zwölf Monaten wurden die Meerschweinchen wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.3.1) narkotisiert und durch einen Schnitt, der beide Arteriae carotis communis durchtrennte, euthanasiert. Die Implantatgebiete wurden freipräpariert und die Implantate aufgesucht. Anschließend erfolgte mittels Zirkumzision die Entnahme des Implantates mit umliegendem Gewebe. Die Fixation der Probe erfolgte in 2%-iger Paraformaldehydlösung (Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland).

3.4. Histologische Aufarbeitung

Fixierung

- Fixierung der Probe in 2%-iger Paraformaldehydlösung bei 4° Celsius für mindestens zwölf Stunden

Einbettung

- Entfernen der Lösung, dann dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer 6%-ig an Saccharose, wieder bei 4° Celsius über Nacht stehen lassen
- PBS-Saccharose-Puffer entfernen
- Mit 4° Celsius kaltem Aceton die Proben so lange entwässern, bis das Aceton klar ist
- Aceton entfernen und Technovitlösung, bestehend aus Hydroxyethylmethacrylat (100 ml Lösung A) und Benzoylperoxid (0,6 g Härter I) entsprechend dem Herstellerprotokoll auf die Proben geben
- Bei 4° C über Nacht infiltrieren lassen
- Am folgenden Tag die Infiltrationslösung (15 ml) mit Tetramethylanilin (0,5 ml Härter II) versetzen

- Gewebeprobe in vorgekühlte (Tiefkühler) mit Silikonspray ausgesprühte Teflonform einlegen und mit der Infiltrationslösung bedecken, anschließend eine Abdeckfolie auflegen
- Gewebeprobe einlegen und die Form randvoll mit der Infiltrationslösung bedecken, anschließend eine Abdeckfolie auflegen

Nach Aushärtung der Proben (bei 4°C über Nacht) werden sie aus der Form gelöst.

Lösungen:

Paraformaldehyd:	2%
PBS-Puffer:	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,16 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml, aqua dest. (pH 7,4)
Technovitlösung A:	100 ml Technovit 8100 mit 1 Beutel (0,6 g Härter I)
Infiltrationslösung:	7,5 ml Lösung A mit 0,25 ml Härter II

Schneiden

- Block einspannen in HS-Rotationsmikrotom (Jung Supercut 2065)
- Mit speziellen Hartschnittmessern werden 4-µm-Schnitte hergestellt
- Abnahme des Schnittes mit Pinsel und spitzer Pinzette
- Aufziehen des Schnittes auf Objektträger

3.5. Färbungen

Zur besseren Beurteilung der Präparate wurden jeweils drei Objektträger gefärbt. Es wurde nach Giemsa, nach Masson-Goldner und Hämatoxylin-Eosin nach Ehrlich gefärbt. Zu jeder der verschiedenen Färbemethoden wurde im Folgenden eine Tabelle (siehe Anhang, Tabelle 4, 5, 6) erstellt, welche einer kurzen Einleitung über die Färbemethode folgt.

3.5.1. Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung dient dazu, verschiedene Zelltypen voneinander zu unterscheiden. Sie wurde nach der Romanowski-Färbung modifiziert. Benannt ist sie nach dem Hamburger Chemiker Gustav Giemsa. Die Giemsa-Lösung (Morphisto-Evolutionsforschung & Anwendung GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland) besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur-A-Eosinat, Azur-B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblau-Chlorid in Methylalkohol mit Glycerin als Stabilisator. Daher auch die Bezeichnung als Azur-Eosin-Methylenblaulösung. Die Intensität der Färbung ist dabei abhängig von der genauen Zusammensetzung der Giemsa-Lösung. Zellkerne

erscheinen in gefärbten Ausstrichen durch Komplexbildung der Farbstoffe mit DNA purpurrot. Das Zytoplasma erscheint dabei meist bläulich. Deutliche Unterschiede im Färberesultat sind unter anderem durch den pH-Wert der Lösung und der Pufferlösung, die Puffersubstanzen, die Färbezeit sowie die Art der Fixierung bedingt.

3.5.2. Masson-Goldner-Färbung

Diese Färbemethode (Morphisto-Evolutionsforschung & Anwendung GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland) ist eine mikroskopische Färbemethode bei welcher die Dispersität (Farbstoffmolekülgröße) den Ausschlag für den Grad der Färbung gibt. Nach der Färbung mit Eisenhämatoxilin nach Weigert werden im Schnitt drei oder mehr disperse Farbstoffe simultan und sukzedan angewendet.

3.5.3. Hämatoxilin-Eosin-(HE)-Färbung nach Ehrlich

Die HE-Färbung (Morphisto-Evolutionsforschung & Anwendung GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland) ist eine Sukzedanfärbung. Dies bedeutet, es wird nacheinander gefärbt. Die Färbung basiert auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Adsorption. Das Färben mit Hämatoxilin (Hämalaun) erfolgt progressiv und wird bei Erreichen des gewünschten Färbegrades abgebrochen. Hämalaun ist positiv geladen, bindet sich an die sauren Bestandteile der DNA und bewirkt eine Kernfärbung. Eosin wird regressiv gefärbt, d. h. es wird erst überfärbt und anschließend differenziert. Es ist negativ geladen, bindet sich an positiv geladene Bestandteile des Gewebes, wie z. B. Eiweiße, und bewirkt damit eine Plasmafärbung.

3.6. Flächenbestimmung

Die histologischen Präparate wurden mikroskopisch mit einem Zeiss-Axiophot-Mikroskop dargestellt und durch systematisches Abfotografieren mit einer Digitalkamera (PixeLINK 1394 Camera) digitalisiert und abgespeichert. Dabei wurden Objektive mit einer 5x und einer 10x Vergrößerung verwendet. Durch die für die Auswertung nötige hohe Auflösung der Kamera wurde jedes Präparat in mehrere Teile gesplittet, so dass sich das Gesamtbild aus bis zu 20 Teilbildern zusammensetzt. Im Anschluss daran wurden die neu entstandenen Knorpelhöfe sowie die Fremdkörperriesenzellen mit dem Programm Analysis 3.0 (Soft Imagine Systems) gezählt und ausgemessen. Die einzelnen Teilflächen wurden summiert und tabellarisch als Ganzes dargestellt. Zusätzlich wurden die einzelnen Schnitte komplett ausgemessen, um zu prüfen und zu gewährleisten, dass ähnliche Flächengrößen betrachtet wurden. Als Vergleichsgrößen wurden die Mittelwerte der Knorpelneubildung pro mm^2 Implantat bzw. Anzahl und Fläche der Fremdkörperriesenzellen pro mm^2 Implantat berechnet.

Als Kontrolle der vorliegenden Auswertung wurden die Präparate von vier weiteren unabhängigen Personen mikroskopisch begutachtet und mittels eines dafür aufgestellten Scores hinsichtlich Anzahl der Fremdkörperriesenzellen und der neu gebildeten Knorpelinseln beurteilt.

Dabei bedeutete der Score für die Immunreaktion :

0 = keine Immunreaktion

1 = geringe Immunreaktion

2 = eine deutliche Immunreaktion

3 = eine starke Immunreaktion.

Das Gleiche galt für die Knorpelentwicklung:

0 = kein Knorpelwachstum

1 = einzelne neue Knorpelflächen

2 = deutliche Knorpelentwicklung

3 = ausgedehntes, gutes Knorpelwachstum.

Die Einzeldaten sind in Tabelle 6 präsentiert (s. Anhang).

3.7. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS 8.0. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Zur statistischen Beschreibung der erhobenen Daten wurden der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes, der Median, der Minimal- und Maximalwert sowie das Konfidenzintervall herangezogen. Zur Untersuchung der Signifikanz wurden die Daten mit einem t-Test bei gepaarten Stichproben analysiert. Zusätzlich wurden ANOVA und Post-Hoc-Test (LSD, Tukey HSD) verwendet. Als signifikant wurde das α -Niveau mit 5% ($p < 0,05$) festgelegt.

ERGEBNISSE

4. Ergebnisse

In dieser Studie wurden insgesamt 75 Tiere implantiert. Von den in der Summe 75 behandelten Tieren konnten nur 54 ausgewertet werden.

In die Auswertung einbezogen wurden nur die Tiere, bei denen man nach Euthanasierung der Tiere beide Proben, d.h. die unbesiedelte und die mit Knorpelzellen vorbesiedelte, wieder auffinden konnte.

Bei insgesamt 21 Tieren wurde mindestens ein Präparat nicht aufgefunden, was zum automatischen Ausschluss aus der Endauswertung führte.

Insgesamt wiesen die vorher nicht mit kultivierten Knorpelzellen besiedelten Präparate die größte Abstoßungsrate auf (20 Proben). Lediglich ein vorher mit Knorpelzellen besiedeltes Präparat war nicht wieder auffindbar.

Die Abstoßungsrate aller Präparate (vorbesiedelt und unbesiedelt) betrug insgesamt 13,6%. Dabei standen 13,0% Proben ohne Vorbesiedelung mit autologen Zellen, 0,65% mit autologen Zellen vorbesiedelten PE-Proben gegenüber.

Die meisten Abstoßungen wurden in der Gruppe der unmodifizierten Proben gefunden, gefolgt von der Gruppe Proben, an die nach Sauerstoff-Plasma Behandlung kovalent Kollagen II gebunden wurde.

Die höchste Abstoßungsrate wurde in der Gruppe der Ein-Monats-Tiere gefunden. Da keine makroskopische Entzündungsreaktion zu beobachten war, wurde der Verlust dieser Implantate erst am Ende der Untersuchungsperiode entdeckt.

Tabelle 3 Übersicht über insgesamt behandelte und zur Auswertung herangezogene Tiere

Explantationszeit (Monat)	1			6			12		
Gruppe	PE	PE-coll	PE-O ₂ -coll	PE	PE-coll	PE-O ₂ -coll	PE	PE-coll	PE-O ₂ -coll
Gesamtzahl der Tiere pro Gruppe	10	8	10	9	7	9	7	7	8
Ausgewertete Tiere	5	7	6	6	6	7	6	4	7
Abgestoßene Implantate ohne Zellbesiedlung	5	1	4	3	1	1	1	3	1
Abgestoßene Implantate mit Zellbesiedlung						1			

Die Ausmessung der in den einzelnen Schnitten ausgewerteten Flächen als Ganzes und deren Aufsummierung ergab, dass im Flächenvergleich der vorbesiedelten Präparate mit der Kontrollgruppe ähnliche große Areale ausgewertet wurden (Abb. 1).

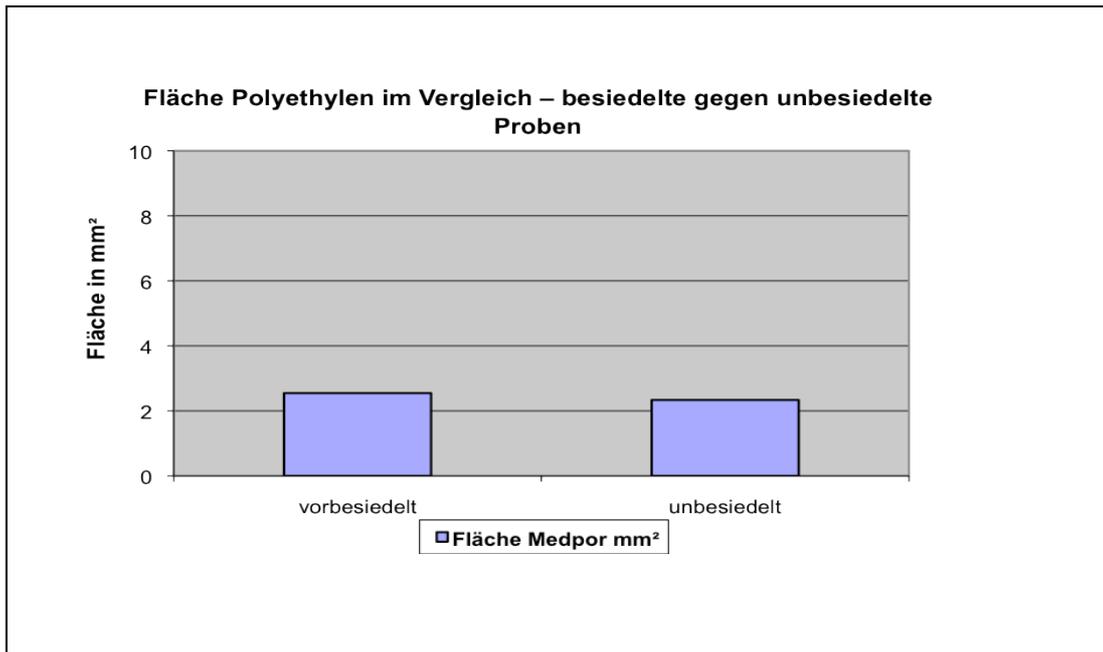


Abbildung 1: Vergleich der ausgewerteten Flächen

4.1. Mikroskopische Ergebnisse

In der Gruppe der Ein-Monats-Tiere waren rein mikroskopisch nur geringe Unterschiede zwischen den vorher besiedelten und den unbesiedelten PE-Implantaten zu erkennen. Die vorher mit körpereigenen Knorpelzellen besiedelten Implantate schienen eine geringere Abwehrreaktion durch Fremdkörperriesenzellen hervorzurufen, als die nicht besiedelten. Ein neues Knorpelwachstum war nur bei wenigen Proben (vorher besiedelte Medpor®-Proben) in Ansätzen beobachtbar.

Abbildung 2 zeigt die zusammengefügte Übersichtsaufnahmen der histologisch aufgearbeiteten Präparate.

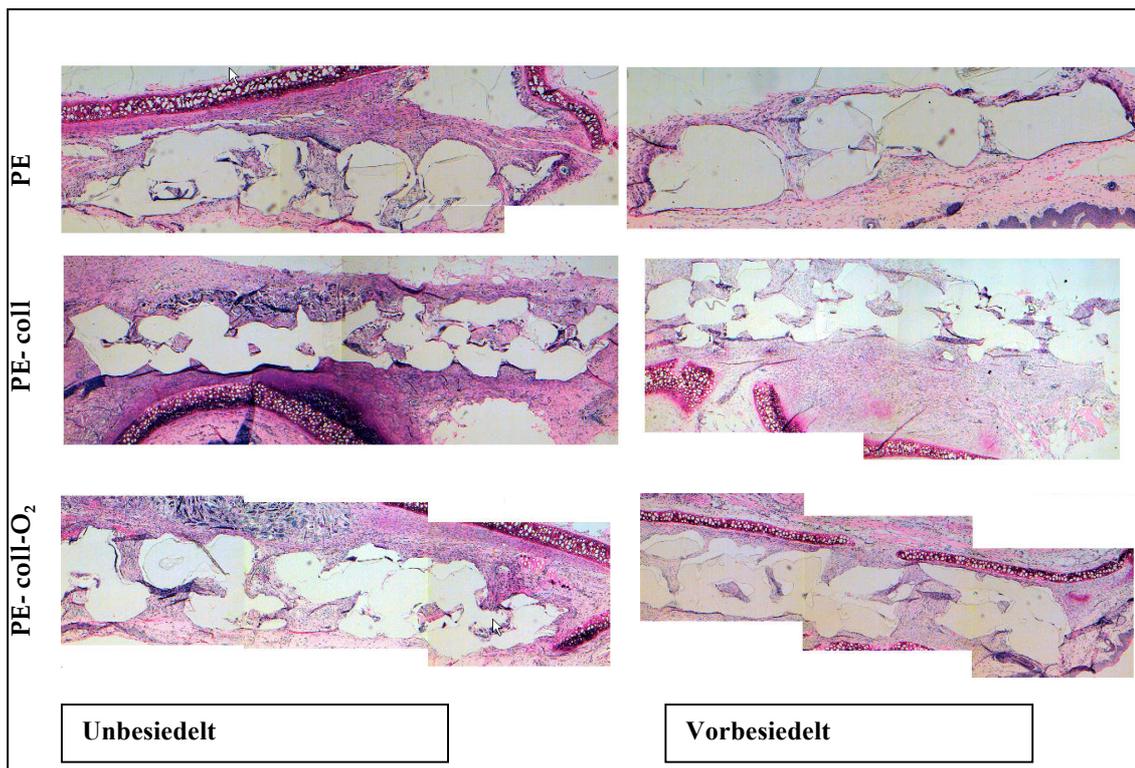


Abbildung 2: Übersichtsaufnahme der Präparate nach einem Monat in vivo. (Bilder aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt) **PE** – Keine Oberflächenmodifikation, **PE-coll** – Kollagen-II-beschichtet, **PE-coll-O₂** – Sauerstoff-Plasma-behandelt und Kollagen II gekoppelt.

Die Auszählung erfolgte an den in Abbildung 3 exemplarisch dargestellten Einzelbildern.

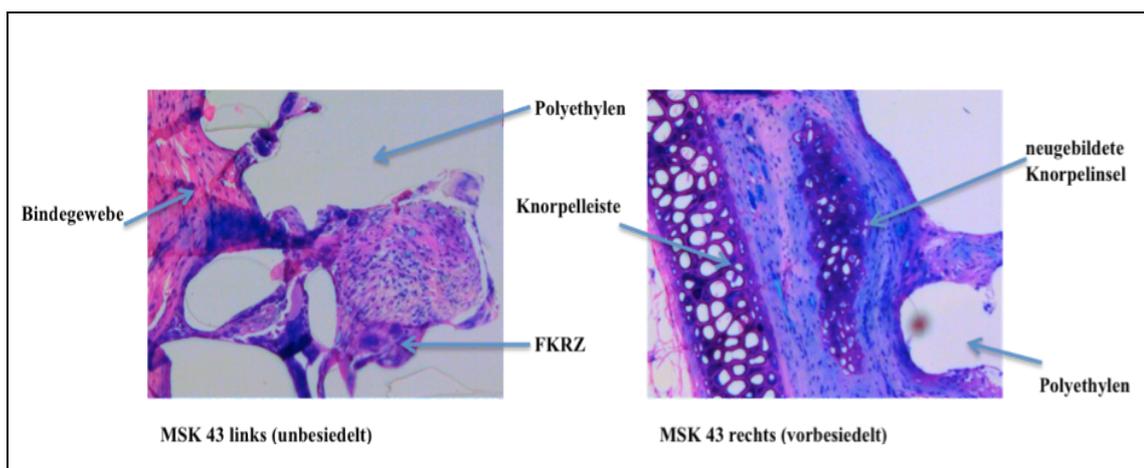


Abbildung 3: Detaillierte Auswertung der histologischen Präparate am Beispiel von MSK 43 rechts und links.

Die Fremdkörperriesenzellen und die neu gebildeten Knorpelinseln wurden zahlen- bzw. flächenmäßig erfasst. Nach einem Monat waren mikroskopisch keine Effekte bezüglich der unterschiedlichen Vorbehandlung der PE-Implantate (unmodifiziert,

ERGEBNISSE

Kollagen-II-beschichtet, Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt) nachzuweisen.

Nach sechs Monaten (Abb. 4) zeigten sich rein mikroskopisch deutliche Unterschiede zwischen den vorher besiedelten und den unbesiedelten PE- Implantaten. Die porösen Zwischenräume der Implantate waren wie bei den Ein-Monats-Tieren gut von Bindegewebe durchwachsen, zeigten aber nun sehr deutlich zahlreiche neue Knorpelhöfe. Bei den vorher nicht besiedelten Proben war dagegen kein Knorpelwachstum zu verzeichnen. Das umliegende Gewebe war ebenfalls gut in die Probe eingewachsen, allerdings schienen sich dort auch mehr Fremdkörperriesenzellen zur Abwehr des körperfremden Materials angesiedelt zu haben. Auch hier war rein mikroskopisch kein direkter Unterschied zwischen den jeweiligen Vorbehandlungen der PE-Proben zu erkennen.

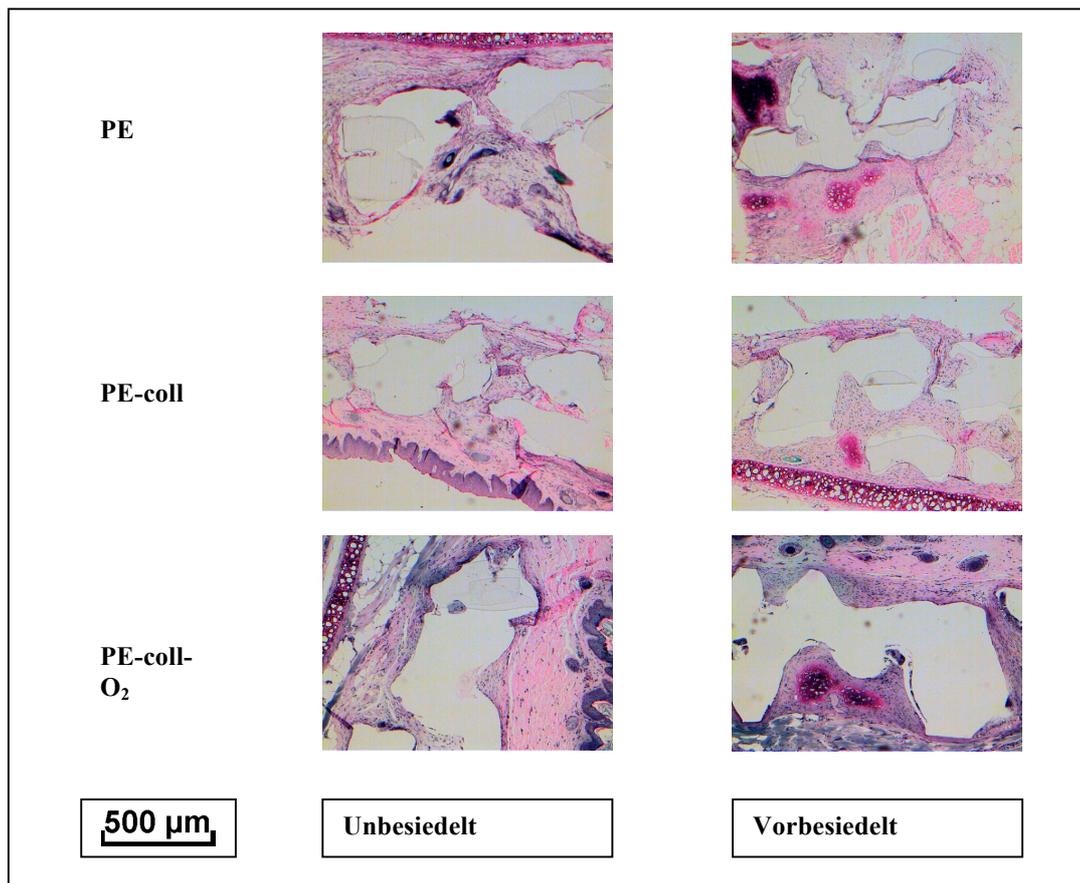


Abbildung 4: Sechs-Monats-Tiere im Vergleich bei unterschiedlicher Oberflächenmodifikation

PE – Keine Oberflächenmodifikation, PE-coll – Kollagen-II-beschichtet, PE-coll-O₂ – Sauerstoff-Plasma-behandelt und Kollagen-II-gekoppelt.

Nach einem Jahr zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 5). Die vorher besiedelten Proben

zeigten weiterhin ein gutes Knorpelwachstum und eine gute Integration ins umliegende Gewebe ohne Zeichen der Kapselbildung. Die nicht besiedelten Proben waren ebenfalls gut integriert und zeigten inzwischen eine anscheinend geringere Fremdkörperreaktion, als in den anderen beiden Gruppen. Ein Unterschied zwischen den Behandlungen der PE-Proben war mikroskopisch wiederum nicht zu erkennen.

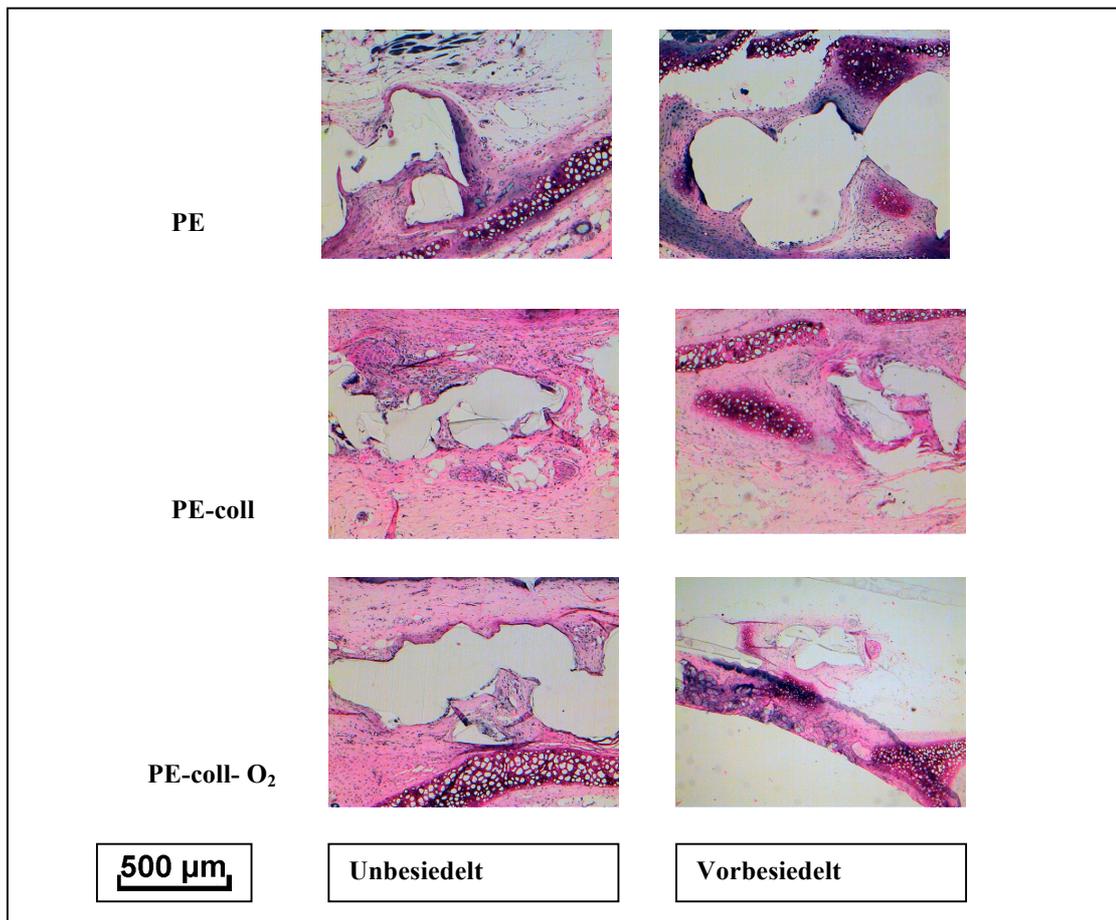


Abbildung 5: Zwölf-Monats-Tiere im Vergleich bei unterschiedlicher Oberflächenmodifikation

PE – keine Modifikation, **PE-coll** – Kollagen-II-beschichtet, **PE-coll- O₂** – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

In den folgenden Abbildungen sind die Anzahl der Fremdkörperriesenzellen bezogen auf die Implantat-(PE)-Fläche der histologischen Präparate (Abbildung 6) oder die Fläche der Fremdkörperriesenzellen bezogen auf die Implantat-(PE)-Fläche der histologischen Präparate (Abbildung 7) graphisch dargestellt.

In beiden Abbildungen wird deutlich, dass unabhängig vom Auswertemodus die Kollagen-beschichteten vorbesiedelten Proben nach einem Jahr in vivo die geringste Fremdkörperreaktion zeigen.

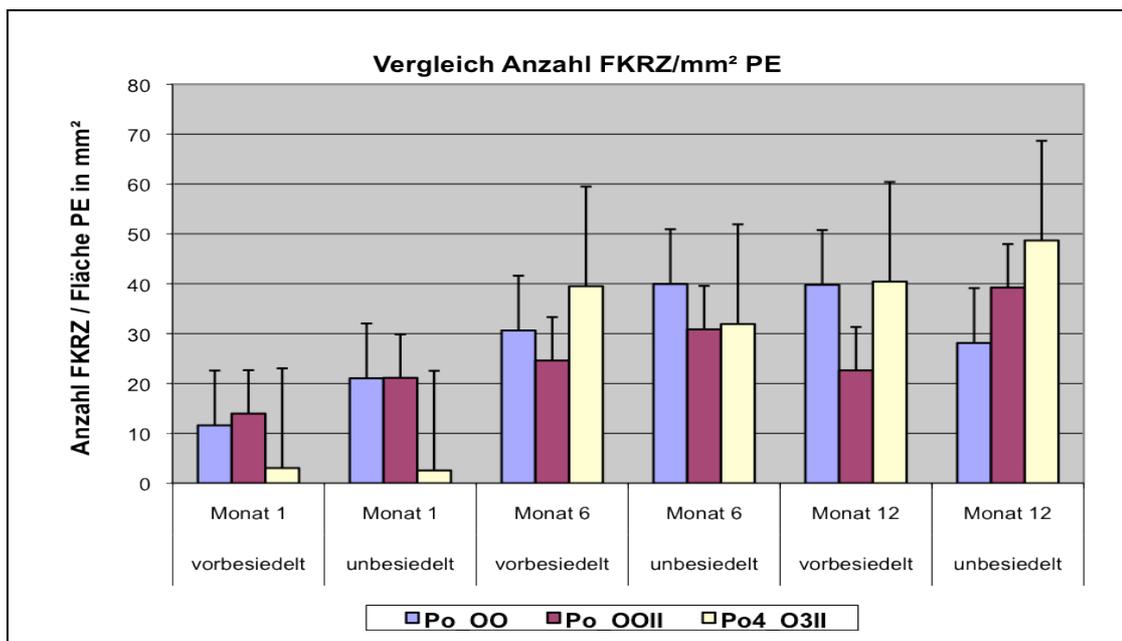


Abbildung 6: Vergleich Anzahl Fremdkörperriesenzelle/ Fläche PE
 Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

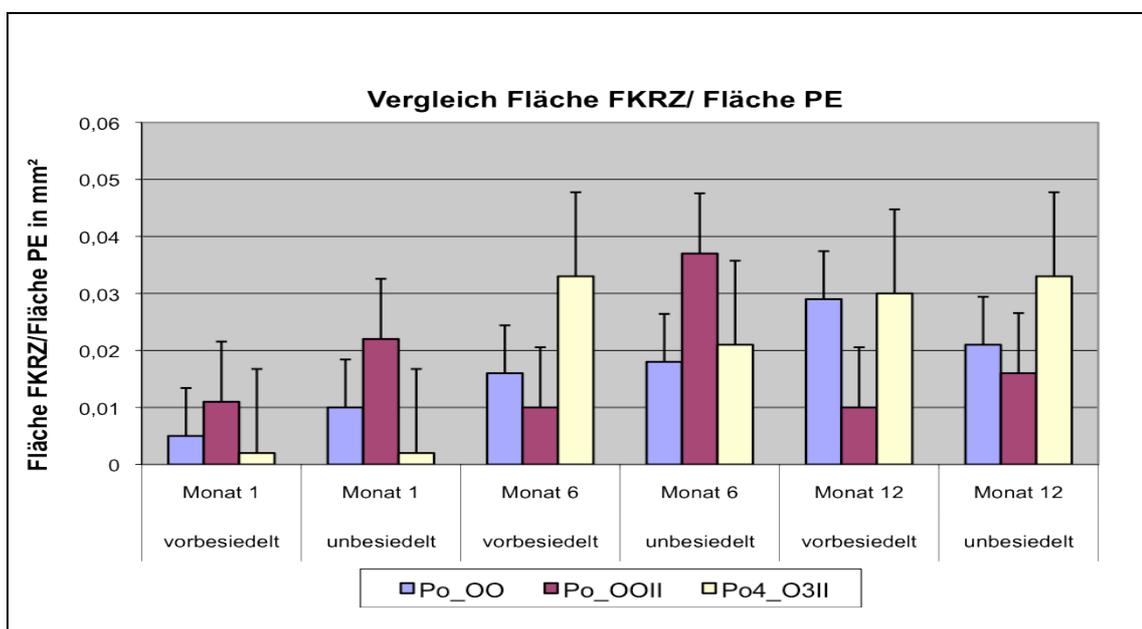


Abbildung 7: Vergleich Fremdkörperriesenzellen (Fläche) über die Zeit und verschiedene Oberflächenmodifikationen
 Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

Betrachtet man in gleicher Weise die Knorpelneubildung (Abbildung 8 und 9), so ist im Fall der Vorbesiedelung mit autologen Chondrozyten ein positiver Effekt auf die Knorpelneubildung nachzuweisen.

Bis auf die Gruppe – unmodifiziert, ein Jahr – wird an jedem Beobachtungszeitpunkt in den Präparaten der vorbesiedelten Proben mehr neu gebildeter Knorpel gefunden, unabhängig von der zahlen- oder flächenmäßigen Erfassung bezogen auf die Implantatfläche.

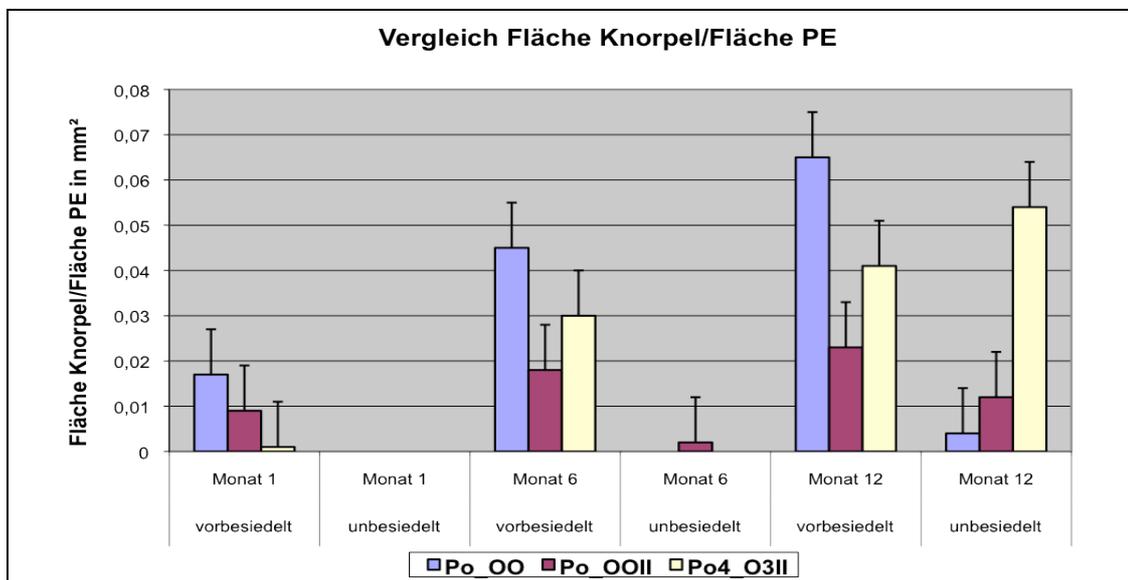


Abbildung 8: Vergleich Knorpelneubildung (Fläche) über die Zeit und Oberflächenmodifikationen

Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

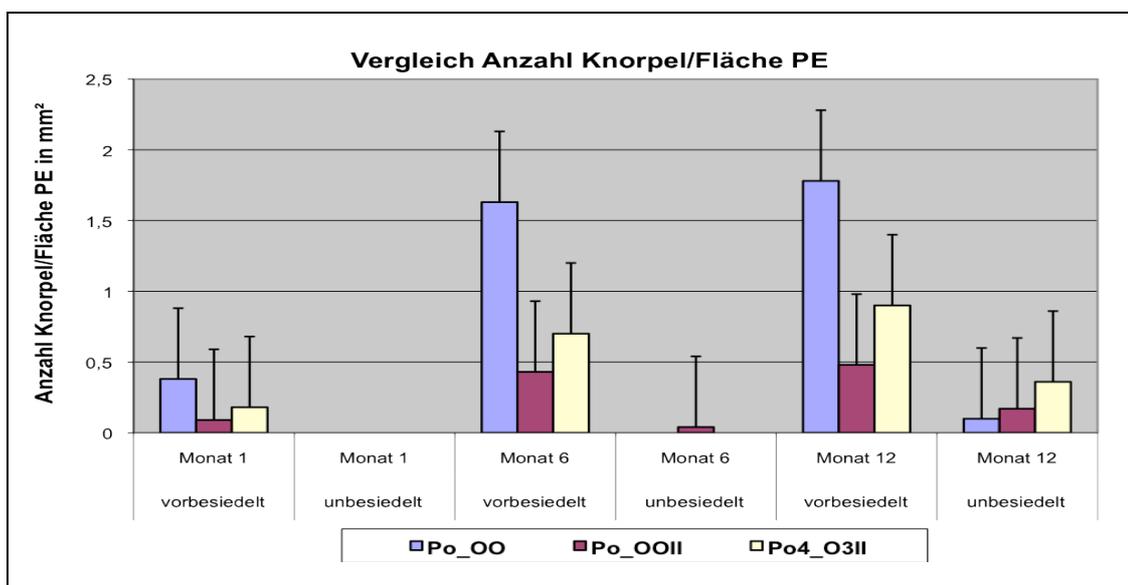


Abbildung 9: Vergleich Knorpelneubildung (Anzahl) über die Zeit und Oberflächenmodifikationen

Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

Andererseits zeigt die graphische Auswertung, dass die Besiedlung unmodifizierten PE einen Vorteil hinsichtlich Einwuchs und Knorpelneubildung gegenüber den anderen Modifikationsgruppen (Kollagen II, Sauerstoff-Plasma + Kollagen II) zu haben scheint (Abb. 10-12).

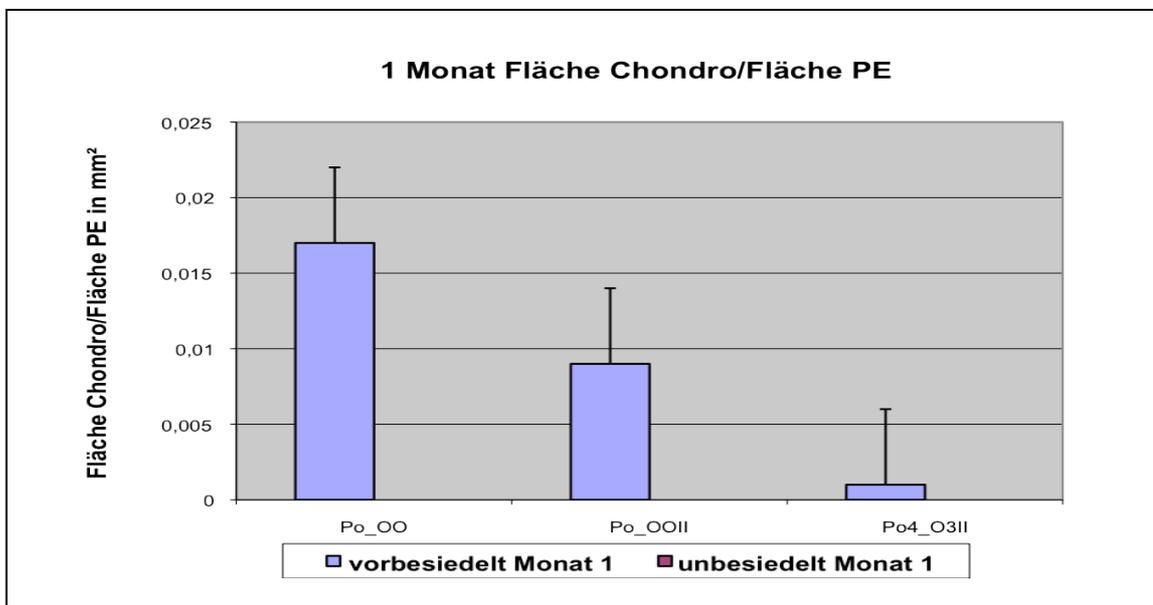


Abbildung 10: Vergleich Knorpelwachstum Ein-Monats-Tiere bei unterschiedlicher Oberflächenmodifikation
 Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

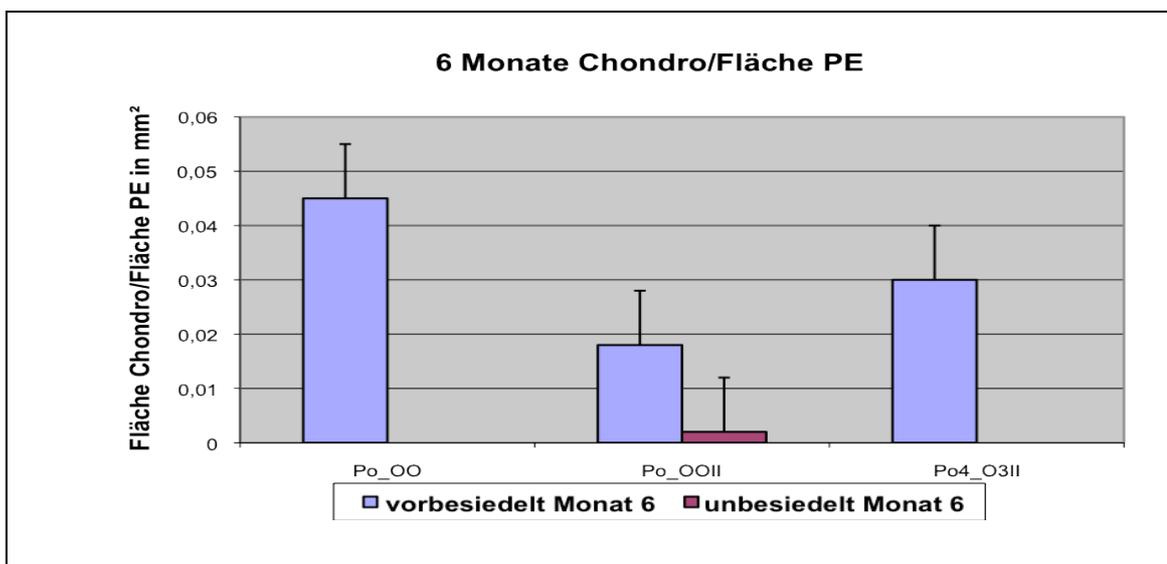


Abbildung 11: Vergleich Knorpelwachstum Sechs-Monats-Tiere bei unterschiedlicher Oberflächenmodifikation
 Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

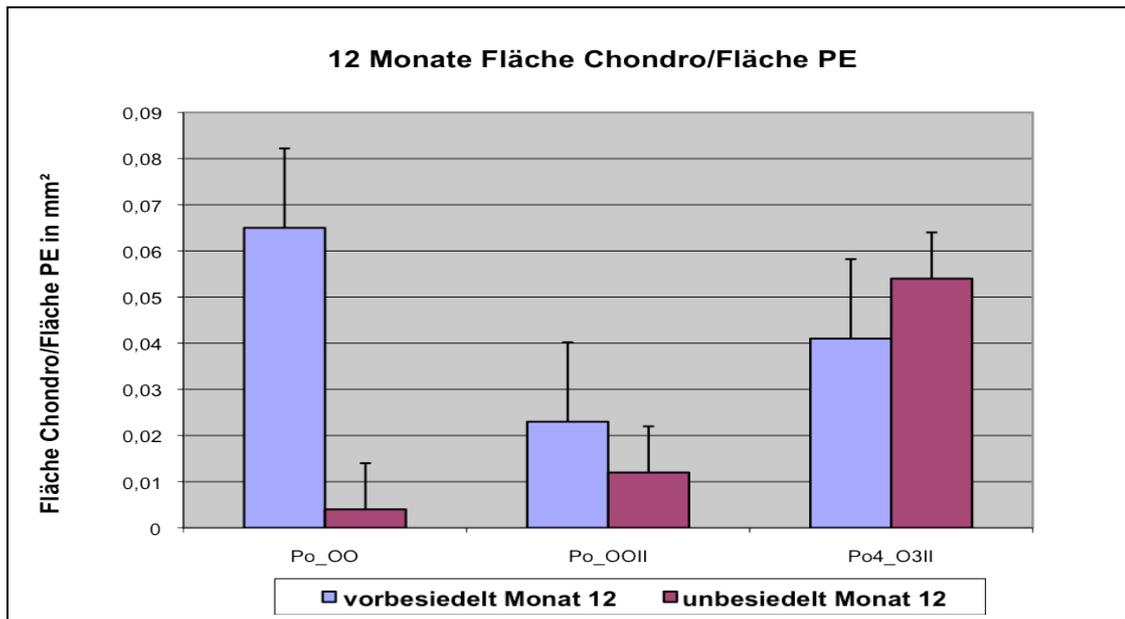


Abbildung 12: Vergleich Knorpelwachstum Zwölf-Monats-Tiere bei unterschiedlicher Oberflächenmodifikation

Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II –Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

Zu allen Beobachtungszeitpunkten war die Fremdkörperreaktion bei den vorbesiedelten Proben insgesamt geringer. Über den gesamten Beobachtungszeitraum ist bei allen Implantaten ein Anstieg der Fremdkörperreaktion zu beobachten.

Um das noch einmal zu verdeutlichen, ist in den Abbildungen 13-15 die Fremdkörperreaktion noch einmal zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten in Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation dargestellt.

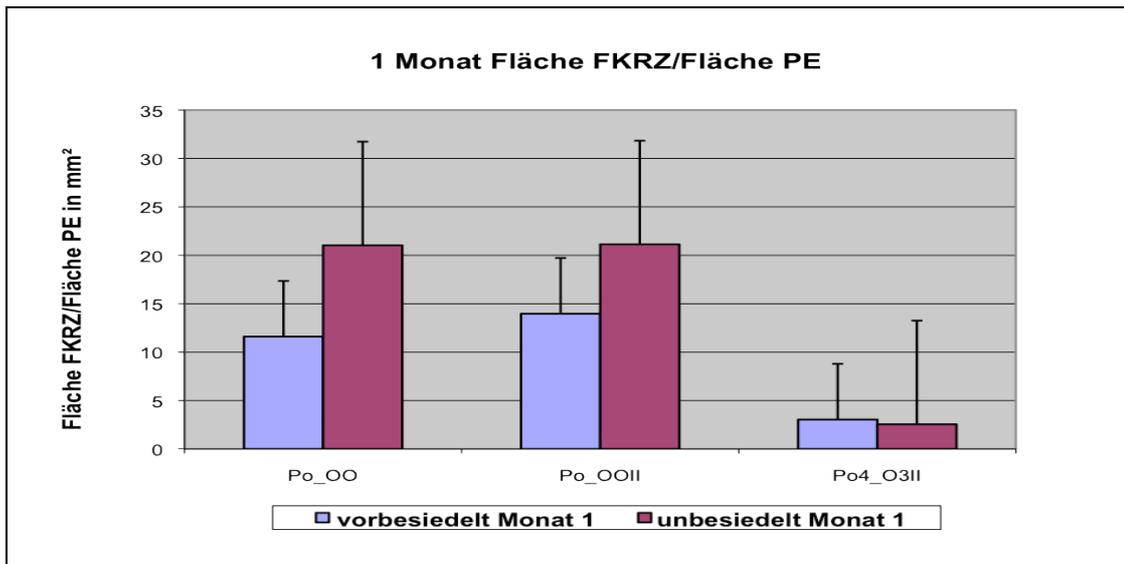


Abbildung 13: Fläche der Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) nach einem Monat bei unterschiedlicher Vorbehandlung bezogen auf 1 mm² Implantatfläche
 Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

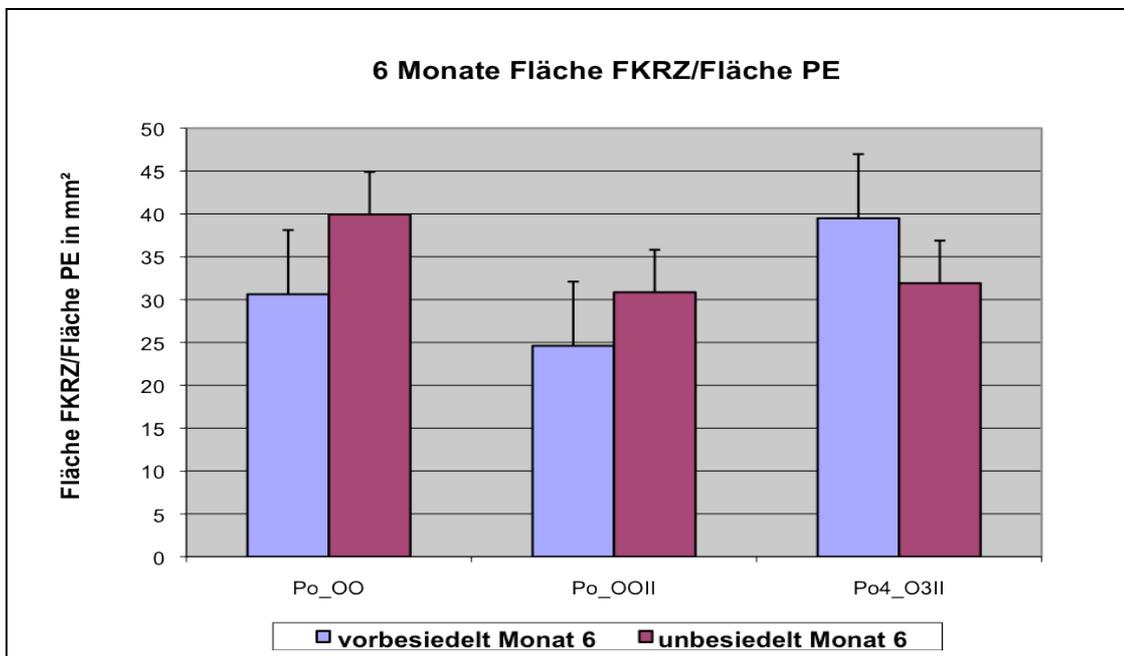


Abbildung 14: Fläche der Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) nach sechs Monaten bei unterschiedlicher Vorbehandlung
 Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

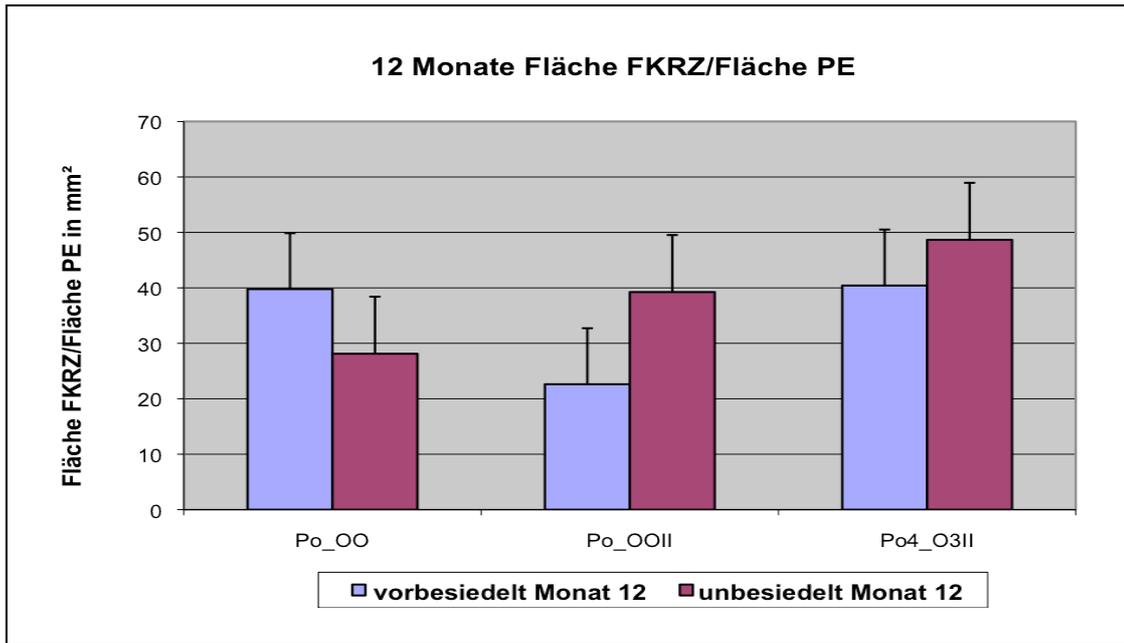


Abbildung 15: Fläche der Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) nach zwölf Monaten bei unterschiedlicher Vorbehandlung

Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

4.2. Statistische Ergebnisse

4.2.1. Anzahl und Fläche der Fremdkörperriesenzellen, t-Test (s. Anhang, Tab. 10,11)

Nach einem Monat konnte hinsichtlich der Anzahl von Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) bezogen auf 1 mm² Implantatfläche ein tendenziell signifikanter Unterschied zwischen den vorher besiedelten und den unbesiedelten PE-Proben festgestellt werden. Es waren mehr FKRZ bei den unbesiedelten Proben auszumachen. Das α -Niveau von 5% ($p < 0,05$) wurde mit $p = 0,090$ jedoch nicht erreicht.

Die Auswertung der FKRZ über ihre Fläche pro mm² Implantat führte zu einem Anstieg des p-Wertes. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Auch nach sechs Monaten konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl von FKRZ bei unbesiedelten und vorbesiedelten Proben gesehen werden. Das heißt, die vorbesiedelten Proben wiesen annähernd gleich viele FKRZ auf als die unbesiedelten und damit eine ähnlich starke Abwehrreaktion. Das α -Niveau von 5% ($p < 0,05$) wurde mit $p = 0,243$ nicht erreicht. Gleiches gilt für die Auswertung über die Fläche der FKRZ. Das α -Niveau von 5% ($p < 0,05$) wurde mit $p = 0,293$ nicht erreicht.

Nach zwölf Monaten waren sowohl ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl als auch der Fläche der Fremdkörperriesenzellen erkennbar. Die vorbesiedelten PE-Proben wiesen eine deutlich geringere Anzahl an Fremdkörperriesenzellen aus im Vergleich mit den unbesiedelten Proben. Das α -Niveau von 5% ($p < 0,05$) wurde mit $p = 0,013$ erreicht. Für die ausgewerteten Flächen wurde das Signifikanzniveau von 5% ($p < 0,05$) wurde mit $p = 0,058$ knapp verfehlt.

4.2.2. Vergleich der Oberflächenmodifikation, Post-Hoc-Tests, LSD

Beim Vergleich der Oberflächenmodifikationen konnte nach einem Monat kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Oberflächenbehandlungen (unmodifiziert, mit Kollagen II beschichtet, mit Sauerstoff-Plasma-behandelt und an Kollagen II gekoppelt) festgestellt werden (Tabelle 12). Das Gleiche gilt für sechs Monate und zwölf Monate. Auch hier konnte das α -Niveau von 5% ($p < 0,05$) nicht erreicht werden (Tabelle 13 und 14).

4.2.3. Fremdkörperriesenzellen und modifizierte PE-Implantate, ANOVA

Die Analyse der Varianzen (ANOVA) mit den Faktoren der Zellbesiedlung (unbesiedelt und besiedelt) sowie Oberflächenmodifikation (unmodifiziert, mit Kollagen II beschichtet, mit Sauerstoff-Plasma-behandelt und an Kollagen II

gekoppelt), zeigte einen Trend dass der Haupteffekt in der Vorbesiedlung der Implantate mit autologen Knorpelzellen liegt ($F = 2,922$, $p < 0,05$, Tabelle 15). In den vorbesiedelten Proben konnte eine geringere Anzahl an Fremdkörperriesenzellen nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Flächen an Fremdkörperriesenzellen konnte, unabhängig vom Beobachtungszeitraum, kein so deutlicher Unterschied herausgearbeitet werden. Hier zeigte sich über den Zeitraum von insgesamt zwölf Monaten ein beachtliches Anwachsen der Flächen an Fremdkörperriesenzellen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen vorbesiedelten und unbesiedelten Präparaten nachgewiesen werden ($F = 0,421$; $p = 0,518$; Tabelle 16).

Im Vergleich der verschiedenen Oberflächenmodifikationen zueinander, unter Berücksichtigung von Zellbesiedlung (unbesiedelt und besiedelt) und Beobachtungszeitraum (ein, sechs oder zwölf Monate), konnte der Trend beobachtet werden, dass das Aufbringen von Kollagen II einen Vorteil mit sich bringt, jedoch konnte diese Beobachtung nicht statistisch verifiziert werden. Das Signifikanzniveau von 5% ($p < 0,05$) wurde mit $p = 0,995$ nicht erreicht (Tabelle 17). Auch ohne Berücksichtigung der Evaluationszeiträume konnte hier kein signifikanter Unterschied erzielt werden. Das Signifikanzniveau von 5% ($p < 0,05$) wurde mit $p = 0,764$ nicht erreicht (Tabelle 18). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich beim Vergleich der Flächen an Fremdkörperriesenzellen unter oben genannten Gesichtspunkten. Auch hier gab es einen Trend, welcher einen Vorteil in der Beschichtung der Oberflächen der Proben mit Kollagen II deutlich zu machen schien. Doch auch hier konnte das Signifikanzniveau von 5 % ($p < 0,05$) mit $p = 0,884$ nicht erreicht werden (Tabelle 19).

Die auf das Scoring der Fremdkörperreaktion basierende Auswertung zeigte ein insgesamt homogeneres Ergebnis. Die Besiedlung der PE-Proben mit autologen Knorpelzellen vor Implantation erwies sich als vorteilhaft. Die Analyse der Varianzen (ANOVA) erreichte hier das Signifikanzniveau von 5 % ($p < 0,05$) mit $F = 5,57$, $p = 0,02$ (Tabelle 20). Dagegen wurde nur ein geringer Effekt durch die verschiedenen Modifikationen der Oberfläche der PE-Proben beobachtet, welcher sich als nicht signifikant erwies (Tabelle 21).

4.2.4. Knorpelentwicklung, ANOVA

Als zweiter Parameter wurden die sich neu entwickelnden Knorpelareale begutachtet. Die Ergebnisse der Ausmessung zeigten mehr neue Knorpelinseln in den vorbesiedelten Proben als in den unbesiedelten Gegenproben. Im Kontrast zur Immunreaktion wurde die beste Knorpelregeneration in den Proben mit unmodifizierten Oberflächen gefunden.

Die Kontrollgruppe zeigte das beste Knorpelwachstum in den Plasma-behandelten, mit Kollagen II beschichteten Proben.

Die Three-way-ANOVA der Knorpelfläche mit den Faktoren Zellbesiedlung (unbesiedelt und vorbesiedelt), Oberflächenmodifikation (unmodifiziert, mit Kollagen II beschichtet, mit Sauerstoff-Plasma-behandelt und Kollagen II gekoppelt), und Evaluationszeit (ein, sechs und zwölf Monate), demonstrierte einen Haupteffekt durch die Zellbesiedlung ($F = 6,90$, $p = 0,010$, Tabelle 22). Mittels Post-hoc-Vergleich (Tukey HSD) konnte bei den vorbesiedelten PE-Proben eine größere Fläche an sich neu entwickelndem Knorpel nachgewiesen werden, als bei den unbesiedelten Kontrollen. Einen weiteren Hauptfaktor stellte die Evaluationszeit dar ($F(2,88) = 3,46$, $p = 0,036$, Tabelle 23). Die Untersuchung der Proben zwölf Monate nach Implantation konnte eine größere Fläche an Knorpelarealen nachweisen als einen Monat nach Implantation. Andere signifikante Einflussfaktoren auf das Knorpelwachstum konnten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 24).

Um auch diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine zweite Auswertung per Scoring vorgenommen. Basierend auf dem Score-Level konnte eine moderate Knorpelentwicklung auf den vorbesiedelten Proben gesehen werden.

Die Three-way-ANOVA des Knorpelscores mit den Faktoren Zellbesiedlung (unbesiedelt und vorbesiedelt), Oberflächenmodifikation (unmodifiziert, mit Kollagen II beschichtet, mit Sauerstoff-Plasma-behandelt und Kollagen II gekoppelt), und Evaluationszeit (ein, sechs und zwölf Monate), verdeutlichte einen Haupteffekt durch Vorbesiedlung ($F = 16,36$, $p < 0,001$, Tabelle 25) und einen Zusammenhang zwischen Vorbesiedlung und Evaluationszeit ($F = 3,247$, $p = 0,043$, Tabelle 26).

Andere signifikante Einflussfaktoren auf das Knorpelwachstum konnten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 27, 28, 29).

5. Diskussion

Aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit von Knorpelgewebe besteht die Notwendigkeit nach geeigneten Ersatzmaterialien zu suchen. Das Ersatzgewebe soll die Funktion natürlichen Knorpels übernehmen und keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit wurde in einer tierexperimentellen Studie am Meerschweinchen untersucht inwieweit ein Hybridsystem aus porösem Polyethylen als stabile formgebende Matrix und autologen Chondrozyten die Eingangs genannten Kriterien erfüllt. Als experimentelles Modell wurden adulte Meerschweinchen gewählt, die in der Forschung auf dem Gebiet der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde bereits lange Zeit etabliert sind, wenn auch mehr auf dem Gebiet der Hörforschung.

5.1. Tissue engineering

Der Begriff Tissue engineering wurde erstmals 1987 während eines Treffens der National Science Foundation eingeführt. Es bezeichnet die Anwendung von Prinzipien und Methoden von Technik und Naturwissenschaften zum grundlegenden Verständnis von Struktur-/Funktions-Beziehungen in gesundem und pathologischem Gewebe sowie die Entwicklung von biologischen Ersatzstoffen zur Reparatur, Erhaltung oder Verbesserung von Gewebefunktionen (Van Winterswijk et al., 2007).

In den folgenden Jahren wurden verschiedenste Tierexperimente zur Untersuchung der Effekte, der Eigenschaften sowie der Möglichkeiten der Regeneration von Knorpeldefekten durch die autologe Chondrozytentransplantation durchgeführt (Peterson et al., 1984; Grande et al., 1989; Goldberg et al., 1994; Brittberg et al., 1996; Rahforth et al., 1998; M. Brittberg et al., 2003).

Das erste klinische Tissue engineering von Knorpel wurde 1987 in Gothenburg, Schweden, durchgeführt, indem ein Gelenkknorpeldefekt an der Femurkondyle eines Knies durch die Implantation von körpereigenen Chondrozyten, welche in vitro vermehrt und mit einer mechanischen Membran – dem Periosteum – bedeckt wurden, behandelt wurde.

Dies nannte man initial autologe Chondrocyten Transplantation (ACT). Heute wird auch der Begriff Autologe Chondrozyten Implantation (ACI) verwendet (M. Brittberg, 2007).

Waldemann et al. (2003) untersuchte die Unterschiede in phenotypischen und funktionalen Eigenschaften von Chondrozyten in den verschiedenen Zonen des artikulären Knorpelgewebes und fand heraus, dass eine Kombination von Zellen aus der mittleren und tiefen Zone am besten geeignet für die ex-vivo-Kultivierung von hyalin-ähnlichem-Knorpelgewebe ist.

Verschiedene Studien betrachten die Unterschiede der Entnahmeorte des Knorpels (Tay et al., 2004), des Alters der Spender (Rotter et al., 2001) sowie der Knorpelarten verschiedener Spezies. In einer Arbeit von Tay et al. (2004) wurden menschliche Chondrozyten aus Ohr, Nase und Rippen hinsichtlich ihrer Eignung zur Herstellung von autologen Knorpeltransplantaten für die nichtartikuläre Wiederherstellungschirurgie verglichen. Die Chondrozyten aus allen drei Entnahmeorten konnten erfolgreich isoliert werden, sie erhöhten ihre Proliferationsrate infolge des Zusatzes von Platelet-derived-growth-factor bb (PDGF-bb) und dedifferenzierten während der Passage. Eine Redifferenzierung trat bei Ohr- und Nasen-, jedoch nicht bei Rippenknorpel nach PDGF-bb-Expansion auf, wie durch die Messung einer signifikanten Erhöhung des Glycosaminoglykan (GAG)/DNA-Inhalts und der Kollagen-Typ-II-mRNA-Expression in den entstehenden Pellets bewiesen werden konnte. Die Chondrozyten aus Nase und Ohr produzierten qualitativ bessere Knorpelpellets als die Zellen aus Rippenknorpel. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass alle drei Zellreihen genutzt werden können, um autologe Transplantate in ausreichender Größe herzustellen. Jedoch haben Ohr- und Nasenknorpel, wenn sie mit PDGF-bb expandiert wurden, ein höheres chondrogenes Potenzial.

Ein Problem stellt die begrenzte Ausgangsmenge autologen Knorpelgewebes dar.

5.1.1. In vitro Kultur primärer Chondrozyten

Wichtige Untersuchungen galten den Einflüssen von Immunreaktionen, Wundheilung und Gefäßversorgung (Haisch et al., 2000; Haisch et al., 2004) sowie der notwendigen Zelldichte der Transplantate (Mauck et al., 2002).

In den letzten Zwanzig Jahren haben zahlreiche Studien die Kultivierung und Vermehrung autologer Chondrozyten in vitro untersucht. Auch die Möglichkeiten der Steigerung der Proliferationsrate der Zellen in vivo und in vitro wurden untersucht (van Osch et al., 2002). In einer Studie von Nixon et al. (1993) wurden die temporären morphologischen Eigenschaften sowie die Proteoglykansynthese von Chondrozyten-besiedelten Kollagen-Matrizes untersucht. Nach 14 Tagen in Kultur konnte Chondrozytenproliferation, Bildung von kleinen Zellgruppen und lineare Segmente von Zellen nachgewiesen werden. Das Kollagengrundgerüst blieb intakt und zeigte im Verlauf der Studie (ab Tag 10) verdickte Areale, die auf eine Matrixsynthese und Matrixablagerung der Zellen hindeuten. Auch die Synthese von Glykosaminoglykan nahm über die Zeit signifikant zu, bis sie ein Plateau an Tag 14 erreichte. Benya et al. (1982) zeigten am Beispiel von Gelenknorpelzellen von Kaninchen, dass diese, im differenzierten Phenotyp hauptsächlich aus Typ-II-Kollagen und knorpelspezifischen

DISKUSSION

Proteoglykanen bestehenden Zellen, in serieller Monolayerkultur ihren Phenotyp verlieren und dieser durch einen komplexen Kollagen-Phenotyp ersetzt wird, welcher hauptsächlich aus Kollagen-Typ I besteht und eine nur geringe Proteoglykansynthese aufweist. Er konnte jedoch auch nachweisen, dass derartig dedifferenzierte Chondrozyten in Agarose-Gel-Kulturen ihren ursprünglichen Phenotyp wieder erlangen können. Den Wechsel von einer flachen Morphologie und verankerungsabhängigen Kultur in eine sphärische und befestigungsunabhängige Kultur überlebten 80% der Zellen und lagerten nachfolgend eine charakteristische Proteoglykanmatrix ab. Die Raten der Proteoglykan- und Kollagensynthese wechselten zu denen von primären Chondrozyten. In dieser Studie konnte die komplette Rückkehr zum differenzierten Kollagenphenotypen nachgewiesen und somit ein reversibles System in der Genexpression von Chondrozyten demonstriert werden.

In einer Studie von Aulthouse et al. (1989) wurde humaner Epiphysenknorpel untersucht. Auch hier wurde ein Verlust des differenzierten Phenotypes in Monolayerkultur festgestellt. Die Zellen produzierten Typ-I-Kollagen, Fibronectin und kleine nicht-cartilaginöse Proteoglykane. Die nachfolgende Kultivierung dieser Zellen in Agarose war verbunden mit dem Erwerb von Knorpelzelltypischen ultrastrukturellen Merkmalen und der Synthese von Typ-II-Kollagen sowie knorpelspezifischen Proteoglykanen. Der Switch zwischen nonchondrozytärem und differenziertem Phenotyp geschah zwischen der ersten und zweiten Woche in Agarose-Kultur, war jedoch nicht homogen innerhalb einer Kultur.

Veilleux et al. (2004) konnten nachweisen, dass adulte Gelenkknorpelzellen nach zwei Passagen in Monolayerkultur im Vergleich mit frisch isolierten Zellen, die vier Wochen in einer Kollagen-Glykosaminoglykan-Matrix kultiviert wurden, ein ähnliches oder besseres Proliferations- und Biosyntheseverhalten zeigen und Kollagen-Typ II synthetisieren können.

In der hier vorliegenden Studie wurden die aus der Concha isolierten primären Chondrozyten in zwei Passagen expandiert und dann auf die vorbereiteten PE-Träger in einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/Probe ausgesät. Dies entsprach initial einer deutlich höheren Zellkonzentration als in zahlreichen Studien empfohlen.

Es scheint ein linearer Zusammenhang zwischen biosynthetischer Aktivität von Knorpel und der Anzahl der angesiedelten Chondrozyten zu bestehen. Mauck et al. (2002) untersuchten unter anderem den Einfluss der Zelldichte der in vitro kultivierten Chondrozyten auf die Proliferation von Knorpel. Sie verwendeten Zelldichten von 20 und 60×10^6 Zellen/ml. Sie konnten zeigen, dass hohe Zelldichten die Gewebeeigenschaften in Kultur verbesserten. Zusätzlich konnte während dieser Studie gezeigt werden, dass die mechanischen Eigenschaften der Gewebekonstrukte stärker

DISKUSSION

von Kollagen als von Glykosaminoglykanen abhängt. Paige et al. (1996) führten Untersuchungen zur idealen Zelldichte von Chondrozyten auf einer Matrix aus Kalziumalginat durch. Sie beobachteten Proben mit Zelldichten von 0; 1,0; 5,0 und 10,0 $\times 10^6$ Zellen/ml, welche in subkutane Taschen in das Dorsum von Nacktmäusen implantiert wurden. Proben mit einer initialen Zelldichte von 5,0 $\times 10^6$ Zellen/ml zeigten eine außerordentliche Knorpelformation zwölf Wochen nach Implantation. Bei Proben mit einer niedrigen Zelldichte wie 1,0 $\times 10^6$ Zellen/ml konnte nur mikroskopisch Knorpelwachstum nachgewiesen werden. Die Histoarchitektur des neuen Knorpels ähnelte stark der des nativen Knorpels.

Ishizaki et al. (1994) zeigten am Beispiel von Ratten- und Hühnerchondrozyten, dass diese bei Ansiedlung in hoher Zelldichte überleben können, wenn keine anderen Zelltypen oder exogene Proteine oder Signalmoleküle vorhanden sind. Eine Zellkultur niedriger Zelldichte würde unter den gleichen Bedingungen absterben. Sie wiesen nach, dass der Zusatz von Medien aus Kulturen mit hohen Zelldichten, fetales Kälberserum (FCS) oder eine Kombination von Wachstumsfaktoren zu den Kulturen mit niedrigen Zelldichten das Überleben dieser Kulturen fördert.

Auch Puelacher et al. (1995) führten hierzu Untersuchungen durch. Es wurden Zelldichten von 2, 10, 20 und 100 $\times 10^6$ Zellen/ml untersucht, welche auf einer Matrix aus synthetischem Polymer, nach einer Woche in-vitro-Kultur, subkutan in das Dorsum von Nacktmäusen implantiert wurden. In 95,6% der Fälle konnte die Neubildung von Knorpel beobachtet werden, was bei 24 Kontroll-Proben (ohne Zellbesiedlung) nicht der Fall war. Während zwölf Wochen in-vivo-Wachstum nahm das Nassgewicht und die Dicke der Proben mit einer initialen Zellbesiedlung von 10, 20 und 100 $\times 10^6$ Zellen/ml signifikant zu. Im klinischen Setting wird heutzutage aufgrund dieser Studien eine initiale Zellmenge von 20,0 -30,0 $\times 10^6$ Zellen/ml zur Transplantation angestrebt (Brittberg et al., 2003), was in etwa der von uns eingesetzten Zellkonzentration entspricht.

Für den Ersatz von hyalinem (Nase) oder elastischem (Ohr) Stützknorpel ist aufgrund der fehlenden mechanischen Belastbarkeit die alleinige autologe Chondrozytentransplantation nicht geeignet.

5.1.2. Polyethylen als nichtresorbierbare Matrix

Poröses PE ist ein etabliertes Biomaterial und kommt bereits im klinischen Alltag zum Einsatz (Berghaus, 1985).

Trotz guter Biokompatibilität werden z.T. nach Jahren Abstoßungsreaktionen beobachtet (A. Berghaus, 2007).

DISKUSSION

Ausgehend von einer *in vitro* Studie der Arbeitsgruppe (Röpke et al., 2006) die zeigte, dass die Beschichtung von PE mit Kollagen die Anzahl adhärenter, vitaler Chondrozyten erhöht, sollte durch geeignete Modifizierung der PE-Oberfläche diese Abstoßungsreaktionen zurückgedrängt werden.

Neben der adhesiven Bindung von Kollagen an die Kunststoffoberfläche wurden in dieser Studie die PE-Oberflächen durch Plasmabehandlung funktionalisiert und somit die Möglichkeit der kovalenten Bindung des Kollagens an die PE-Oberfläche geschaffen. Die kovalente Bindung des Kollagens an die PE-Oberfläche sollte den Zell-PE-Matrix-Kontakt verstärken. Die *in-vitro*-Daten bestätigen dieses Ergebnis nicht.

Der positive Einfluss von Kollagen insbesondere Kollagen II auf die Bildung von Knorpelmatrix wird durch zahlreiche Studien bestätigt.

Tsai et al. (2009) konnten an einem 3D-Modell zur Knorpelwundheilung zeigen, dass eine Matrix aus Kollagen I und II, besiedelt mit Chondrozyten eine signifikant höhere Glykosaminoglykanexpression bewirkt als eine Matrix aus Kollagen I. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass basic fibroblast growth factor (bFGF) die Chondrozytenproliferation, -migration und -differenzierung in einer Kollagen I/II-Matrix unterstützt und das Potential hat die Wundheilung zu regulieren. Veilleux et al. (2004) fanden, dass die Verwendung einer Kollagen-II-Glykosaminoglykanmatrix eine höhere biosynthetische Aktivität der Zellen in Kultur bewirkt.

Nehrer et al. (1997) untersuchten das Verhalten von Kaninchenchondrozyten auf zwei verschiedenen Matrizes *in vitro*, von denen die erste aus einem Kollagen-Glykosaminoglykan-(GAG)-Copolymer bestand, welches Kollagen I enthielt, und die zweite aus einem porösen Kollagen-Typ-II-Träger bestand. Die Ergebnisse nach 14 Tagen in Kultur zeigten, dass eine Kollagen-II-Matrix sinnvoll als Träger für ein Chondrozytenimplantat wäre, da ein höherer Anteil von Zellen seine den Chondrozyten typische sphärische Morphologie beibehält und eine höhere biosynthetische Aktivität zu beobachten ist.

Lahiji et al. (2000) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Chitosan, ein Copolymer aus Glukosamin und N-acetylglukosamin, biokompatibel ist und es als zugegebenes Substrat in Kultur das Wachstum und die Funktionalität von menschlichen Osteoblasten und Knorpelzellen erhalten kann.

Yang et al. (2006) untersuchten den Einfluss von Expansions- und Redifferenzierungsbedingungen auf die finale Gewebemorphologie von humanem Knorpel über 28 Tage. Dabei verwendeten sie ein Medium ohne Wachstumsfaktor (basic expansion condition [BEC]) und ein Medium mit basic fibroblastic growth factor (bFGF)-Supplementation (Growth factor supplemented expansion condition [GFSEC]). Nach Expansion erfolgte die Redifferenzierung in einer Pellet-Kultur und auf einem

Kollagen-Typ-II-ummantelten Filter. Mittels Elektronenmikroskop konnte gezeigt werden, dass die Chondrozyten und die Organisation der Extrazellulären Matrix auf den Kollagen-Typ-II-Filtern denen von hyalinem Knorpel am ähnlichsten waren. Des Weiteren resultierten die Chondrozytenexpansion in GFSEC und die Redifferenzierung auf Kollagen-ummantelten Filtern in der optimalen Chondrogenese. In unserem Modellsystem wurden die PE-Proben nach Besiedlung mit autologen Chondrozyten über einen Zeitraum von 14 Tagen *in vitro* kultiviert. Histologisch waren auf Kontrollproben vereinzelt Knorpelstrukturen nachweisbar. Allerdings wurde auch deutlich, dass die Proben nicht homogen besiedelt waren (Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend wurde aufgezeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen biosynthetischer Aktivität von Knorpel und der Anzahl der angesiedelten Chondrozyten besteht, die Vermehrung von Chondrozyten in Monolayerkultur mit einem Verlust der Dedifferenzierung der Knorpelzellen zu fibroblastenähnlichen Zellen einhergeht (Benya et al., 1982) und die Redifferenzierung durch die dreidimensionale Anordnung der Zellen und durch geeignete Biomaterialien (Lahiji et al., 2000) oder Faktoren, wie zum Beispiel Kollagen, BMP's, basic fibroblastic growth factor, oder Chitosan unterstützt werden kann (Sittinger et al., 1999; Frenkel et al., 2000).

5.2. Histologische Auswertung

Die Analyse der Proben nach einem, sechs und zwölf Monaten zeigte, dass sich bei den *in vitro* mit Chondrozyten besiedelten Implantaten neue Knorpelinseln bildeten, welche in einigen Fällen (Sechs- und Zwölf-Monats-Tiere) direkt an der Grenze des porösen Polyethylens angesiedelt waren. In Abb. 6 sind vorbesiedelte (a+c) und nicht besiedelte (b+d) PE-Proben noch einmal gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass bereits nach sechs Monaten eine gute Knorpelneubildung zu beobachten war.

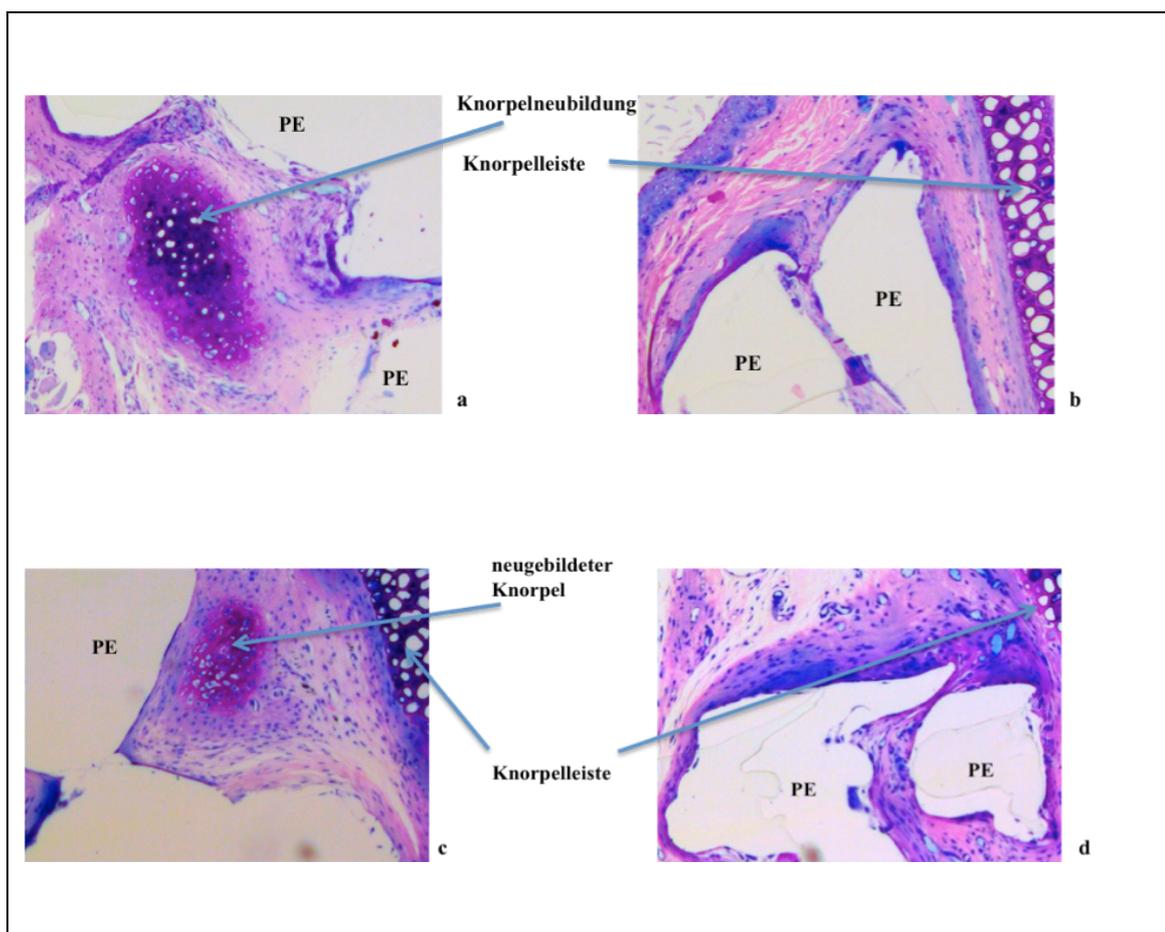


Abbildung 16: Knorpelwachstum auf unmodifiziertem PE bei Sechs (a+b)- und Zwölf (c+d)- Monatstieren mit (a+c) und ohne Vorbesiedelung (b+d)

(a) – MSK 64 links (vorbesiedelt), (b) – MSK 64 rechts (unbesiedelt), (c) – MSK 44 rechts (vorbesiedelt), (d) – MSK 44 links (unbesiedelt)

Aus der Literatur ist bekannt, dass Transplantate oft eine immunologische Reaktion im autologen Organismus hervorrufen (Haisch et al., 2004). Gründe dafür sind die noch nicht vollständig ausgebildete Matrix und Fremdkörperreaktionen, welche vor allem durch Biomaterialien hervorgerufen werden (Cao et al., 1998). Dies führt zu Zellinfiltrationen, fibrösen Gewebeveränderungen und Transplantatschrumpfungen, welche eine Minderung der Transplantatqualität bewirken (Haisch et al., 2000).

Durch Besiedelung der Polyethylen-Proben mit autologen Chondrozyten konnte im Gegensatz zu früheren Studien (Cenzi et al., 2005) eine deutlich geringere Abstoßungsrate von nur 0,65 % der besiedelten Proben beobachtet werden.

Nach Implantation der vorbesiedelten Polyethylenproben kam es zur Interaktion der autologen Zellen mit dem umliegenden Gewebe welches diese als körpereigene Zellen erkannte. Es war eine Verringerung der Anzahl an Fremdkörperriesenzellen zu beobachten, welche jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden konnte. Ein Grund dafür könnte in der inhomogenen Besiedlung zu suchen sein. Fehlen autologe Zellen

DISKUSSION

auf der PE-Oberfläche, ist ein direkter PE-Gewebe-Kontakt möglich der die Immunreaktion befördert.

Im Vergleich mit den vor Implantation unbesiedelten Proben wurde jedoch ein massives Einwachsen von Fibroblasten und über einen längeren Zeitraum die Ausbildung einer Kapsel um das Biomaterial beobachtet. Auch die Zahl der Fremdkörperriesenzellen nahm über die Zeit nicht signifikant ab (Abb. 6-7 und 13-15).

Zur weiteren Absicherung der quantitativ erhobenen Daten wurde zusätzlich ein Scoring-System angewandt. Vier unabhängige Betrachter beurteilten die histologischen Präparate nach einer vorgegebenen Klassifizierung (Tabelle 8 im Anhang).

Die Auswertung über Scoring bestätigte die gefundenen Daten. Die folgenden Daten fassen noch einmal die Ergebnisse der Immunreaktion (Abbildung 21) in Abhängigkeit von der Zellbesiedlung, der Oberflächenmodifikation und dem Beobachtungszeitraum zusammen.

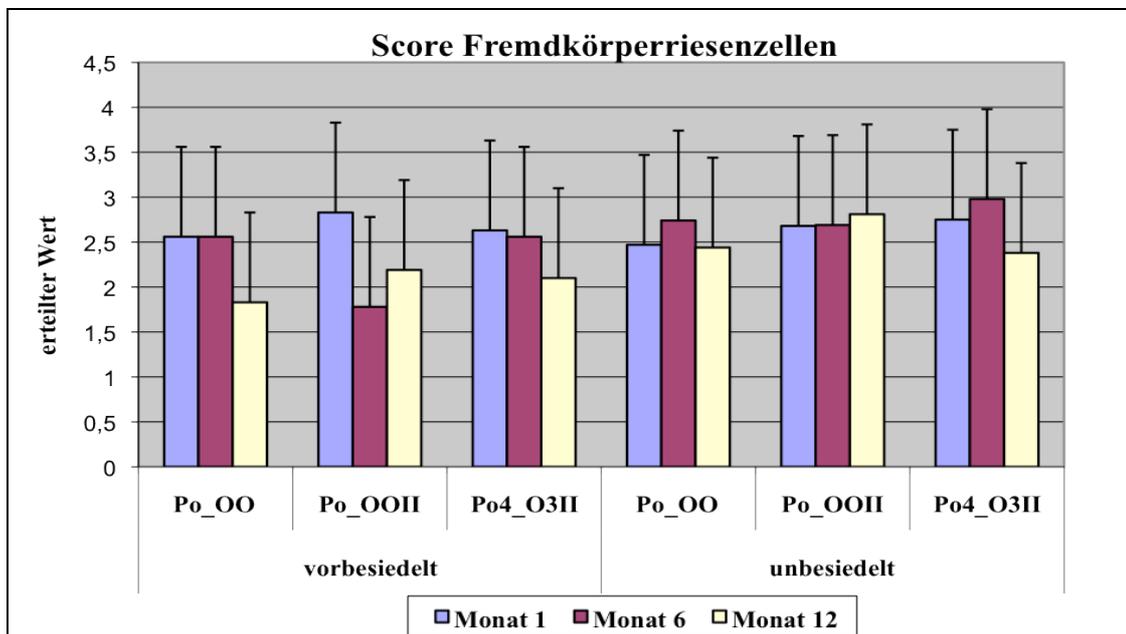


Abbildung 21: Analyse der Fremdkörperreaktion nach Scoring in Abhängigkeit von Zellbesiedlung, Oberflächenmodifikation und Beobachtungszeitraum.

Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

Werden die Ergebnisse der FKRZ-Scores für die besiedelten und unbesiedelten Proben unabhängig vom Beobachtungszeitraum zusammengefasst, fällt die Immunreaktion

DISKUSSION

bei den vorbesiedelten Implantaten mit $p = 0,02$ signifikant geringer aus (Tab 20 b im Anhang).

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung wurden standardisiert, indem die ausgezählten oder ausgemessenen Werte auf den Quadratmillimeter untersuchte Implantatfläche normiert wurden.

Aufgrund der kreisrunden Form der Implantate waren die auszuwertenden Proben von unterschiedlicher Größe (Abbildung 17).

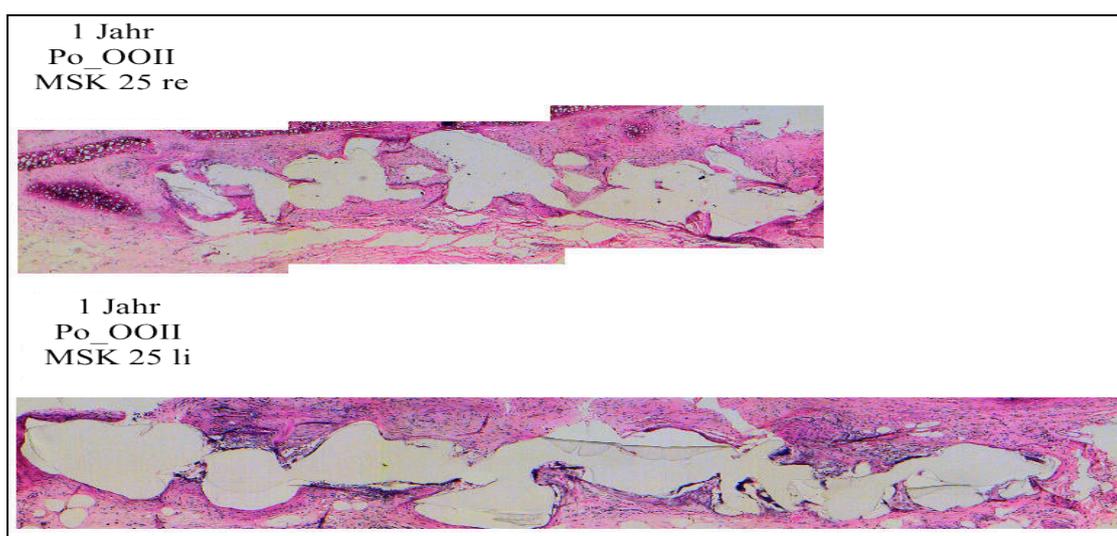


Abbildung 17: Beispiel für verschieden große Anschnitte

Po_OII – Kollagen-II-beschichtet, MSK – Meerschweinchen Nummer 25 rechts (re) bzw. links (li)

Die Aufaddition der ausgemessenen PE-Flächen machte deutlich, dass die Flächen an vorbesiedelten und unbesiedelten Polyethylenproben annähernd gleich groß waren (Abb. 1). Studien- und Kontrollgruppe waren damit vergleichbar.

Die histologische Aufarbeitung und mikroskopische Auswertung der Proben war zum Teil recht schwierig.

Bedingt durch die unterschiedliche Festigkeit des PE-Implantates und des umgebenden Gewebes machte sich die Kunststoffeinbettung erforderlich. Bei Einbettung in das sonst übliche Paraffin bricht der Kunststoff beim Schneiden aus dem Präparat. Aber auch in Technovit eingebettet, kommt es zum Teil zum Herausbrechen des Kunststoffes oder aber beim Strecken der Schnitte auf der Wasseroberfläche zu starker Faltenbildung – Artefakte die sich auch im mikroskopischen Bild niederschlagen (Abbildung 18).

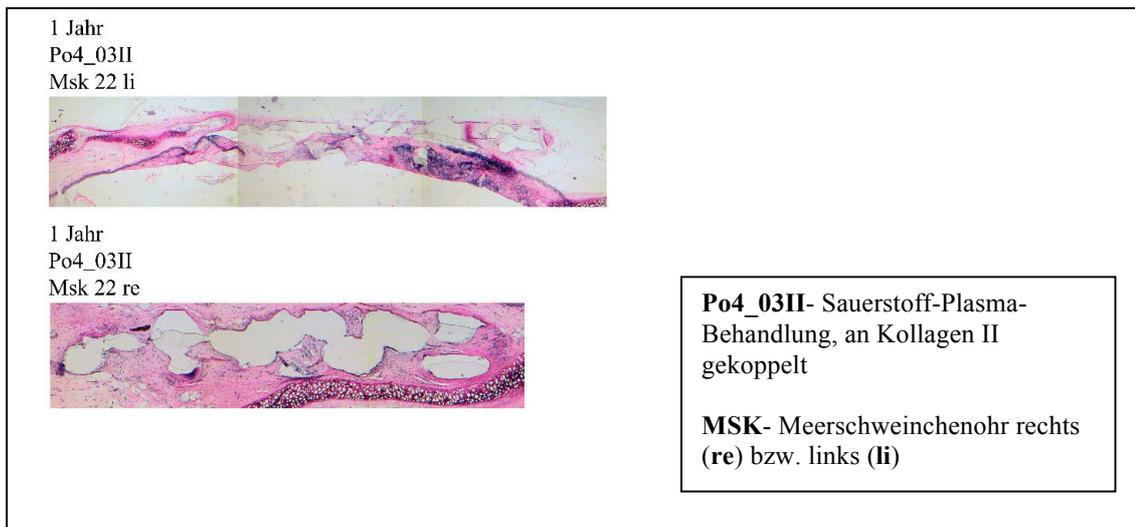


Abbildung 18: Darstellung der Präparatbeschädigungen

Durch Schrumpfungsvorgänge, verursacht durch eine unterschiedliche Stabilität von Polyethylen und umliegenden Gewebes, wurden einige histologische Schnitte so beschädigt, dass sich diese wellten und teilweise Risse zwischen Polyethylen und umliegenden Gewebe entstanden, wie in Abbildung 19 in den Ausschnittvergrößerungen dargestellt.

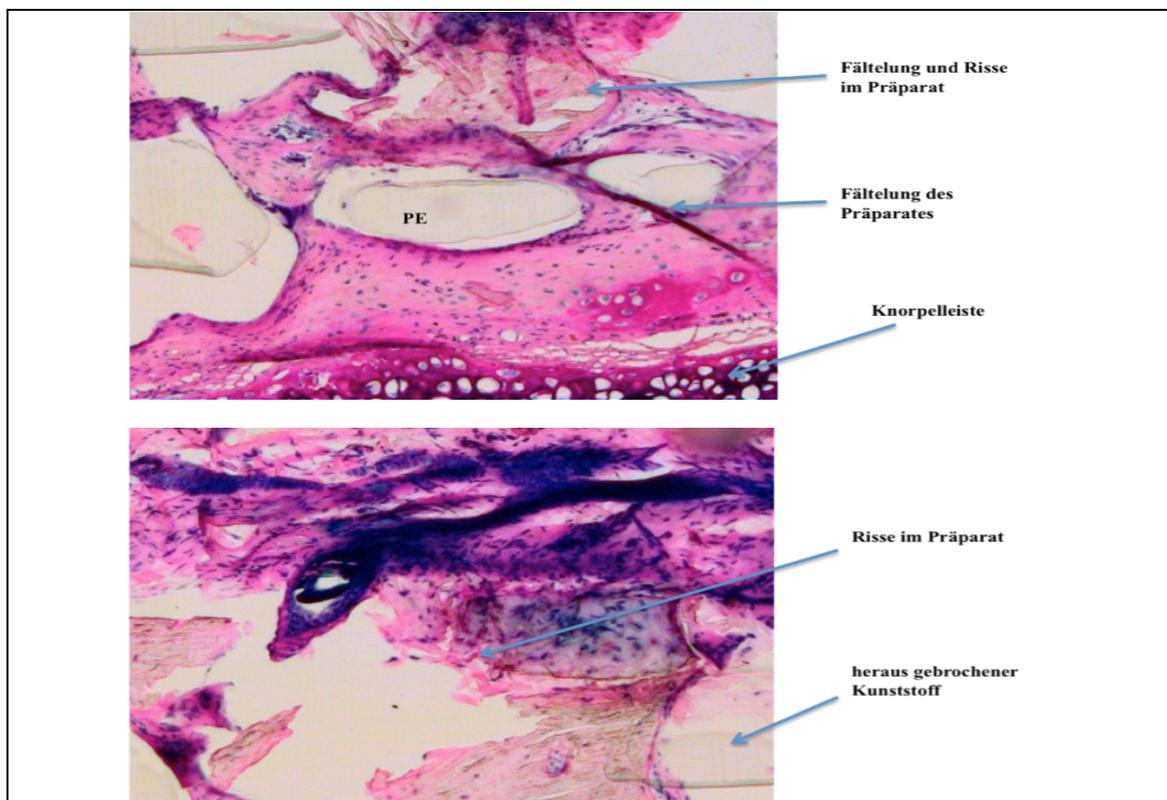


Abbildung 19: Darstellung von Präparateschäden im Detail am Beispiel von MSK 19 rechts

Aus diesem Grund wurde auch die Knorpelneubildung noch einmal nach dem Score-System ausgewertet.

In zwei voneinander unabhängigen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Vorbesiedlung poröser PE-Proben die Knorpelneubildung positiv beeinflusst. Ein möglicher Grund für diesen positiven Effekt könnte das Zurückdrängen der Immunreaktion sein. Die Analyse der Immunreaktion in Form von FKRZ mittels quantitativer mikroskopischer Auswertung ergab, wie bereits erwähnt, eine signifikante Verminderung der FKRZ (siehe Anhang, Tabelle 22b).

Abbildung 20 zeigt die Knorpelentwicklung nach dem Scoring. Die Auswertung über das Score-System zeigte nicht so deutliche Unterschiede wie das quantitative Auszählen bzw. Ausmessen von Knorpelarealen oder FKRZ, bestätigte aber den bereits gefundenen Trend. Auch hier wird das Signifikanzniveau mit $p = 0,01$ erreicht, wenn die Knorpelneubildung der besiedelten mit den unbesiedelten Proben unabhängig vom Beobachtungszeitraum verglichen wird (Tab. 25 im Anhang).

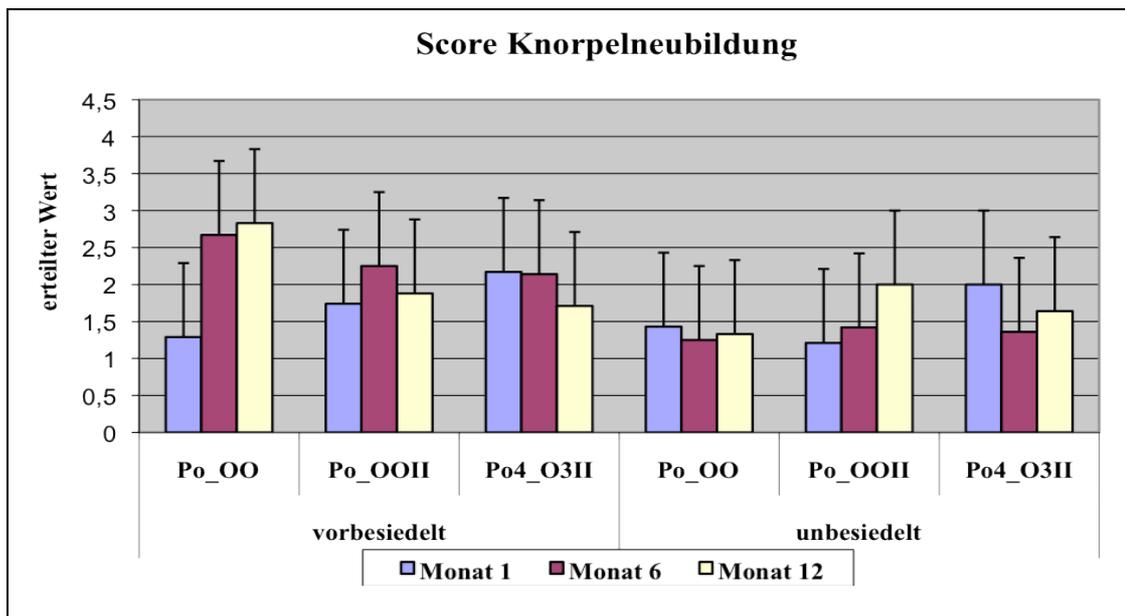


Abbildung 20: Analyse der Knorpelneubildung nach Scoring in Abhängigkeit von Zellbesiedelung, Oberflächenmodifikation und Beobachtungszeitraum.

Po_OO – keine Modifikation, Po_OOII – Kollagen-II-beschichtet, Po4_O3II – Sauerstoff-Plasma-behandelt und mit Kollagen II gekoppelt

In der quantitativen Analyse wurde der deutlichste Unterschied bei den vorher mit Kollagen II beschichteten Proben gesehen (s. Abb.7).

Die Beschichtung mit Kollagen II wirkte sich insgesamt positiv auf das Knorpelwachstum aus. Besonders deutlich wurde dies bei Betrachtung der vor Implantation unbesiedelten Proben. Hier konnte über den Zeitraum von zwölf

DISKUSSION

Monaten ein Knorpelwachstum beobachtet werden, welches bei den mit Sauerstoffplasma behandelten und mit Kollagen II gekoppelten Polyethylenproben am ausgeprägtesten war. Bei den vorbesiedelten Proben konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich die beste Knorpelneubildung bei den vorbesiedelten unmodifizierten Proben (s. Abb. 8).

Über den Zeitraum von zwölf Monaten konnte bei den vorbesiedelten Präparaten ein insgesamt kontinuierlich ansteigendes Knorpelwachstum beobachtet werden (s. Abb. 10-13).

Die hier dargestellten Befunde konnten nicht alle signifikant nachgewiesen werden. Ein Hauptgrund dafür ist die für die Zahl der Untersuchungsgruppen (Vergleich verschiedener Oberflächenmodifikationen, Vergleich Vorbesiedelt zu Unbesiedelt, Vergleich über verschiedene Zeiträume) zu geringe Anzahl an Versuchstieren, zum Teil verursacht durch implantatbedingte Abstoßungsreaktionen. Dabei wurden 13% der unbesiedelten Implantate abgestoßen, sodass deren vorbesiedelte Gegenstücke automatisch von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Diese hohe Abstoßungsrate unterstützt allerdings die These, dass eine Vorbesiedlung von PE-Implantaten mit autologen Chondrozyten deren Integration in das umliegende Gewebe verbessert. In weiterführenden Studien sollte versucht werden, die Besiedlung der PE-Proben mit autologen Zellen zu optimieren.

Bisher ist es nicht gelungen, eine homogene Besiedlung des porösen Polyethylens zu realisieren, sodass das nachfolgende Knorpelwachstum ebenfalls teilweise sehr inhomogen geschieht und wie bereits erwähnt, die Ummantelung der Proben mit vor Fremdkörperreaktionen schützenden autologen Zellen lückenhaft ist. Darüber hinaus wäre für die Knorpelneubildung das Verbleiben der kritischen Zellmenge (10^6 Zellen/Probe) auf der Probe sehr förderlich.

Aufgrund der langen Regenerationszeiten von Knorpelgewebe erscheint es sinnvoll, den ersten Beobachtungszeitpunkt bei tierexperimentellen Studien erst nach drei Monaten zu wählen.

6. Klinische Relevanz

Das Tissue Engineering ist ein rasch wachsendes Feld der Biomedizin. Die Expansion autologer Zellen in Monolayerkulturen und die nachfolgende Besiedelung von dreidimensionalen Trägerstoffen, in diesem Falle poröses Polyethylen, eröffnet einzigartige Möglichkeiten in der rekonstruktiven Medizin.

Das hier verwendete poröse Polyethylen ist auf Grund seiner Materialeigenschaften gut für die rekonstruktive Chirurgie im HNO-Bereich geeignet. Es ist erhältlich in verschiedenen Größen und Formen und kann auf Grund seiner wenig spröden Struktur intraoperativ durch den Chirurgen gut an die vorliegenden Bedingungen angepasst werden. Es ist zusätzlich strahlendurchlässig und erzeugt keine Artefakte, so dass mittels CT oder MRT die Lage des Implantats postoperativ beurteilt werden kann.

Die poröse Struktur dieses Materials ermöglicht das rasche Einwachsen von Gewebe und Blutgefäßen, was die Wundheilung positiv beeinflusst und das Implantat in seiner Form stabilisiert.

Durch das Aufbringen von Kollagen II bzw. Beschichtung mit Kollagen II nach Behandlung mit Sauerstoff-Plasma können die Implantateigenschaften von Polyethylenen zusätzlich günstig beeinflusst werden.

Diese Oberflächenmodifikation führt zu einer verminderten Immunreaktion des Körpers auf das eingebrachte Material.

Andererseits ist zu bedenken, dass Kollagene tierischen Ursprungs ein weiteres Risiko für allergische oder Abstoßungsreaktionen darstellen können.

Die Resultate dieser Studie deuten darauf hin, dass eine Vorbesiedelung von porösen Polyethylen-Implantaten mit autologen Zellen zu einer besseren Integration dieser Implantate in das Umgebungsgewebe führt.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde poröses Polyethylen als Implantatmaterial verwendet. Durch Bildung eines Hybridsystems, bestehend aus porösem Polyethylen (Medpor®) und autologen Knorpelzellen, sollte die mitunter beobachtete Abstoßungsreaktion unterdrückt und die Integration in das Umgebungsgewebe verbessert werden.

Die Studie wurde am Meerschweinchenmodell durchgeführt.

Insgesamt 75 Tieren wurden aus der Ohrmuschel Knorpelzellen entnommen, die zunächst in einer Monolayerkultur vermehrt wurden, um dann auf PE- bzw. modifizierte PE-Proben ausgesät zu werden.

Zur Verbesserung der PE-Zell-Wechselwirkungen wurde das unmodifizierte poröse PE mit Kollagen II beschichtet bzw. nach Funktionalisierung durch Sauerstoffplasmabehandlung mit Kollagen II gekoppelt.

Die mit autologen Meerschweinchenknorpelzellen besiedelte Probe wurde in ein Ohr implantiert.

Eine in gleicher Weise modifizierte, aber unbesiedelte Probe wurde als interne Kontrolle in das andere Ohr implantiert. Nach einem Monat, sechs Monaten und zwölf Monaten wurden die Tiere getötet und die Implantate mit Umgebungsgewebe histologisch aufgearbeitet. Danach erfolgte die mikroskopische und statistische Auswertung. Diese zeigte, rein mikroskopisch, besonders bei den Sechs-Monats- und den Zwölf-Monats-Tieren, deutliche Unterschiede zwischen den vorbesiedelten und unbesiedelten Proben. Die vorbesiedelten Proben zeigten ein gutes Knorpelwachstum und eine bessere Integration in das umliegende Gewebe. Es gab weniger sichtbare Fremdkörperreaktionen. Nach der statistischen Auswertung der quantitativen mikroskopischen Analyse wurde allerdings nur bei den Zwölf-Monats-Tieren das Signifikanzniveau erreicht. Hinsichtlich der Modifizierung der PE-Proben mittels Sauerstoff-Plasma-Behandlung und Kollagen-II-Beschichtung konnte in allen Gruppen rein mikroskopisch kein Effekt nachgewiesen werden. Rein statistisch zeigten sich hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Modifizierungsarten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Vorbesiedlung von Polyethylen-Implantaten mit autologen Chondrozyten positive Effekte hinsichtlich der geringeren Abwehrreaktionen, der besseren Integration in das Umgebungsgewebe sowie die gewebespezifische Neubildung von Knorpel hat.

Literaturverzeichnis

1. Alini M., Li W., Markovic P., Aebi M., Spiro R., Roughley P.J. (2003) The potential and limitations of a cell-seeded Collagen/Hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix. *Spine* 28: 446-453
2. Armstrong C.G., Mow V.C. (1982) Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content. *J Bone Surg Am* 64: 88-94
3. Aulthouse A.L., Beck M., Griffey E., Sanford J., Arden K., Machado M.A., Horton W.A. (1989) Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* Jul; 25 (7): 659-668
4. Benya P.D., Shaffer J.D. (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30 (1): 215-224
5. Berghaus A. (1985) Porous polyethylene in reconstruction head and neck surgery. *Arch Otorhinolarygol* 111: 154-160.
6. Berghaus A. (1992) Alloplastische Implantate in der Kopf- und Halschirurgie. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* Springer-Verlag
7. Berghaus A. Röpke E., Schön I., Vogel J., Jamali J., Bloching M. (2006) Screening von modifizierten Polyethylenoberflächen für das Tissue-Engineering von Chondrozyten. *Laryngo-Rhino-Otol* 85: 1-7
8. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., et al. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889
9. Brittberg M., et al. (2003) Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation: A review of Recent Developments. *J Bone Joint Surg Am.* 85: 109-115
10. Brittberg M. (2007) Articular Cartilage engineering with autologous Chondrocyte Transplantation. *Orthopaedic surgery Cartilage repair:* 81-84
11. Bruder S.P., Jaiswal N., Ricalton N.S., Mosca J.D., Kraus K.H., Kadiyala S. (1998) Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop* 355 (Suppl): 247-256
12. Brunner F.X. (1993) Implantatmaterialien – was hat sich wo und wann bewährt?, *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl:* 311-336
13. Bujia J., Sittinger M., Hammer C., Burmester G. (1994) Effect of Growth Factors on Cell Proliferation by Human Nasal Septal Chondrocytes Cultured in Monolayer. *Acta Otolaryngol* 114: 539-543
14. Bujia J., Reitzel T., Sittinger M. (1995) In-vitro-Züchtung von Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Einfluss von L(+)-Laktat und Glykaolat auf kultivierte humane Chondrozyten. *Laryngo-Rhino-Otol* 74: 183-187
15. Cancedda R., Dozin B., Giannoni P., Quarto R. (2003) Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology* 22: 81-91

16. Cao, Y. A. Rodriguez, et al. (1998) Comparative Study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* 9 (5): 475-487
17. Carboni A., Cerulli G., Perugini M., Renzi G., Becelli R. (2002) Long-term follow-up of 105 porous polyethylene implants used to correct facial deformity. *Eur J Plast Surg* 25: 310-314;
18. Cenzi R., Farina A., Zuccarino L., Carinci F. (Jul 2005) Clinical outcome of 285 Medpor grafts used for craniofacial reconstruction. *J Craniofac Surg.* 16 (4): 526-530.
19. Claes L., Ignatius A. (2002) Entwicklung neuer biodegradabler Implantate. *Chirurg* 73: 990-996
20. De Palma A.F., McKeefer C.D., Subin D.K. (1966) Process of repair articular cartilage demonstrated by histology and audioradiography with tritiated thymidine. *Clin Orthop* 48: 229-242
21. Fischer-Fröhlich C.L.: Die Situation der Organtransplantation in der Bundesrepublik Deutschland und im europäischen Ausland aus medizinischer Sicht – eine Bestandsaufnahme. Landeszentrale für politische Bildung (Hrsg.): Organentnahme und Transplantation. Bad Urach Stuttgart: 1997
22. Frenkel S.R., Saadeh P.B. et al. (2000) Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* 105 (3): 980-990
23. Freshney R. I. (1990) Tierische Zellkulturen. Berlin, New York. Walter de Gruyter.
24. Graham B.S., Thiringer J.K., Barrt T.L. (2001) Nasal tip ulceration from infection and extrusion of a nasal alloplastic implant. *J Am Acad Dermatol* 44 Suppl 2: 362-364
25. Haisch A., Groger A. et al. (2000) Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation. *Biomaterials* 21 (15): 1561-1566
26. Haisch A. (2001) Persönl. Mitteilung
27. Haisch A., Wanjura F. et al. (2004) Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolon-stimulated chondrocytes. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 261 (4): 216-224
28. Hammer C., Bujia J. (1992) Immunologie vitaler und konservierter Transplantate, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol. Suppl.* 1: 3-26.
29. Hashem F.K., Al Homsy M., Mahasin Z.Z., Gammas M.A. (Dec 2001) Laryngotracheoplasty using the Medpor implant: An animal model. *J Otolaryngol* 30 (6): 334-339
30. Heinegard D., Oldberg A. (1989) Structure and Biology of Cartilage and Bone Matrix Noncollagenous Macromolecules. *FASEB J* 3: 2042-2051
31. Henkel K.O., Gerber T., Dorfling P., Hartel J., Jonas L., Gundlach K.K., Bienengräber V. (2002) Stimulating regeration of bone defects by implantation of bioceramics and autologous osteoblast transplantation, *Mund Kiefer Gesichtschir.* 6: 59-65

32. Herberhold C., Stein M., Bierhoff E., Kost S. (1999) Trachealrekonstruktion mit konserviertem trachealem Homograft – Neue Aspekte. *Laryngo Rhino Otol* 78: 54-56
33. Herzog M., Sader R., Zeilhofer H.F., Horch H. H., Schonfeld B. (1994) Functional and esthetic results after reconstruction of orbita walls, *Fortschr. Kiefer Gesichtschir.* 39: 56-58
34. Iseri M., Ustundag E., Yayla B., Kaur A. (2006) Laryngeal reconstruction with porous high-density polyethylene. *Otolaryngol Head Neck Surg.* Jul 135 (1): 36-39
35. Ishizaki Y., Burne J.F., Raff M.C. (1994) Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture. *J Cell Biol.* Aug; 126 (4): 1069-1077
36. Junqueira L.C., Carneiro J.: Knorpel. In: *Histologie*, Junqueira LC, Carneiro J, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage (1991): 180-189
37. Juraha L.Z. (1992) Experience with alternative material for nasal augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 16: 133-140
38. Kastenbauer E. (1983) Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich. *HNO* 31: 371-380
39. Klawitter J.J., Bagwell J.G., Sauer B.W., Weinstein A.M. (1976) An evaluation of bone ingrowth into porous high density polyethylene. *J. Biomed Mater Res* 10: 311
40. Klee D., Höcker H. (1/1999) Optimierung der Bioverträglichkeit von Kunststoffimplantaten. *Spektrum der Wissenschaft. Dossier, Perspektiven in der Medizintechnik*
41. Knoch M.v., Buchhorn G., Knoch F.v., Köster G., Willert H.-G. (2001) Intracellular measurement of polyethylene particles. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 121: 399-402
42. Kornberg A., Dietz O., Mau H., Pascher A., Stangl M., Scheele J., Hammer C. (1999) Impact of immunoabsorption on xenogenic extracorporeal pig liver perfusion: assessment of organ function during autologous reperfusion. *Xenotransplantation* 6: 187- 193
43. Kühnel W.: Knorpelgewebe. In: *Taschenatlas der Zytologie und Mikroskopischen Anatomie*. Kühnel W, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Auflage (1992): 116-121
44. Kuttenger J.J., Hardt N. (2001) Long-term results following reconstruction of craniofacial defects with titanium micro- mesh systems, *J Maxillofac Surg* 29: 75-81
45. Lahiji A., Sohrabi A. et al. (2000) Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 51(4): 586-595
46. Langman J.: Experimentelle Embryologie – Wachstum. In: *Medizinische Embryologie*, Langman J, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Auflage (1989): 407
47. Leonhardt H.: Binde- und Stützgewebe. In: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Leonhardt H, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Auflage (1990): 133-137

48. Löffler G.: Kohlenhydrate. In: Physiologische Chemie, Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage (1990): 881-899
49. Mantesanz R., Miranda B. (Hrsg.): Preliminary Data Report Organ Donation and Transplantation 1995. Madrid: Aula Medica Eds. 1995
50. Mauck R.L., Seyhan S.L. et al. (2002) Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann Biomed Eng* 30(8): 1046-1056
51. Menderes A., Baytekin C., Topcu A. et al. (2004) Craniofacial reconstruction with high density porous polyethylene implants. *J Craniofac Surg*. Sep 15 (5): 719-724
52. Meyer R. (1998) Diskussion um Xenotransplantation: Tierorgane als trojanische Pferde für Erreger. *Deutsches Ärzteblatt* (95): A-1895-1896
53. Milz S., Regner F., Putz R., Benjamin M. (2002) Expression of a wide range of extracellular matrix molecules in the tendon and trochlea of the human superior oblique muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 1330-1334
54. Nagata S. (1994) Modification of the stages in total reconstruction of the auricle: Part I-IV. *Plast Reconstr Surg* 93: 221-266
55. Nam S.B., Bae Y.C., Moon J.S., Kang Y.S. (2006 Mar) Analysis of the postoperative outcome in 405 cases of orbital fracture using 2 synthetic orbital implants. *Ann Plast. Surg.* 56 (3): 263-267
56. Naumann A., Aigner J., Staudenmaier R., Seemann M., Bruening R., Engelmeier K.H., Kadedge G., Pavesio A., Kastenbauer E., Berghaus A. (2003) Clinical aspects and strategy for biomaterial engineering of an auricle based on three-dimensional stereolithography. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*; Springer-Verlag: 1-18
57. Nehrer S., Breinan H.A., Ramappa A., Shortkroff S., Young G., Minas T., Sledge C.B., Yannas I.V., Spector M. (1997) Canine chondrocytes seeded in type I und type II collagen implants invested in vitro. *J Biomed Mater Res.* 38 (2): 95-104
58. Niechajev I. (1999 Nov-Dec) Porous polyethylene implants for nasal reconstruction: clinic and histologic studies. *Aesthetic Plast. Surg.* 23 (6): 395-402
59. Nixon A.J., Sams A.E. et al. (1993) Temporal matrix synthesis and histologic features of a chondrocyte-laden porous collagen cartilage analogue. *Am J Vet Res* 54 (2): 349-356
60. Nizegorodcew T., Gasparini G., Maccauro G., Todesca A., De Santis E. (1997) Massive osteolysis induced by high molecular weight polyethylene wed debris. *Int Orthop.* 21 (1): 14-18
61. Nunez Sanchez A., Reche Sainz J.A., Sanz Lopez A., Mateos Sanchez E., Garcia Lla G., San Miguel Fraile P., Fernandez Escamez C.S. (2001 Jan) Integration of orbitary polyethylene implants (MEDPOR). Histological study. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 76(1): 25-29
62. Ohara K., Nakamura K., Ohta E. (1994) Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting. *Plast Reconstr Surg* 93: 1030-1036

63. Ozturk S, Sengezer M, Coskun U, Zor F (2002 Nov-Dec) An unusual complication of a Medpor implant in nasal reconstruction. A case report. *Aesthetic Plast. Surg.* 26(6): 419-422
64. Ozturk S., MD, Sengezer M., MD, Isik S., Turegun M., Devici M, MD, Cil Y. (Nov 2005) Long-Term-Outcomes of Ultra-Thin-Porous-PE-Implants used for reconstruction of orbital floor defects. *The Journal of Craniofacial Surgery/ Vol. 16, No.6:* 973-977
65. Paige K.T., Cima L.G., Yaremchuk M.J., Schloo B.L., Vacanti J.P., Vacanti C.A. (1996) De novo cartilage generation using alginate-chondrocyte constructs. *Plastic and reconstructive surgery.* 01/02/199602/97 (1): 168-180
66. Pak M.W., Chan E.S., van Hasselt C. (1998) Late complications of nasal augmentation using silicone implants. *J Laryngol Otol* 112: 1074-1077
67. Papa H.D., Gerlach K.L., Schippers C.H. (1994) Ergebnisse der Unterkieferrekonstruktion mit autogenen freien Knochentransplantaten. *Fortschr. Kiefer Gesichtschir.* 39: 78-81
68. Park S.S. (2000) Reconstruction of nasal defects larger than 1,5 cm in diameter. *Laryngoscope* 110: 1241-1250
69. Perka C., Schultz O., Sittinger M., Zippel H. (2000) Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. *Der Orthopäde* 29: 112-119
70. Petrides P.E.: Binde- und Stützgewebe. In: *Physiologische Chemie*, Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage (1990): 881-899
71. Puelacher W.C., Kim S.W., Vacanti J.P., Schloo B., Mooney D., Vacanti C.A. (1994 Feb) Tissue engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 23(1): 49-53
72. Radin E.L., Burr D.B. (1984) Hypothesis: Joints can heal. *Semin Arthritis Rheum* 13: 293-302
73. Ramzi S., Cotran et al. "Grundlagen der allgemeinen Pathologie", "Das Erste" Urban und Fischer- Verlag (2001): 78-81
74. Raphael K.G., Marbach J.J., Wolford L.M., Keller S.E., Bartlett J.A. (1999) Self-repoted systemic, immune-mediated disorders in patients with and without proplast-teflon implants of the temporomandibular joint, *J Oral Maxillofac Surg* 57: 364-370
75. Rasp G., Staudenmaier R., Ledderose H., Kastenbauer E. (2000) Autologous rib cartilage harvesting: operative procedure and postoperative pain reduction. *Laryngorhinootologie* 79: 155- 159
76. Ratner B.D., Ph.D. (Dec 2001) Replacing and Renewing: Synthetic Materials. *Biomimetics and Tissue Engineering in Implant Dentistry.* *Journal of Dental Education*, Volume 65, No 12: 1340-1347
77. Reddi S.P., Stevens M.R., Kline S.N., Villanueva P. (1999) Hydroxyapatite cement in craniofacial trauma surgery: indications and early experience. *J Craniomaxillofac Trauma* 5: 7-12

78. Rettinger G. (1992) Autogene und allogene Knorpeltransplantate in der Kopf- Hals-Chirurgie (ohne Mittelohr und Trachea). Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl 1: 127-162
79. Romo T., III, M.D., F.A. C.S., Sonne J., M.D., Choe K.S., M.D., Sclafani A.P., M.D., F.A.C.S. (2003) Revision Rhinoplasty. Facial Plast. Surg. 19: 299-307
80. Röpke E., Schön I., Vogel J., Jamali J., Bloching M., Berghaus A. (2006) Screening von modifizierten Polyethylenoberflächen für das Tissue-Engineering von Chondrozyten. Laryngo-Rhino-Otol 85: 1-7
81. Rotter N., Bonassar L.J. et al. (2001) Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127 (10): 1248-1252
82. Rotter N., Halsch A., Bücheler M. (2005) Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. Eur Arch Otorhinolaryngol 262: 539-545
83. Saringer W., Nobauer-Huhmann I., Knosp E. (2002) Cranioplasty with Individual Carbon Fibre Reinforced Polymere (CFRP) Medical Grade Implants Based on CAD/CAM Technique. Acta Neurochir 144: 1193- 1203
84. Schaefer D.J., Klemm C., Zhang X.H., Stark G.B. (2000) Tissue engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel- und Knochenneubildung. Der Chirurg. Springer-Verlag: 1001-1008
85. Schoen I., Markwart A., Neumann K., Berghaus A., Roepke E. (2009) Cartilage replacement by usage of hybrid systems of autologous cells and polyethylene – an experimental study. J Mater Sci: Mater Med DOI 10.1007/10856-009-3775-4
86. Sevin C., Askar I., Saray A., Yormak E. (2000) Exposure of high-density porous polyethylene (Medpor®) used for contour restoration and treatment. British journal of Oral and Maxillofacial Surgery 38: 44-49
87. Sittlinger M., Perka C. et al. (1999) Joint cartilage regeneration by tissue engineering. Z Rheumatol 58 (3): 130-5
88. Smit H., Schoeppe W.: Organspende und Transplantation in Deutschland 1995. Neu Isenburg: Deutsche Stiftung Organtransplantation 1996
89. Sosna A., Radonsky T. Pokorny D., Veigl D., Horak Z., Jahoda D. (2003) Polyethylene Disease. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 70 (1): 6-16
90. Spector M., Flemming W.R., Sauer B.W. (1975) Early tissue infiltrate in porous polyethylene implant into bone: a scanning electron microscope study. J Biomed Mater Res 9: 537
91. Spector M., Flemming W.R., Kreutner A. (Jul 1976) Bone growth into porous high density polyethylene. J Biomed Mater Res. 10 (4): 595-603
92. Staudenmaier R., Grvers G., Kastenbauer E. (2001) Local reconstruction of particular auricular defects. Laryngorhinootologie 80: 655-661
93. Sundar Raj N., Fite D., Ledbetter S., Chakravart S., Hassel J.R. (1995) Perlecan is a Component of Cartilage Matrix and Promotes Chondrocyte Attachment. J Cell Science 108: 1663-2672

94. Tay A.G., Farhadi et al. (2004) Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng* 10 (5-6): 762-770
95. Temenoff J.S., Mikos A.G.: Review (2000) Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21: 431-440
96. Tsai Y.H., Chen C.W., Lai W.F., Tang J.R., Deng W.P., Yeh S.D., Chung A., Zuo C.S., Bowley J.F. (2009 Mar 19) Phenotypic changes in proliferation, differentiation and migration of chondrocytes: 3D in vitro models for joint wound healing. *Biomed Mater Res A*.
97. van Osch G.J., Mandl E.W. et al.(2002) Growth factors in cartilage tissue engineering. *Biorheology* 39 (1-2): 215-220
98. Vats A., Tolley N.S., Polak J.M. Gough J.E. (2003) Scaffold und Biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol* 28: 165-172
99. Veilleux N.H., Yannas I.V., Spector M. (2004 Jan-Feb) Effect of passage number and collagen type on the proliferative, biosynthetic and contractile activity of adult canine articular chondrocytes in type I and II collagen-glycosaminoglycan matrices in vitro. *Tissue Eng.* 10 (1-2): 119-127
100. Van Winterswijk P.J., MD1 and Nout E., MD2 (Oct. 2007) Tissue engineering and Wound healing: An overview of the past, present and future. *Wounds-ISSN: 1044-7946- Volume19, Issue 10: 277-284*
101. Von Donnersmarck G.H., Mühlbauer W., Höfter E., Hartinger A. (1995) Die Verwendung von Keratinozytenkulturen in der Schwerbrandverletztenbehandlung – bisherige Erfahrungen, Ausblicke zur weiteren Entwicklung. *Unfallchirurg* (98): 229-232
102. Waldmann S.D., Grynbas M.D., Pilliar R.M., Kandel R.A. (2003) The use of specific chondrocyte populations to modulate the properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res* 21: 132-138
103. Wiltfang J., Merten H.A., Schlegel K.A., Schultze-Mosgau S., Kloss F.R., Rupprecht S., Kessler P. (2002) Degradation characteristics of alpha- and beta-tricalcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res* 63: 115-121
104. Williams J.D., Romo T. 3rd, Sclafani A.P., Cho H. (1997 Jun) Porous high-density polyethylene implants in auricular reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123 (6): 578-583
105. Wise D.L.: Repair of Articular Cartilage Defects Using Biomaterials and Tissue Engineering Methods. *Biomaterials and Bioengineering Handbook*, (Bell TD, An YH, Friedman RJ), New York, Marcel Dekker, Inc. (2000): 659-670
106. Wustrow T.P., Kastenbauer E. (1991) Wie ich es mache: Zur Nomenklatur in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. *Laryngorhinootologie* 70: 387-388
107. Yang K.G., Saris D.B., Geuze R.E., Helm Y.J., Rijen M.H., Verbout A.J., Dhert W.J., Creemers L.B. (2006 Sep) Impact of expansion and redifferentiation conditions on chondrogenic capacity of cultured chondrocytes. *Tissue Eng.* 12 (9): 2435-2447

LITERATURVERZEICHNIS

108. Zeilhofer H.F., Sader R., Kliegis U., Neff A., Horch H.H. (1997) Accuracy of stereolithographic models for surgery planning. Biomed Tech Suppl 42: 349- 351
109. Zeilhofer H.F., Sader R., Fruh H.J., Neff A., Horch H.H. (1997) Possibilities and indications for carbon fibre reinforced synthetic materials for designing individual implants for reconstruction of the facial bones and skull. Biomed Tech Suppl 42: 361-362

Anhang

TABELLE 4: GIEMSA-FÄRBUNG

<u>Zellstruktur</u>	<u>Färbeverhalten</u>
Zytoplasma	blau
Zellkerne	blau
Knochen	schwarz (dunkelbraun)
Osteoid	braun
Erythrozyten	blassrosa
Thrombozyten/Lymphozyten	blau
Eosinophilen-Granula	rot

Reagenzienherstellung nach GIEMSA:

Giemsa-Lösung:

- Mischen von 6 ml gebrauchsfertiger Giemsa-Stammlösung mit 240 ml Aqua destillata

Färbeverfahren

- 2-4- μ m-Schnitte mit Aqua dest. versehen
- Kurz abtupfen und Farblösung Nr. 1 auftragen
- Technovitschnitt eine Stunde, Hartschnitt zwei Stunden in Lösung belassen
- Abspülen mit Leitungswasser
- Einstellen in angesäuertes Aqua bidest bis zum Farbumschlag ins Rötliche
- Einstellen in Rotisol (unvergällter Alkohol) bis zum Farbumschlag ins Bläuliche
- Einstellen in Isopropanol I für fünf Sekunden
- Einstellen in Isopropanol II für eine Minute
- Einstellen in Xylol I für eine Minute
- Einstellen in Xylol II für eine Minute
- Eindecken mit Entellan

TABELLE 5: MASSON-GOLDNER-FÄRBUNG

<u>Zellstruktur</u>	<u>Färbeverhalten</u>
Zytoplasma	ziegelrot
Osteoid	rot
Zellkerne	schwarzbraun
Knochen/Kollagen (Bindegewebe)	grün (blassgrün)
Muskelgewebe	orange-rot
Erythrozyten	orange-gelb

Reagenzienherstellung nach MASSON- GOLDNER:

- Masson I (gebrauchsfertig)
- Masson II (gebrauchsfertig)
- Masson III (gebrauchsfertig)
- 1%-ige Essigsäure
- Mischen von 10 ml 10%-iger Essigsäure mit Aqua destillata
- Weigerts Eisenlack (gebrauchsfertig)

Färbeverfahren

- Einlegen in Weigerts Eisenlack für 60 Minuten
- Spülen mit Aqua destillata für zehn Minuten
- Einstellen in Masson I für 45 Minuten
- Eintauchen in 1%-ige Essigsäure
- Einstellen in Masson II für acht Minuten
- Eintauchen in 1%-ige Essigsäure
- Einstellen in Masson III für 45 Minuten
- Eintauchen in 1%-ige Essigsäure
- Spülen mit Aqua destillata für eine Minute
- Einstellen in 96%-igen Ethanol für eine Minute
- Einstellen in 96%-igen Ethanol für eine Minute
- Einstellen in Rotisol
- Einstellen in Xylol I für eine Minute
- Einstellen in Xylol II für eine Minute
- Eindecken mit Entellan

TABELLE 6: HÄMATOXYLIN-EOSIN-(H.E.)-FÄRBUNG NACH EHRlich

<u>Zellstruktur</u>	<u>Färbeverhalten</u>
Zellkerne	blau
Zytoplasma	rot (blass)
Bindegewebe	blassrosa bis rot
Muskelgewebe	rot
Erythrozyten	rot-orange
Knorpel	blau

Färbetechnik nach HÄMATOXYLIN-EOSIN:

- Einstellen in Hämalau für drei Stunden
- Spülen mit Leitungswasser für 30 Minuten
- Einstellen in Eosin für eine Stunde
- Kurz abspülen mit Leitungswasser für ca. fünf Sekunden
- Entwässern für je fünf Sekunden in einer aufsteigenden 70-; 80-; 96%-igen Alkoholreihe
- Einstellen in Isopropanol I für fünf Sekunden
- Einstellen in Isopropanol II für eine Minute
- 3x Einstellen in Xylol I für fünf Minuten
- Eindecken mit Entellan

ANHANG

Tabelle 7

Direkter Vergleich der Bschichtungsgruppen besiedelt versus unbesiedelt über die Zeit nach Anzahl/Fläche Knorpel und Anzahl/Fläche FKRZ

Monat	Beschichtung	ID-nb	FKRZ-Anz-nb	FKRZ-Flä-nb	Chon-Anz-nb	Chon-Flä-nb	ID-b	FKRZ-Anz-b	FKRZ-Flä-b	Chon-Anz-b	Chon-Flä-b
1	Po_OO	Msk18li	65	58786	0	0	Msk18re	50	18776	4	182906
1	Po_OO	Msk49li	107	35694	0	0	Msk49re	44	17647	0	0
1	Po_OO	Msk81re	3	3906,00	0	0	Msk81li	19	13011	0	0
1	Po_OO	Msk83re	3	1962	0	0	Msk83li	3	1539	0	0
1	Po_OO	Msk86re	1	537	0	0	Msk86li	4	1415	0	0
1	Po_OOII	Msk7li	59	109123	0	0	Msk7re	101	86296	0	0
1	Po_OOII	Msk9li	144	120881	0	0	Msk9re	20	24513	0	0
1	Po_OOII	Msk14li	194	200331	0	0	Msk14re	78	35791	2	119809
1	Po_OOII	Msk15li	48	23488	0	0	Msk15re	38	24179	0	0
1	Po_OOII	Msk16re	55	74887	0	0	Msk16li	37	27954	0	0
1	Po4_03II	Msk82li	10	5358	0	0	Msk82re	5	5259	0	0
1	Po4_03II	Msk84li	7	5181	0	0	Msk84re	6	2141	5	173396,00
1	Po4_03II	Msk11li	75	834216	0	0	Msk11re	45	36398	1	21823
1	Po4_03II	Msk85li	8	2652	0	0	Msk85re	3	2864	0	0
1	Po4_03II	Msk87re	4	2696	0	0	Msk87li	3	956	0	0
1	Po4_03II	Msk90re	2	672	0	0	Msk90li	5	2495	0	0
1	Po4_03II	Msk92re	1	809	0	0	Msk92li	1	346	0	0
6	Po_OO	Msk47li	87	38825	0	0	Msk47re	65	34934	1	35739
6	Po_OO	msk48li	28	9777	0		Msk48re	12	5676	11	312002
6	Po_OO	Msk63re	48	27028	0	0	Msk63li	96	46669	1	28598
6	Po_OO	Msk64re	21	4789	0	0	Msk64li	54	19910	2	65262
6	Po_OO	Msk65re	60	29625	0	0	Msk65li	74	33361	0	0
6	Po_OO	Msk70re	59	21524	0	0	Msk70li	38	30774	1	6506
6	Po_OOII	Msk27li(b)	94	79392	1	37024	Msk27re(b)	104	59640	0	0
6	Po_OOII	Msk52li	36	11204	0	0	Msk52re	19	5406	3	34972

ANHANG

6	Po_OOII	Msk53li(a)	125	92889	0	0	Msk53re(a)	98	60181	0	0
6	Po_OOII	Msk66re	50	148627	0	0	Msk66li	28	8698	0	0
6	Po_OOII	Msk67re	27	6730	0	0	Msk67li	53	21857	1	43862
6	Po_OOII	Msk68re	30	8608	0	0	Msk68li	27	5814	1	71400
6	Po4_O3II	Msk40li	86	22557	0	0	Msk40re(B)	41	11245	4	181103
6	Po4_O3II	Msk41li(bt)	63	70209	0	0	Msk41re	60	66055	0	0
6	Po4_O3II	Msk42li(a)	85	52312	0	0	Msk42re	46	45635	2	64008
6	Po4_O3II	Msk55li	8	1925	0	0	Msk55re	52	30323	0	0
6	Po4_O3II	Msk57li	76	18967	0	0	Msk57re	13	3952	0	0
6	Po4_O3II	Msk58li	61	31484	0	0	Msk58re	34	17387	0	0
6	Po4_O3II	Msk61li	66	39679	0	0	Msk61re	35	43338	0	0
12	Po_OO	Msk19li	68	101964	0	0	Msk19re	16	24709	10	400024
12	Po_OO	Msk20li	118	143555	0	0	Msk20re	100	87412	1	43341
12	Po_OO	Msk31li	85	59304	1	41277	Msk31re	43	27981	1	85838
12	Po_OO	Msk37li	42	18258	0	0	Msk37re	36	9895	0	0
12	Po_OO	Msk43li	41	17480	0	0	Msk43re	35	7337	5	138238
12	Po_OO	Msk44li	46	16070	0	0	Msk44re	35	11219	8	236119
12	Po_OOII	Msk25re	92	23777	1	41697	Msk25li	60	26363	3	120148
12	Po_OOII	Msk51li	74	22488	0	0	Msk51re	15	1720	0	0
12	Po_OOII	Msk33li	187	101352	0	0	Msk33re	129	54369	0	0
12	Po_OOII	Msk35li	114	60887	1	108244	Msk35re	96	55514	1	97157
12	Po4_03II	Msk22re	57	39113	0	0	Msk22li	24	16398	4	322917
12	Po4_03II	Msk23re	49	63826	3	446147	Msk23li	136	139545	2	70599
12	Po4_03II	Msk24li	158	68417	0	0	Msk24re	100	77097	0	0
12	Po4_03II	Msk29li	95	117415	0	0	Msk29re	83	44964	0	0
12	Po4_03II	Msk30li	109	33750	0	0	Msk30re	60	23961	2	11231
12	Po4_03II	Msk36li	62	31101	0	0	Msk36re	17	9921	2	16208
12	Po4_03II	Msk38li	21	4027	0	0	Msk38re	24	7410	0	0
Monat	Beschichtung	ID-nb	FKRZ-Anz-nb	FKRZ-Flä-nb	Chon-Anz-nb	Chon-Flä-nb	ID-b	FKRZ-Anz-b	FKRZ_Flä-b	ChonAnz-b	ChonFlä-b

ANHANG

ID-nb – Meerschweinchennummer unbesiedelt; FKRZ-Anz-nb – Anzahl Fremdkörperriesenzellen bei unbesiedelten Proben; FKRZ-Flä-nb – Fläche Fremdkörperriesenzellen bei unbesiedelten Proben; Chon-Anz-nb – Anzahl Chondrozyten bei unbesiedelten Proben; Chon-Flä-nb – Fläche Chondrozyten bei unbesiedelten Proben; ID-b – Meerschweinchennummer besiedelt; FKRZ-Anz-b – Anzahl Fremdkörperriesenzellen bei besiedelten Proben; FKRZ-Flä-b – Fläche Fremdkörperriesenzellen bei besiedelten Proben; Chon-Anz-b – Anzahl Chondrozyten bei besiedelten Proben; Chon-Flä-b – Fläche Chondrozyten bei besiedelten Proben; Po_OO: Polyethylen; Po_OOII: Polyethylen mit Kollagen II beschichtet; Po4_O3II: Polyethylen Sauerstoff- Plasma behandelt und Kollagen-II-gekoppelt

Tabelle 8

Auswertung der Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) über einen Score																		
Monat	Probe	Oberfläche	ohne Zellen	keine	wenig	mittel	viel				Zellen	keine	wenig	mittel	viel			
				1	2	3	4	Summe	MW	STABWN		1	2	3	4	Summe	MW	STABWN
1	Po_OO	keine	Msk18li	2		3		5	1,67		Msk18re	1	2	3		6	2,00	
1	Po_OO	keine	Msk49li		2	6	4	12	4,00		Msk49re	2		6		8	2,67	
1	Po_OO	keine	Msk80re		2			2	2,00		Msk80li		2			2	2,00	
1	Po_OO	keine	Msk81re		2	3	4	9	3,00		Msk81li		2		8	10	3,33	
1	Po_OO	keine	Msk83re		2	6		8	2,67		Msk83li		4	3		7	2,33	
1	Po_OO	keine	Msk86re	1	2			3	1,50		Msk86li		6			6	3,00	
								MW	2,47	0,86						MW Q	2,56	0,50
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk7li	1		6	4	11	2,75		Msk7re			6	8	14	3,50	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk9li		4	3		7	3,50		Msk9re		2	6		8	4,00	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk14li			6	4	10	3,33		Msk14re		6			6	2,00	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk15li	1	2	3		6	2,00		Msk15re	1	4			5	1,67	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk16re		2	3		5	2,50		Msk16li	2	2			4	2,00	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk82li		4	3		7	2,33		Msk82re			6	4	10	3,33	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk84li		4	3		7	2,33		Msk84re			6	4	10	3,33	
									2,68	0,51							2,83	0,85
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk11li			12		12	3,00		Msk11re	1	6			7	1,75	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk12li			2		2	2,00		Msk12re			3		3	3,00	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk85li		4	3		7	3,50		Msk85re	2		3		5	2,50	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk87re			6	4	10	3,33		Msk87li		2	3	4	9	3,00	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk90re	2	2			4	2,00		Msk90li			4	3	7	3,50	

ANHANG

		Plasma																
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk92re		2	6	8	2,67		Msk92li			6		6	2,00		
								2,75	0,59							2,63	0,61	
6	Po_OO	keine	Msk47li		6		6	3,00		Msk47re	1	4			5	2,50		
6	Po_OO	keine	msk48li	2	4		6	2,00		Msk48re	1	6			7	2,33		
6	Po_OO	keine	Msk63re	1		6	4	11	2,75	Msk63li		4	3	4	11	2,75		
6	Po_OO	keine	Msk64re	1	4		4	9	2,25	Msk64li			6	3	9	2,25		
6	Po_OO	keine	Msk65re		4	3	4	11	3,67	Msk65li		2	6	4	12	4,00		
6	Po_OO	keine	Msk70re		2	9		11	2,75	Msk70li		6			6	1,50		
								2,74	0,49							2,56	0,70	
6	Po_OOII	Kollagen 2	Msk27li(b)		4	3		7	2,33	Msk27re(b)			3		3	1,00		
6	Po_OOII	Kollagen 2	Msk52li		6	3		9	3,00	Msk52re	2	4			6	2,00		
6	Po_OOII	Kollagen 2	Msk53li(a)			2	8	10	3,33	Msk53re(a)		2	6		8	2,67		
6	Po_OOII	Kollagen 2	Msk66re				12	12	3,00	Msk66li	1	4			5	1,25		
6	Po_OOII	Kollagen 2	Msk67re		4	6		10	2,50	Msk67li		4	6		10	2,50		
6	Po_OOII	Kollagen 2	Msk68re	1	4	3		8	2,00	Msk68li	3	2			5	1,25		
								2,69	0,46							1,78	0,65	
6	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk40li		4	3		7	2,33	Msk40re(B)	1	4			5	1,67		
6	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk41li(bt)				12	12	3,00	Msk41re			3	8	11	2,75		
6	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk42li(a)		2	3	8	13	3,25	Msk42re	1	4	3		8	2,00		
6	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk55li	2		6		8	2,67	Msk55re	1	2		4	7	2,33		
6	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk57li		4	6		10	3,33	Msk57re	1	4	3		8	2,67		
6	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk58li			9	4	13	3,25	Msk58re	1	2	3		6	1,50		
6	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk61li		2	3	4	9	3,00	Msk61re			3	12	15	5,00		
								2,98	0,34							2,56	1,09	
12	Po_OO	keine	Msk19li				12	12	3,00	Msk19re		2	6		8	2,00		
12	Po_OO	keine	Msk20li			3	8	11	3,67	Msk20re	1	2	3		6	2,00		
12	Po_OO	keine	Msk31li		4	3		7	2,33	Msk31re		6			6	2,00		

ANHANG

12	Po OO	keine	Msk37li	1	4			5	1,67		Msk37re		6			6	2,00	
12	Po OO	keine	Msk43li		8			8	2,00		Msk43re	2	4			6	1,50	
12	Po OO	keine	Msk44li	1	4	3		8	2,00		Msk44re	2	4			6	1,50	
									2,44	0,68							1,83	0,24
12	Po OOII	Kollagen 2	Msk25re			9	4	13	3,25		Msk25li	2	4			6	1,50	
12	Po OOII	Kollagen 2	Msk51li		2	6	4	12	3,00		Msk51re	3	2			5	1,25	
12	Po OOII	Kollagen 2	Msk33li	2			4	6	3,00		Msk33re		4	3		7	3,50	
12	Po OOII	Kollagen 2	Msk35li	1		3		4	2,00		Msk35re	2		3		5	2,50	
									2,81	0,48							2,19	0,89
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk22re	2	2	3		7	2,33		Msk22li	3	2			5	1,67	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk23re	1	4			5	1,67		Msk23li		2	3		5	1,67	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk24li		2		8	10	3,33		Msk24re		2		8	10	3,33	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk29li		2	3	4	9	3,00		Msk29re			3	8	11	3,67	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk30li	1	2	3		6	2,00		Msk30re	1	4			5	1,67	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk36li				9	9	3,00		Msk36re	1	4			5	1,67	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk38li	1	2			3	1,50		Msk38re	2				2	1,00	
									2,38	0,67							2,00	0,92
Monat	Probe	Oberfläche	ohne Zellen	keine	wenig	mittel	viel				Zellen	keine	wenig	mittel	viel			
				1	2	3	4	Summe	MW	STABWN		1	2	3	4	Summe	MW	STABWN

Po_OO: Polyethylen; Po_OOII: Polyethylen mit Kollagen II beschichtet; Po4_O3II: Polyethylen Sauerstoff- Plasma behandelt und Kollagen-II-gekoppelt
 MW – Mittelwert; STABWN – Standardabweichung; Msk – Meerschweinchennummer; re – rechts; li – links

ANHANG

Tabelle 9

Auswertung der Knorpelneubildung über einen Score

Monat	Probe	Oberfläche	ohne Zellen	keine	wenig	mittel	viel	Summe	MW	STABWN	Zellen	keine	wenig	mittel	viel	Summe	MW	STABWN
1	Po_OO	keine	Msk18li	2				2	1		Msk18re	1		3		4	2,00	
1	Po_OO	keine	Msk49li	2				2	1		Msk49re	1	2			3	1,50	
			MSK78li	1				1	1		MSK78re	1				1	1,00	
1	Po_OO	keine	Msk80re	1				1	1		Msk80li	1				1	1,00	
1	Po_OO	keine	Msk81re	1		3		4	2		Msk81li	1		2		3	1,50	
1	Po_OO	keine	Msk83re	1		3		4	2		Msk83li	2				2	1,00	
1	Po_OO	keine	Msk86re	1		3		4	2		Msk86li	2				2	1,00	
									1,43	0,49							1,29	0,36
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk7li	3				3	1		Msk7re	2	2			4	1,33	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk9li	2			4	6	2		Msk9re	2	2			4	1,33	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk14li	1	2			3	1,5		Msk14re	2	2			4	2,00	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk15li	2				2	1		Msk15re	1		3		4	2,00	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk16re	2				2	1		Msk16li	2				2	1,00	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk82li	2				2	1		Msk82re	1		3		4	2,00	
1	Po_OOII	Kollagen 2	Msk84li	2				2	1		Msk84re	1			4	5	2,50	
									1,21	0,36							1,74	0,49
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk11li		2		4	6	3		Msk11re	1		3		4	2,00	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk12li		2			2	2		Msk12re			3		3	3,00	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk85li	1		3		4	2		Msk85re	1			4	5	2,50	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk87re	1		3		4	2		Msk87li	1		3		4	2,00	
1	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk90re	2				2	1		Msk90li	1		3		4	2,00	
1	Po4_03II	Kollagen 2	Msk92re	1		3		4	2		Msk92li	1	2			3	1,50	

ANHANG

12	Po_OO	keine	Msk31li	1	2			3	1,5		Msk31re			6		6	3,00	
12	Po_OO	keine	Msk37li	2				2	1		Msk37re	2				2	1,00	
12	Po_OO	keine	Msk43li	1	2			3	1,5		Msk43re			3	4	7	3,50	
12	Po_OO	keine	Msk44li	1	2			3	1,5		Msk44re				8	8	4,00	
								1,33	0,24								2,83	1,18
12	Po_OOII	Kollagen 2	Msk25re	1	2			3	1,5		Msk25li	1		3		4	2,00	
12	Po_OOII	Kollagen 2	Msk51li			6		6	3		Msk51re		2	3		5	2,50	
12	Po_OOII	Kollagen 2	Msk33li		4			4	2		Msk33re	1	2			3	1,50	
12	Po_OOII	Kollagen 2	Msk35li	1	2			3	1,5		Msk35re			3		3	1,50	
								2,00	0,61								1,88	0,41
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk22re	1	2			3	1,5		Msk22li			6		6	3,00	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk23re			3	4	7	3,5		Msk23li		4			4	2,00	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk24li	1	2			3	1,5		Msk24re	1	2			3	1,50	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk29li	1	2			3	1,5		Msk29re	2				2	1,00	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk30li	2				2	1		Msk30re	1	2			3	1,50	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk36li	1	2			3	1,5		Msk36re	2				2	1,00	
12	Po4_03II	Kollagen 2 mit Plasma	Msk38li		2			2	1		Msk38re		4			4	2,00	
								1,64	0,79								1,71	0,65
Monat	Probe		ohne Zellen	keine	wenig	mittel	viel				Zellen	keine	wenig	mittel	viel			
								Summe	MW	STABWN						Summe	MW	STABWN

Po_OO: Polyethylen; Po_OOII: Polyethylen mit Kollagen II beschichtet; Po4_03II: Polyethylen Sauerstoff- Plasma behandelt und Kollagen-II-gekoppelt
 MW – Mittelwert; STABWN – Standardabweichung; Msk – Meerschweinchennummer; re – rechts; li – links

ANHANG

TABELLE 10 T-TEST BEI GEPAARTEN STICHPROBEN (ANZAHL FREMDKÖRPERRIESENZELLEN)

	Anzahl FKRZ nicht besiedelt		Anzahl FKRZ besiedelt		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
	1 Monat	46,24	57,22	27,18			
6 Monate	58,42	29,56	49,95	27,66	1,21	18	.243
12 Monate	83,41	43,85	59,35	40,37	2,81	16	.013

TABELLE 11 T-TEST BEI GEPAARTEN STICHPROBEN (FLÄCHE FREMDKÖRPERRIESENZELLEN)

	Fläche FKRZ nicht besiedelt		Fläche FKRZ besiedelt		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
	1 Monat	87128,18	200701,336	17740,00			
6 Monate	37692,16	37323,07	28992,37	20275,00	1,08	18	.293
12 Monate	54281,41	40752,77	36812,65	36609,99	2,04	16	.058

TABELLE 12 POST-HOC-TEST LSD (VERGLEICH DER OBERFLÄCHENMODIFIKATIONEN, EIN MONAT)

Oberflächenmodifikation		Mittlere Differenz (I-J)	Standard- fehler	p-Wert	Konfidenzintervall	
I	J				- 95%	+ 95%
Keine	Kollagen 2	- 57417,00	69101,901	,420	- 205625,84	90791,84
	Kollagen 2 & Plasma	- 49104,34	63975,929	,456	- 185319,06	88,110,38
Kollagen 2	Keine	57417,00	69101,901	,420	- 90791,84	205625,84
	Kollagen 2 & Plasma	8312,66	63975,929	,898	- 128902,06	145527,38
Kollagen 2 & Plasma	Keine	49104,34	63975,929	,456	- 88110,38	186319,06
	Kollagen 2	- 8312,66	63975,929	,898	- 145527,38	128902,06

ANHANG

TABELLE 13 POST-HOC-TEST LSD (VERGLEICH DER OBERFLÄCHENMODIFIKATIONEN, SECHS MONATE)

Oberflächenmodifikation		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	p- Wert	Konfidenzintervall	
					- 95%	+ 95%
I	J					
Keine	Kollagen 2	- 17179,50	14310,989	,247	- 47517,44	13158,44
	Kollagen 2 & Plasma	- 7263,86	13790,414	,606	- 36498,23	21970,51
Kollagen 2	Keine	17179,50	14310,989	,247	-13158,44	47517,44
	Kollagen 2 & Plasma	9915,64	13790,414	,482	-19318,73	39150,01
Kollagen 2 & Plasma	Keine	7263,86	13790,414	,606	-21970,51	36498,23
	Kollagen 2	- 9915,64	13790,414	,482	- 39150,01	19318,73

TABELLE 14 POST-HOC-TEST LSD (VERGLEICH DER OBERFLÄCHENMODIFIKATIONEN, ZWÖLF MONATE)

Oberflächenmodifikation		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	p- Wert	Konfidenzintervall	
					- 95%	+ 95%
I	J					
Keine	Kollagen 2	456,58	23739,592	,985	- 50459,78	51372,95
	Kollagen 2 & Plasma	- 4587,88	20460,955	,826	- 48472,27	39296,50
Kollagen 2	Keine	- 456,58	23739,592	,985	-51372,95	50459,78
	Kollagen 2 & Plasma	- 5044,46	23051,342	,830	-54484,67	44395,75
Kollagen 2 & Plasma	Keine	4587,88	20460,955	,826	-39296,50	48472,27
	Kollagen 2	5044,46	23051,342	,830	- 44395,75	54484,67

TABELLE 15 (A) ANOVA ANZAHL FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Knorpelzellen	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
besiedelt	22,139	2,951	16,274	28,004	53
unbesiedelt	29,274	2,951	23,409	35,138	53

TABELLE 15 (B) ANOVA ANZAHL FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zellen	1	2,922	,091

TABELLE 16 (A) ANOVA FLÄCHE FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Knorpelzellen	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
besiedelt	,016	,004	,008	,024	53
unbesiedelt	,020	,004	,012	,012	53

TABELLE 16 (B) ANOVA FLÄCHE FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zellen	1	,421	,518

TABELLE 17 (A) ANOVA ANZAHL FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Oberflächenmodifikation	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
Keine	24,034	3,639	16,803	31,266	34
Kollagen 2	25,404	3,727	17,998	32,811	34
Kollagen 2 & Plasma	27,680	3,473	20,779	34,581	38

TABELLE 17 (B) ANOVA ANZAHL FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Oberflächenmodifikation	2	,270	,764

ANHANG

TABELLE 18 (A) ANOVA ANZAHL FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Zellen	Monat	Oberfläche	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95 %	+95 %
besiedelt	1	Keine	11,604	9,454	-7,184	30,391
		Kollagen 2	13,969	7,990	-1,910	29,847
		Kollagen 2 & Plasma	3,038	9,454	-15,750	21,826
		Plasma				
	6	Keine	30,622	8,630	13,471	47,772
		Kollagen 2	24,603	8,630	7,453	41,754
		Kollagen 2 & Plasma	39,487	7,990	23,609	55,365
		Plasma				
	12	Keine	12,887	8,630	-4,264	30,037
		Kollagen 2	22,620	10,570	1,615	43,625
		Kollagen 2 & Plasma	40,423	7,990	24,544	56,301
		Plasma				
unbesiedelt	1	Keine	21,040	9,454	2,253	39,828
		Kollagen 2	21,137	7,990	5,259	37,015
		Kollagen 2 & Plasma	2,556	9,454	-16,232	21,344
		Plasma				
	6	Keine	39,932	8,630	22,781	57,082
		Kollagen 2	30,855	8,630	13,704	48,006
		Kollagen 2 & Plasma	31,914	7,990	16,036	47,793
		Plasma				
	12	Keine	28,122	8,630	10,971	45,272
		Kollagen 2	39,243	10,570	18,237	60,248
		Kollagen 2 & Plasma	48,664	7,990	32,786	64,543
		Plasma				

TABELLE 18 (B) ANOVA ANZAHL FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zellen * Monat * Oberfläche	4	,051	,995

ANHANG

TABELLE 19 (A) ANOVA FLÄCHE FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Zellen	Monat	Oberfläche	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%
besiedelt	1	Keine	,004	,012	-,021	,028
		Kollagen 2	,011	,010	-,009	,032
		Kollagen 2 & Plasma	,002	,012	-,022	,026
	6	Keine	,015	,011	-,007	,037
		Kollagen 2	,010	,011	-,012	,032
		Kollagen 2 & Plasma	,033	,010	,012	,054
	12	Keine	,028	,011	,006	,051
		Kollagen 2	,010	,014	-,017	,037
		Kollagen 2 & Plasma	,032	,010	,011	,052
unbesiedelt	1	Keine	,011	,012	-,014	,035
		Kollagen 2	,021	,010	,001	,042
		Kollagen 2 & Plasma	,002	,012	-,022	,026
	6	Keine	,018	,011	-,004	,041
		Kollagen 2	,033	,011	,011	,056
		Kollagen 2 & Plasma	,021	,010	,001	,042
	12	Keine	,023	,011	,001	,046
		Kollagen 2	,015	,014	-,012	,042
		Kollagen 2 & Plasma	,031	,010	,011	,052

TABELLE 19 (B) ANOVA FLÄCHE FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zellen * Monat * Oberfläche	4	,289	,884

ANHANG

TABELLE 20 (A) ANOVA SCORE MITTELWERT FKRZ

Zellen	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
besiedelt	1,297	,100	1,100	1,495	53
unbesiedelt	1,630	,100	1,432	1,827	53

TABELLE 20 (B) ANOVA SCORE MITTELWERT FKRZ

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zellen	1	5,570	,020

TABELLE 21 (A) ANOVA SCORE MITTELWERT FKRZ

Oberflächenmodifikation	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95 %	+95 %	<i>N</i>
Keine	1,398	,121	1,157	1,640	34
Kollagen 2	1,422	,128	1,167	1,677	34
Kollagen 2 & Plasma	1,570	,116	1,340	1,799	38

TABELLE 21 (B) ANOVA SCORE MITTELWERT FKRZ

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Oberflächenmodifikation	2	,614	,543

TABELLE 22 (A) ANOVA FLÄCHE KNORPEL

Knorpelzellen	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
besiedelt	53625,289	11014,606	31736,074	75514,504	53
unbesiedelt	12696,745	11014,606	-9192,470	34585,960	53

ANHANG

TABELLE 22 (B) ANOVA FLÄCHE KNORPEL

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zellen	1	26,904	,010

TABELLE 23 (A) ANOVA FLÄCHE KNORPEL

Monat	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
1	13805,371	13702,061	-13424,595	41035,338	34
6	23485,004	12833,156	-2018,196	48988,204	38
12	62192,675	13910,809	34547,864	89837,485	34

TABELLE 23 (B) ANOVA FLÄCHE KNORPEL

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Monat	2	3,456	,036

TABELLE 23 (C) POST-HOC-TEST TUKEY-HSD (VERGLEICH DER MONATE, FLÄCHE KNORPEL)

Monat		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	p-Wert
I	J			
1	6	-8525,30	18625,755	,891
	12	-49448,56	19136,165	,030
6	1	8525,30	18625,775	,891
	12	-40923,26	18625,755	,077
12	1	49448,56	19136,165	,030
	6	40923,26	18625,775	,077

TABELLE 24 (A) ANOVA FLÄCHE KNORPEL

Oberflächenmodifikation	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
Keine	44789,756	13581,335	17799,705	71779,806	34
Kollagen 2	27484,599	13910,809	-160,211	55129,409	34
Kollagen 2 & Plasma	27208,695	12960,852	1451,726	52965,665	38

ANHANG

TABELLE 24 (B) ANOVA FLÄCHE KNORPEL

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Oberflächenmodifikation	2	,555	,576

TABELLE 25 (A) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Knorpelzellen	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
besiedelt	1,137	,106	,927	1,348	53
unbesiedelt	,532	,106	,321	,742	53

TABELLE 25 (B) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zellen	1	16,356	,000

TABELLE 26 (A) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Monat	Zellen	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%
1	besiedelt	,750	,178	,396	1,104
	unbesiedelt	,571	,178	,217	,926
6	besiedelt	1,425	,178	1,070	1,779
	unbesiedelt	,341	,178	-,013	,695
12	besiedelt	1,238	,193	,854	1,622
	unbesiedelt	,683	,193	,299	1,066

ANHANG

TABELLE 26 (B) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Monat * Zellen	2	3,247	,043

TABELLE 27 (A) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Monat	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
1	,66	,119	,126	,410	34
6	,883	,126	,633	1,133	38
12	,960	,137	,689	1,232	34

TABELLE 27 (B) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Monat	2	1,445	,241

TABELLE 27 (C) POST-HOC-TEST TUKEY-HSD (VERGLEICH DER MONATE, SCORE MITTELWERT KNORPEL)

Monat		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	p-Wert
1	J			
	6	-,2326	,17784	,394
6	12	-,2922	,18299	,252
	1	,2326	,1778	,394
12	12	-,0596	,18299	,943
	1	,2922	,18299	,252
12	6	,0596	,18299	,943

TABELLE 28 (A) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Oberflächenmodifikation	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%	<i>N</i>
Keine	,861	,129	,605	1,118	34
Kollagen 2	,758	,137	,486	1,029	34
Kollagen 2 & Plasma	,885	,123	,641	1,129	38

TABELLE 28 (B) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Oberflächenmodifikation	2	,261	,771

TABELLE 28 (C) POST-HOC-TEST TUKEY-HSD (VERGLEICH DER OBERFLÄCHENMODIFIKATIONEN, SCORE MITTELWERT KNORPEL)

Oberflächenmodifikation		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	p-Wert
I	J			
Keine	Kollagen 2	,1505	,18538	,697
	Kollagen 2 & Plasma	-,0139	,17808	,697
Kollagen 2	Keine	-,1505	,18538	,697
	Kollagen 2 & Plasma	-,1644	,18082	,636
Kollagen 2 & Plasma	Keine	,0139	,17808	,997
	Kollagen 2	,1644	,18082	,636

ANHANG

TABELLE 29 (A) ANOVA SCORE MITTELWERT KNORPEL

Monat	Oberfläche	<i>M</i>	<i>SF</i>	-95%	+95%
1	Keine	,458	,224	,014	,903
	Kollagen 2	,440	,207	,029	,851
	Kollagen 2 & Plasma	1,083	,224	,639	1,528
6	Keine	,958	,224	,514	1,403
	Kollagen 2	,833	,224	,389	1,278
	Kollagen 2 & Plasma	,857	,207	,446	1,269
12	Keine	1,167	,224	,722	1,611
	Kollagen 2	1,000	,274	,456	1,544
	Kollagen 2 & Plasma	,714	,207	,303	1,126

TABELLE 29 (B) ANOVA SCORE MITTELWERT FREMDKÖRPERRIESENZELLEN

Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Monat * Oberfläche	4	1,822	,131

Thesen

1. Knorpelgewebe hat eine geringe Regenerationsfähigkeit.
2. Autologes Gewebe ist bis heute der Goldstandard des Knorpelersatzes nach Verletzungen.
3. Polyethylen ist ein gut verträgliches, nicht resorbierbares Knorpelersatzmaterial.
4. Polyethylenimplantate rufen eine Immunantwort hervor.
5. Die Modifikation der Oberfläche von Polyethylen ermöglicht eine bessere Integration des Implantates in das umgebende Gewebe
6. Durch die Besiedelung der Polyethylen-Implantate mit autologen Knorpelzellen vor der Implantation können Immunreaktionen des Körpers vermindert werden
7. Die Besiedelung der Polyethylen-Implantate mit autologen Knorpelzellen vor Implantation ist für das Knorpelwachstum, bzw. die Regeneration von Knorpel von Vorteil
8. Die Regeneration von Knorpel erstreckt sich über einen langen Zeitraum
9. Die poröse Struktur der Polyethylen-Implantate spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf Zelladhäsion und Zelleinwuchs

CURRICULUM VITAE

Studium

10/2000-12/2006 Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale)

Praktika

Praktisches Jahr I. Tertial: Innere Medizin im Uniklinikum Halle-Kröllwitz (Nephrologie)
II. Tertial: Pädiatrie im Uniklinikum Halle-Kröllwitz
III. Tertial: Chirurgie im Bergmannstrost Halle (Unfallchirurgie)

Schulbildung

1992-1998 Gymnasium mit Abitur am Torgymnasium Halle

Sprachkenntnisse

Muttersprache Deutsch

Englisch schriftlich/mündlich: gut (einschließlich Fachenglisch
im Bereich der Medizin)

Latein Grundkenntnisse

Französisch Grundkenntnisse

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

1 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Zuhilfenahme unzulässiger Hilfsmittel angefertigt zu haben. Wörtliche oder dem Sinne nach übernommene Ausführungen sind so gekennzeichnet, dass Missverständnisse über die geistige Urheberschaft ausgeschlossen sind.

Dortmund, den 09.Dezember 2010

Annekatriin Markwart

DANKSAGUNG

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Marc Bloching gilt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas, Frau PD. Dr. med. K. Hoffmann für die Fortsetzung der Betreuung sowie die freundliche und jederzeit gewährte Unterstützung. Frau Dr. Ilona Schön danke ich für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und fortwährende Motivation. Des Weiteren bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Röpke für die durchgeführten operativen Eingriffe und bei Frau Wolfsteller und Frau Vogtländer für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich immer moralisch und finanziell unterstützte, um meine Ziele zu verwirklichen. Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meinem Bruder und meiner lieben Freundin und Kollegin Frau Dipl. psych. Katharina Domann, geb. Hentrich für ihre beratende Tätigkeit vor allem in strukturellen Fragen.