

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Die 10 Hinterläufe stammen von Schweinekadavern der AG um Dr. med. vet. Meissler, Versuchstierkundlicher Dienst, Tierexperimentelle Einrichtung der Charite, CVK.

Bei den Schweinen handelt es sich um 10 Zuchtschweine der Rasse „Hybride der Deutschen Landrasse“ aus der Landwirtschaft.

(Lieferant: Fa. Landwirtschaft Sommerfeld, Stückener Str. 14, 14554 Seddiner See)

Bei 8 Tieren handelt es sich um Kontrolltiere der Arbeitsgemeinschaft, die keiner Behandlung unterzogen wurden.

2 Tiere erhielten eine Gefäßprothese im Bereich der A. femoralis.

Alle Tiere wurden im Rahmen der Experimente der AG um Dr. med. vet. Meissler in einer tiefen Inhalationsnarkose (Isofluran-Lachgasgemisch) durch Ausbluten getötet.

Alle Schweinekadaver wiegen ca. 60 kg, entsprechend einem Lebensalter von etwa 8-10 Monaten.

#### **2.1.2 Verwendete Apparate**

1. Kryostat – SLEE, Mainz
2. Schlittenmikrotom – LEICA,
3. Brutschrank – NEOLAB
4. Lichtmikroskop – Carl Zeiss, Jena

### 2.1.3 Verwendete Chemikalien

1. Aqua dest. – Zentrale Charité-Versorgung
2. Gepufferte Formalinlösung 4%ig – MERCK, Darmstadt; 4001
3. Ethanol 70%ig – HERBETA-Arzneimittel, Berlin
4. Ethanol 80%ig – HERBETA-Arzneimittel, Berlin
5. Ethanol 96%ig – HERBETA-Arzneimittel, Berlin
6. Ethanol absolut – HERBETA-Arzneimittel, Berlin
7. Chloroform – BAKER, Deventer, Holland; 7386
8. Paraffin, schüttfähig – MERCK, Darmstadt, 1.07337.1000
9. Xylol – BAKER, Deventer, Holland; 8080
10. Aceton – BAKER, Deventer, Holland; 8002
11. Methanol – BAKER, Deventer, Holland; 8045
12. DePex-Eindeckmittel – SERVA, Heidelberg; 18243
13. Kaisers Gylceringelatine – MERCK, Darmstadt; 1315
14. Weigerts Eisenhämatoxylin-Set – SIGMA DIAGNOSTICS, St. Louis, USA; HAT 10-79
15. Ponceau S – MERCK, Darmstadt; 15927
16. Lichtgrün, gelblich – MERCK, Darmstadt
17. Molybdato-phosphorsäure – VEB LABORCHEMIE, Apolda
18. Hämatoxylin – MERCK, Darmstadt; 1.04302.0100
19. Eosin, gelblich – MERCK, Darmstadt; 15935
20. Safranin O – SERVA, Heidelberg; 34598
21. Essigsäure 100% - MERCK, Darmstadt; 1.00063.2500
22. TBS-Puffer – DAKOCYTOMATION GmbH, Hamburg; S 3001
23. PBS-Puffer (Phosphat Buffered Saline), pH = 7,0 – DAKO, Hamburg
24. Neofix® - MERCK, Darmstadt
25. EDTA-Entkalkungslösung – HERBETA-Arzneimittel, Berlin; 33522
26. EDTA 10%ig, pH = 6,9 aus Titriplex – MERCK, Darmstadt
37. Aquatex – DAKO, Hamburg
28. LSAB-Kit 2 System HRP Kaninchen/Maus, inklusive DAB – DAKOCYTOMATION GmbH, Hamburg; K 0673
29. Antikörperverdünnungsmedium, hintergrundreduzierend – DAKOCYTOMATION GmbH, Hamburg; S 3022

#### **2.1.4 Verwendete Antikörper**

1. Monoclonal anti-human Antibody to Collagen I – ABCAM LIMETED, Cambridgeshire, UK; ab 6308 LOT: 14663
2. Monoclonal anti-human Antibody Collagen II - ABCAM LIMETED, Cambridgeshire, UK; ab 6307-100 LOT 16385
3. Monoclonal anti-human Antibody to Collagen II – ABCAM LIMITED, Cambridgeshire, UK; ab 6307 LOT: 12707
4. Monoclonal anti-porcine Antibody to Collagen II - ABCAM LIMETED, Cambridgeshire, UK; AF 5710 LOT 0803
6. Rabbit anti-human Antibody to Collagen VI – BIODSIGN, USA; T59108R LOT: 10D09302
7. Mouse anti-human Antibody to Collagen X - freundlicherweise Überlassen von PD Dr. med. Thomas Aigner, Pathologisch-anatomisches Institut, Klinikum der Universität Erlangen-Nürnberg

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Versuchstiere**

Alle Tiere sind zum Zeitpunkt der Hüftexartikulation ca. 60kg schwer, entsprechend einem Lebensalter von etwa 8-10 Monaten.

Bei 8 Tieren handelt es sich um Kontrolltiere der Arbeitsgemeinschaft um Dr. med. vet. Meissler, Versuchstierkundlicher Dienst, Tierexperimentelle Einrichtung der Charite, CVK, die keiner Behandlung unterzogen wurden.

2 Tiere erhielten eine Gefäßprothese im Leistenbereich der A. femoralis.

### **2.2.2 Gewebeentnahme**

Die Hinterläufe werden innerhalb von maximal 3 Stunden nach Eintritt des Todes im Hüftgelenk exartikuliert und gekühlt zur weiteren Verarbeitung transportiert.

Nach dem Abpräparieren von Haut und Muskulatur erfolgt die semisterile Gelenkeröffnung der Knie- und oberen Sprunggelenke innerhalb der nächsten Stunde.

Innerhalb von 10 Minuten nach Eröffnung werden jeweils sechs Knorpelstanzen mit einem Durchmesser von 6mm unter Mitnahme von ca. 3mm subchondralen Knochens senkrecht zur Knorpeloberfläche mittels eines Handbohrers entnommen. Im femurotibialen, bzw. talocruralen Gelenk werden jeweils 3 Stanzen aus der medialen und lateralen Kondyle des Femurs, respektive des Talus, entnommen (s. Schemazeichnung).

Der Knorpel wird bei Bedarf mittels Aqua dest. feucht gehalten.

Anschließend werden die Stanzproben sofort in Neofix fixiert.

Bei keinem der Tiere sind makroskopische Defekte und / oder Läsionen erkennbar.



A



B

**Abb. 3 Entnahmeschema**

A) Aufsicht auf Talusrolle (aufgeklappt), Läufer, 6 Monate, vor Stanzentnahme

B) Aufsicht auf Femurkondylen, Läufer, 6 Monate, nach Stanzentnahme

### 2.2.3 Histologische Aufarbeitung der Proben

Die Proben werden für 3 Tage in Neofix belassen und anschließend gewässert.

Zum Entkalken werden die Proben dann in EDTA-Lösung gegeben.

Nach 14 Tagen erfolgt die dreimalige Spülung mit Leitungswasser und darauffolgend die Aufteilung in Proben zur Paraffineinbettung und Proben zum Kryoschneiden.

Von allen Proben werden jeweils 30 Objektträger mit je 3 Schnitten senkrecht zur Knorpeloberfläche longitudinal bis in den subchondralen Knochen angefertigt.

#### a) Kryoproben:

Die Kryoproben werden in PBS-Puffer bis zum Schneiden im Kühlschrank eingelagert.

Das Schneiden der Kryoproben erfolgt bei  $-34^{\circ}\text{C}$  am Kryostaten mit einer Dicke von  $7\ \mu\text{m}$ .

Geschnitten wird senkrecht zur Knorpeloberfläche, von der Knorpeloberfläche in Richtung subchondralen Knochen.

Nach 24 Stunden Lufttrocknen erfolgt die 5-minütige Fixierung am Objektträger in Aceton.

Anschließend werden die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgekühlt bei  $-20\ ^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

#### b) Paraffinproben:

Die Paraffinproben werden für 3 Tage in Ethanol 70%, für 6 Stunden in Ethanol 80%, über Nacht in Ethanol 96% und nochmals über Nacht in 100% Ethanol gelagert.

Anschließend kommen die Proben für zweimal 2 Stunden in Chloroform, 2 Stunden Paraffin 1 und über Nacht in Paraffin 2.

Anmerkung: bei der Bezeichnung Paraffin 1 und 2 handelt es sich lediglich um die Bezeichnung unterschiedlicher Ansätze desselben Paraffins.

Darauf folgt die Einbettung in Paraffinblöcke.

Die Paraffinblöcke werden auf einem Schlittenmikrotom  $6\ \mu\text{m}$  dick geschnitten und anschließend im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

Die Objektträger werden zur weiteren Aufarbeitung verwahrt.

#### **2.2.4 Färbung der Proben**

Zur Anfärbung werden von 10 angefertigten Objektträgern jeweils 3 entnommen.

Jeweils 1 Objektträger wird dann nach Masson-Goldner und Hämatoxylin-Eosin gefärbt (nach Romeis, Mikroskopische Techniken, 1944).

#### **2.2.5 Auswertung der Histologie**

Die Auswertung aller gefärbten Proben erfolgt mittels Lichtmikroskopie.

Die Proben werden in 40- und 100facher Vergrößerung grob gemustert und Übersichtsbilder fotografiert.

Morphologisch auffällige Areale werden registriert.

Außerdem werden Proben mit auffälligen Arealen für die immunhistochemische Aufarbeitung markiert.

## **2.2.6 Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie wird jeweils an einem Präparat aus der Knorpelschicht mit dem auffälligsten mikroskopisch-pathologischen Befund durchgeführt.

Verwendet werden monoklonale Antikörper für das indirekte Immunostaining, bei dem ein zunächst unkonjugierter Antikörper an ein spezifisches Antigen bindet und sekundär mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper reagiert.

Hierbei findet die LSAB-Technik (Labeled-Streptavidin-Biotin technique) Anwendung, welche die Applikation eines Primärantikörpers, von enzymmarkiertem Streptavidin und des Substrates vorsieht.

Als Enzyme werden Peroxidasen oder alkalische Phosphatase verwendet.

Gegengefärbt wird mit Hämatoxylin.

Verarbeitet werden die Paraffinproben nach 12 Minuten Entparaffinierung und anschließender Demaskierung mittels Pepsin-Lösung bei 37°C über 120 Minuten.

Sowohl Paraffin-, als auch Kryoschnitte werden dann 5 Minuten mit Methanol/Aceton fixiert, 20 Minuten bei 37°C getrocknet, 2 x 5 Minuten mit PBS-Puffer gespült und 24 Stunden mit dem primären Antikörper inkubiert.

Darauf folgt ein 3faches Spülen mit PBS-Puffer, die 30minütige Kopplung an En Vision Polymer AP, 3 x 5 Minuten Spülen mit PBS-Puffer, Zugabe der Substrat-Chromogen-Lösung Fast Red über 20 Minuten, 2 kurze Spülungen mit Aqua dest., eine kurze Gegenspülung mit Hämatoxylin, das Auswaschen mit Leitungswasser über ca. 10 Minuten und das Spülen mit Aqua dest.

Dann werden die Präparate mit Aquatex eingedeckt, geputzt und beschriftet.

## **2.2.7 Auswertung der Immunhistochemie**

Die Auswertung erfolgt mittels Lichtmikroskopie.

Dabei werden die gefärbten Proben bei 25-, 50- und 100facher Vergrößerung grob durchgemustert und Übersichtsbilder fotografiert.

Das Verteilungsmuster der Kollagene in Korrelation zu den vorhandenen Pathologien wird registriert.