

### **3.3.5 Behandlung der Präparate für die Immunhistochemie**

#### **3.3.5.1 Entkalken mit EDTA-Lösung**

Nachdem die Präparate zwei Tage in der Fixierlösung aufbewahrt wurden, wurden sie zunächst durch gründliches dreißigminütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser von der Fixierlösung befreit. Danach wurden die Präparate zur Entkalkung in reichlich EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung<sup>46</sup> eingelegt und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Die EDTA-Lösung wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Je nach Größe der Präparate dauerte die Entkalkung drei bis vier Wochen. Danach folgte wiederum ein gründliches Spülen unter fließendem Leitungswasser.

#### **3.3.5.2 Einbetten in Paraffin**

Über Nacht wurden die Präparate in einem Entwässerungsautomaten<sup>47</sup> mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und abschließend bei 60°C in ein Bad aus flüssigem Paraffin<sup>48</sup> gegeben. Aus dem flüssigen Paraffin entnommen, wurden die Präparate nun in Uni-Kassetten eingelegt und in Paraffin eingegossen.

#### **3.3.5.3 Anfertigen von Schnitten**

Mit Hilfe eines Weichschnittmikrotoms<sup>49</sup> wurden von den Paraffinblöcken 3 µm starke Schnitte angefertigt und auf Objektträger<sup>50</sup> aufgebracht, diese wurden danach zum Aushärten der Schnitte für einen Tag im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

#### **3.3.5.4 Immunhistologisches Färben der Schnitte**

Für die Darstellung der Wachstumsfaktoren wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Peroxidase Technik mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Die Gefäßdarstellung erfolgte durch die ABC-alkalische Phosphatase-Technik mit Neufuchsin als Chromogen.

Für beide Methoden wurden ABC-Elite-Kits von Vector<sup>51</sup> verwendet. Diese enthielten equines Normalserum, einen biotinylierten Sekundärantikörper, sowie den ABC-Komplex in Tropfflaschen, die wie folgt angesetzt wurden:

---

<sup>46</sup> EDTA-Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, 12099 Berlin

<sup>47</sup> Hi-Tec® Gewebeeinbettautomat "1500" Typ DDm-P800, 35418 Busek

<sup>48</sup> Paraplast Plus® Tissue Embedding Medium, Sherwood Medical Co., St. Louis, MO, USA

<sup>49</sup> Leica RM 2035, Leica Instruments GmbH, 69226 Nußloch

<sup>50</sup> Superfrost, Menzel

<sup>51</sup> Vectastain Elite ABC Kit PK-6200, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories Inc., CA 94010 USA

- 2 Tropfen Normalserum auf 5 ml Puffer
- 1 Tropfen Normalserum und 1 Tropfen Sekundärantikörper auf 5 ml Puffer
- 2 Tropfen Reagenz A und 2 Tropfen Reagenz B auf 5 ml Puffer, um den ABC-Komplex zu erhalten.

Wenn im Folgenden von Normalserum, Sekundärantikörper und ABC-Komplex die Rede ist, handelt es sich um diese Ansätze.

Als Antikörper gegen die Wachstumsfaktoren wurden anti-TGF- $\beta$ <sup>52</sup>, anti-IGF-I Rezeptor<sup>53</sup>, anti-IGF-I<sup>54</sup>, anti-IGF-II<sup>55</sup> und anti-BMP-6<sup>56</sup>, für die Gefäßdarstellung anti-FVIII<sup>57</sup> und anti- *$\alpha$  smooth muscle actin*<sup>58</sup> verwendet.

#### Übersicht der verwendeten Antikörper und ihrer Verdünnung:

Bezeichnung	Herkunft		Verdünnung <sup>59</sup>
anti-IGF-I	polyklonal	Kaninchen-anti-human IGF-I	1:500
anti-IGF-II	polyklonal	Kaninchen-anti-human IGF-II	1:500
anti-IGF-I R	polyklonal	Kaninchen-anti-human IGF-I Rezeptor	1:500
anti-BMP-6	monoklonal	Maus-anti-human BMP-6	1:25
anti-TGF- $\beta$	polyklonal	Kaninchen-anti-human TGF- $\beta$ 1 Kaninchen-anti-porcine TGF- $\beta$ 1.2 Kaninchen-anti-porcine TGF- $\beta$ 2 Kaninchen-anti-amphibisches TGF- $\beta$ 5	1:500
anti-FVIII	polyklonal	Kaninchen-anti-human v. Willebrandt Faktor	1:200
anti- <i><math>\alpha</math> smooth muscle actin</i>	monoklonal	Maus-anti-human <i><math>\alpha</math> smooth muscle actin</i>	1:100

Die im folgenden beschriebene Vorgehensweise erfolgte für alle Antikörper nach dem gleichen Protokoll. Alle Schnitte wurden für jeweils einen Antikörper in einem Durchgang mit einem Reagentienansatz behandelt, um möglichst gleiche Bedingungen zu gewährleisten.

<sup>52</sup> AB-100-NA, R&D Systems GmbH, D-65205 Wiesbaden

<sup>53</sup> MAB 391, R&D Systems GmbH, D-65205 Wiesbaden

<sup>54</sup> 500-P11, Biozol Diagnostica, D-85380 Eching

<sup>55</sup> 500-P12, Biozol Diagnostica, D-85380 Eching

<sup>56</sup> NCL-BMP6, Novocastra Laboratories LTD., Großbritannien

<sup>57</sup> A0082, Dako Diagnostica, 22004 Hamburg

<sup>58</sup> M 0851, Dako A/S, Glostrup, Dänemark

## Peroxidase

Der zum Spülen verwendete Phosphatpuffer wurde im Verhältnis 1:9 aus Phosphatpufferkonzentrat<sup>60</sup> und sterilem Aqua dest.<sup>61</sup> angesetzt und auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Ein Spülvorgang dauerte 5 min und erfolgte zur besseren Durchdringung der Schnitte auf dem Schüttler in Glasküvetten.

Zunächst wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und hydriert. Es folgte eine Spülung in Phosphatpuffer. Die Schnitte wurden für 5 min in 3%iger Wasserstoffperoxid-Phosphatpufferlösung gespült, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Anschließend folgte ein erneutes Spülen in Phosphatpuffer. Die Schnitte wurden abgeklopft, waagrecht in eine feuchte Kammer gegeben, mit Normalserum beschichtet, und für 20 min inkubiert. Das Normalserum wurde abgeklopft, sodaß ein dünner Film des Serums zurückblieb. Der Primärantikörper in der oben angegebenen Verdünnung wurde auf die in der feuchten Kammer verbliebenen Schnitte pipettiert. Die Kammer wurde anschließend über Nacht bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte nach dem Abklopfen des Primärantikörpers dreimal in Phosphatpuffer gespült. Nach erneutem Abklopfen erfolgte die Beschichtung mit dem Sekundärantikörper. Die Schnitte wurden in der feuchten Kammer für 30 min inkubiert und anschließend dreifach in Phosphatpuffer gespült. Danach wurde in der feuchten Kammer der ABC-Komplex auf die Schnitte pipettiert. Nach 50 min erfolgte ein letztmaliges dreifaches Spülen der Schnitte in Phosphatpuffer.

Das DAB Chromogen wurde gemäß der mitgelieferten Anleitung und unter Lichtabschluß angesetzt. Jeder Schnitt wurde für 1 min mit dem Chromogen, hier DAB<sup>62</sup>, bedeckt, dann wurden die Schnitte in sterilem aqua dest. gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun<sup>63</sup> für 10 Sekunden. Die Schnitte wurden im Anschluß ausgiebig in fließendem Leitungswasser gespült. Die Entwässerung fand in der aufsteigenden Alkoholreihe statt, abschließend wurden die Schnitte mit einem xylohaltigen Eindeckmedium<sup>64</sup> eingedeckt.

---

<sup>59</sup> S 0809: Dako antibody diluent, Dako Corporation, CA 93013, USA

<sup>60</sup> 3L 175 Phosphatpufferkonzentrat, Chroma-Gesellschaft, 73257 Köngen/N.

<sup>61</sup> Aqua B.Braun/Melsungen

<sup>62</sup> Peroxidase Substrate Kit SK-4100, Vector Laboratories Inc., CA 94010 USA

<sup>63</sup> 1.09249.0500, Merck KGaA, 64271 Darmstadt

<sup>64</sup> Vitroclud®, R. Langenbrinck, 79312 Emmendingen

### Alkalische Phosphatase

Die Vorgehensweise war entsprechend der eben beschriebenen. Statt des Phosphatpuffers wurde ein Tris-Puffer<sup>65</sup> mit einem pH-Wert von 8,2 für die Spülungen verwendet. Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid entfiel. Es wurde das Vector Elite Kit für alkalische Phosphatase und als Chromogen Neufuchsin<sup>66</sup> verwendet. Die Einwirkzeit des Chromogens betrug hier 5 min.

## **3.4 Auswertung**

Alle im Folgenden erwähnten Meßdaten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel<sup>67</sup> archiviert und mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS<sup>68</sup> ausgewertet. Wenn nicht anders angegeben, wurden zunächst deskriptive Parameter erhoben. Die statistische Auswertung einzelner Gruppen gegeneinander erfolgte über den Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben. Die Gruppe III war mit jeweils 3 Tieren zu klein für statistische Vergleiche. Der Vollständigkeit halber ist sie aber bei allen Auswertungen mit dargestellt und läßt so eine trendweise Entwicklung erahnen.

Verbundene Parameter, wie sie bei der Auswertung der ganganalytischen Daten vorlagen, wurden mit dem Wilcoxon-Test verglichen. Die Darstellung der einzelnen Parameter erfolgte mit Boxplots<sup>69</sup> für Einzelparameter. Zeitverläufe, wie bei der ganganalytischen Messung, wurden der Übersichtlichkeit halber mit Fehlerbalkendiagrammen dargestellt.

### **3.4.1 Makroskopische Beobachtungen**

#### **3.4.1.1 Subjektive Beurteilung des Heilungsverlaufs**

Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde täglich kontrolliert, die Futter- und Wasseraufnahme wurden protokolliert. Um eine einheitliche Befundung durch unterschiedliche Personen zu gewährleisten, wurde der folgende Score verwendet (Morton und Griffiths 1985):

---

<sup>65</sup> Sigma Trizma Hydrochlorid: T-3253, Sigma Trizma Base: T-1503, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim

<sup>66</sup> Dako® Fuchsin Substrate-Chromogen, Dako Corporation CA 93013 USA

<sup>67</sup> Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation, USA

<sup>68</sup> SPSS 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL 60606 USA

<sup>69</sup> *Boxplot*: Diagramm auf der Grundlage des Medians, der Quartile und Extremwerte. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar. Die von der Box ausgehenden Linien führen jeweils bis zum höchsten und niedrigsten Wert, ohne Ausreißer zu berücksichtigen. Die quer über die Box gelegte Linie gibt die Lage des Medians wieder.

<u>Name:</u>	<u>Projekt:</u>	<u>Tierart:</u>	<u>Geschlecht:</u>	<u>Gewicht:</u>
<b>Tag nach der OP:</b>			<b>Score:</b>	<b>Eigene Beobachtungen:</b>
<b>Futter- und Wasseraufnahme:</b>				
Normal			0 Punkte	
Ungewiß: Körpergewicht ↓ <5%			1 Punkt	
Aufnahme reduziert: Körpergewicht ↓ <10%			2 Punkte	
Keine Wasser- oder Futteraufnahme			3 Punkte	
<b>Allgemeinzustand</b>				
Fell glatt, glänzend (Körperpflege), Körperöffnungen sauber, Augen klar, glänzend			0 Punkte	
Vernachlässigte Körperpflege (Felldefekte)			1 Punkt	
Fell stumpf, ungeordnet, verklebte Körperöffnungen, Augen trüb			2 Punkte	
Schmutziges Fell, Körperöffnungen ungepflegt, unnormale Haltungen, Augen trüb			3 Punkte	
<b>Klinischer Befund</b>			<i>Normalwerte Yucatan-Minipig:</i>	
			<i>HF: 50-100min<sup>-1</sup>, AF: 10-16 min<sup>-1</sup>, Temp.: 38,7-39,7°C</i>	
Temperatur, Atmung & Herzfrequenz normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durchblutet & gesund			0 Punkte	
Schwache Abweichungen des obigen Befundes			1 Punkt	
Temperaturabweichung 1-2°C, Atmung & Herzfrequenz +30%			2 Punkte	
Temperaturabweichung >2°C Atmung & Herzfrequenz ≥50%			3 Punkte	
<b>Spontanverhalten</b>				
Normales motorisches & sonstiges Verhalten (Schlafen, Neugier, Sozialkontakt)			0 Punkte	
Geringe Abweichungen			1 Punkt	
Abnormales Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik, nicht ansprechbar, Tiere liegen isoliert, kein Tagesrhythmus			2 Punkte	
Ungewöhnliche Laute, Expirationsgeräusch, Selbstamputation, abweichende Körperlage			3 Punkte	
<b>Provoziertes Verhalten (Verhalten beim Handling)</b>				
Normales Fluchtverhalten			0 Punkte	
Fluchtverhalten geringradig ↓oder ↑			1 Punkt	
Fluchtverhalten übermäßig ↓oder ↑			2 Punkte	
Reagiert schwach(komatös) oder äußerst wild			3 Punkte	

Abbildung 3.4-1 Score zur Abschätzung der Schwere von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren (Morton und Griffiths 1985)

### **3.4.1.2 Ganganalyse**

Die aufgenommenen Rohdaten wurden mit Hilfe der zugehörigen Software<sup>70</sup> ausgewertet. Verwendet wurden die Mittelwerte für alle Meßzyklen pro Bein und Tag für folgende Werte: Bodenreaktionskraft bezogen auf das jeweilige aktuelle Gewicht des betreffenden Tieres, Kontaktfläche und –zeit. Als Bezugswert wurden die für das jeweilige Bein vor der Operation ermittelten Daten der gesunden Tiere definiert.

### **3.4.1.3 Visuelle Beurteilung bei der Explantation**

Während der Explantation der linken Femora wurde der Defektbereich auf seinen makroskopischen Zustand kontrolliert und beschreibend sowie photographisch dokumentiert.

## **3.4.2 Histomorphometrie**

In Gruppe I (4 Wochen Standzeit) kamen jeweils 12 Präparate von mit Wachstumshormon behandelten und Placebotieren zur Auswertung. In Gruppe II (6 Wochen Standzeit) wurden 12 mit Wachstumshormon behandelte und 11 Placebotiere ausgewertet. In der Gruppe III (12 Wochen Standzeit) waren es pro Behandlungsart jeweils drei Präparate.

### **3.4.2.1 Bildanalyse**

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop<sup>71</sup>, das über eine Kamera<sup>72</sup> mit einem Computer verbunden war. Auf diesem war eine spezielle Bildanalyse-Software<sup>73</sup> installiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem eigens für diese Problematik entwickelten Makro (siehe Anhang).

Es wurden für die Auswertung jeweils zwei Serienschnitte pro Tier aus der Mitte des Defekts herangezogen. Diese waren jeweils mit Safranin-Orange / von Kossa und Safranin-Orange / Lichtgrün gefärbt.

---

<sup>70</sup> novel-win 7.9, novel GmbH, München

<sup>71</sup>Leica DMRB, Okulare: 1,6x / 0,05 Fluotar, 2,5x / 0,07 N Plan, 5x / 0,12 PL Fluotar, 10x / 0,30 PL Fluotar, 20x / 0,50 PL Fluotar, 40x / 0,70 PL Fluotar, Okular: 10x / 25 L Plan, Leica, 6140 Bensheim  
Belichtungsautomat: Orthomat E, Leica, Wetzlar

<sup>72</sup> Sony 3CCD Color Video Camera MC-3254, AC-Adapter AA-P700, Remote Control Unit RM-C950, AVT-Horn

<sup>73</sup> KS 400, Kontron Elektronik GmbH, 85385 Eching

Zunächst wurde die für alle Präparate identische Mikroskop- und Kameraeinstellung gewählt (Objektiv 1,6x, Kamera 0,55x, Graufilter). Für die nachfolgende Flächenmessung wurde die Kamera mit Hilfe eines Kalibrierungsobjektträgers vor jeder Messung auf eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  eingestellt. Alle Schnitte wurden hintereinander in einem Durchgang von einem Untersucher durchgemessen, in einem zweiten Durchgang wurden von einer zweiten Person stichprobenartig zwanzig Messungen vorgenommen, um die Genauigkeit der ersten Messungen zu überprüfen.

Vor der eigentlichen Objektmessung erfolgte eine Bildrestaurierung, insbesondere die Beseitigung von Ausleuchtungsfehlern des Meßfeldes sowie eine Bildoptimierung, d.h. die Verstärkung des Bildkontrastes und der Kantenschärfen.

Allen Meßdurchgängen gemeinsam war eine Bildsegmentierung, welche die Definition von Meßstruktur und Hintergrund sowie die Herstellung eines Binärbildes der Meßstruktur mit Hilfe von Farbwertdiskriminierung (RGB) beinhaltet. Desweiteren erfolgte eine Binärbildoptimierung, die ein Entfernen von Artefakten und eventuell miterfaßten Fremdstrukturen beinhaltet.

Durch die zuvor erfolgte Kalibrierung wurden alle Flächen vom Programm in  $\text{mm}^2$  berechnet. Die Defekte wiesen teilweise Tiefen über 1 mm ab Knorpel-Knochen-Grenze auf. Aus diesem Grund wurden alle Defekte einheitlich bis in eine Tiefe von 1,5 mm ab Knorpel-Knochen-Grenze vermessen. Die Ursachen für diese Beobachtung werden diskutiert.

Die Messung wurde wie folgt durchgeführt:

- Auswählen der *Region of Interest* durch den Untersucher am nach Safranin-Orange / von Kossa gefärbten Schnittpräparat. Ein Rechteck mit einer Kantenlänge von  $1,5 \times 6 \text{ mm}$  wurde an die Knochen-Knorpelgrenze des Defektbereichs angelegt. Bei Bedarf wurde das Rechteck an die waagerechte Ausdehnung des Defekts angepaßt. Die obere Kante des Rechtecks wurde bis auf das Niveau der Gelenkknorpeloberfläche aufgezogen.

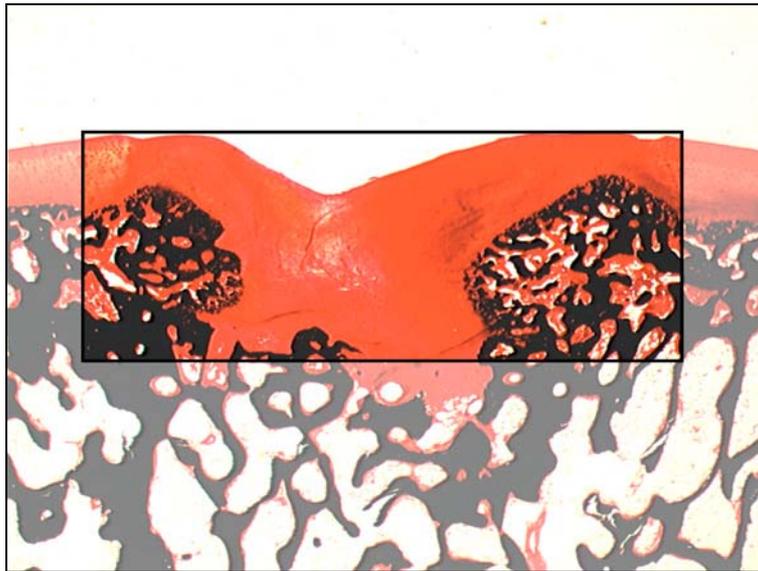


Abbildung 3.4-2: Markieren der Region of Interest mit Hilfe eines Rechtecks



Abbildung 3.4-3: Definiertes Meßfenster

- Für die Berechnung der knöchernen Strukturen in der *Region of Interest* wurde durch das Programm ein Binärbild erstellt.



Abbildung 3.4-4: Binärbild der knöchernen Strukturen mit Artefakten

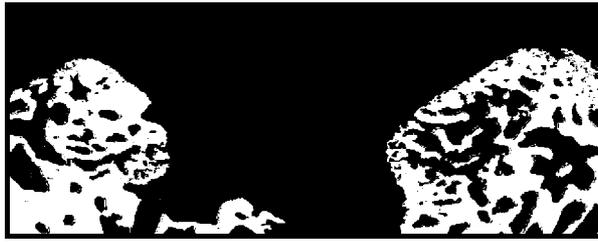


Abbildung 3.4-5: Binärbild der knöchernen Strukturen nach automatisierter Bereinigung

- Die Knochenmarkslakunen wurden manuell geschlossen. Ein Maske der Kallusregion wurde erstellt („*harter Kallus*“ = neugebildeter Knochen mit enthaltenen Markräumen).

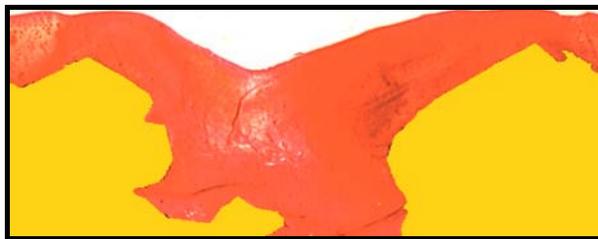


Abbildung 3.4-6: Kallusmaske (gelbe Fläche), bestehend aus neugebildetem Knochen und Knochenmarkslakunen

- Anhand der Kallusfläche und der in dieser enthaltenen Knochenfläche errechnete das Programm die Dichte des neugebildeten Kallus (Kallusdichte = Knochenfläche pro Kallusfläche [%]).
- Eine Maske des nichtgefüllten Defektanteils wurde erstellt.



Abbildung 3.4-7: Maske des nichtgefüllten Defektanteils

- Mit Hilfe der bis zu diesem Zeitpunkt erstellten Daten errechnete das Programm den Anteil der nichtossären Defektfüllung („*weicher Kallus*“). Diese beinhaltet

Bindegewebe und neugebildeten Knorpel. Die angrenzenden intakten Knorpelbereiche wurden manuell ausgeschlossen.



Abbildung 3.4-8: Maske des Anteils an nichtossärer Defektfüllung („weicher Kallus“)

- Unter dem zu Programmbeginn festgelegten Meßfenster waren teilweise Resorptionsareale zu beobachten. Daher enthielt das Programm die Option, diesen zusätzlichen Knochenresorptionsbereich separat zu messen. Für die Messung wurde der entsprechende Bereich manuell eingegrenzt und ein Binärbild erstellt.

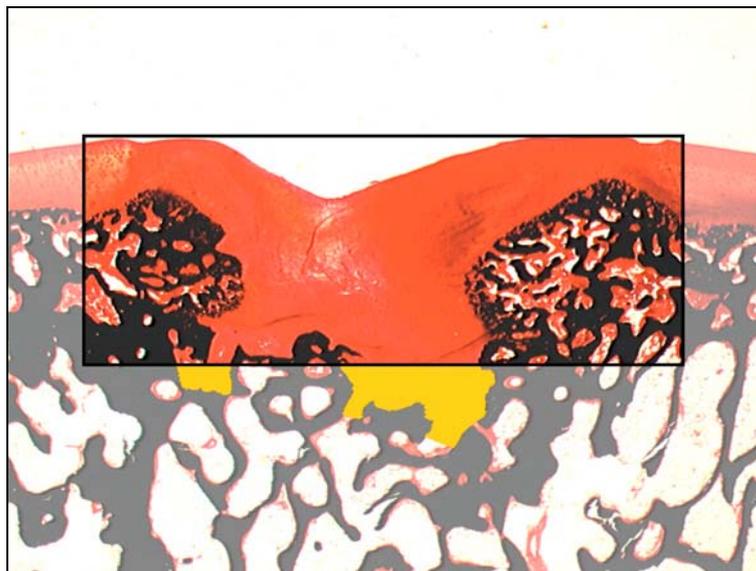


Abbildung 3.4-9: Maske des Resorptionsareals unterhalb des zu Programmbeginn erstellten Meßfensters (Region of Interest)

- Anhand des mit Safranin-Orange / Lichtgrün gefärbten Schnittpräparats wurde der Anteil an neugebildetem Knorpel im Defekt bestimmt. Ein Binärbild des Knorpelanteils im gesamten Präparat wurde erstellt. Für die Berechnung mußte der Anteil an neugebildetem Knorpel im Defekt manuell eingegrenzt werden.



*Abbildung 3.4-10: Maske des Anteils an neugebildetem Knorpel im gesamten Schnittpräparat, enthält Osteoidsäume und den an den Defektbereich angrenzenden intakten Knorpel*



*Abbildung 3.4-11: Binärmaske des Anteils an neugebildetem Knorpel im Defekt nach dem manuellen Eingrenzen der Region of Interest*

- Durch die Subtraktion der Knorpelfläche von der Fläche der nichtossären Defektfüllung („weicher Kallus“) wurde der bindegewebige Anteil des Regenerats im Defektbereich bestimmt.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Gesamtfläche des Defekts [ $\text{mm}^2$ ]
- neugebildeter Kallus [ $\text{mm}^2$ ]  
(„harter Kallus“ = neugebildeter Knochen mit enthaltenen Markräumen)
- neugebildeter Knochen [ $\text{mm}^2$ ]
- Dichte des neugebildeten Kallus  
(Kallusdichte = Anteil Knochen pro Kallus in %)
- nichtossäre Defektfüllung [ $\text{mm}^2$ ]  
(„weicher Kallus“ = neugebildeter Knorpel und Bindegewebe)
- Nichtfüllung des Defekts [ $\text{mm}^2$ ]
- Resorptionszone [ $\text{mm}^2$ ]
- neugebildeter Knorpel [ $\text{mm}^2$ ]
- neugebildetes Bindegewebe [ $\text{mm}^2$ ]

Die gemessenen absoluten Flächen wurden auf die initial vom Programm gemessene Gesamtdefektfläche bezogen, um die einzelnen Defekte miteinander vergleichen zu können. Somit wurden die einzelnen Parameter in Prozent angegeben.

Es erfolgte ein Vergleich der gemessenen Gesamtdefektfläche mit der aus den gemessenen Einzelwerten errechneten Defektfläche ( $\Sigma$  [neugebildeter Kallus [ $\text{mm}^2$ ] + neugebildeter Knorpel [ $\text{mm}^2$ ] + neugebildetes Bindegewebe [ $\text{mm}^2$ ] + Nichtfüllung [ $\text{mm}^2$ ]]).

### 3.4.2.2 Scoren der Defekte

Anhand der Scores nach Wakitani (Pineda, Pollack *et al.* 1992; Wakitani, Goto *et al.* 1994; Wakitani, Imoto *et al.* 1997) und O'Driscoll (O'Driscoll, Keeley *et al.* 1988) wurden die mit Safranin-Orange/von Kossa gefärbten Präparate aller Defekte von zwei unabhängigen Untersuchern klassifiziert. Deren Ergebnisse wurden pro Präparat und Scorekriterium gemittelt und ausgewertet. Die Summenwerte der einzelnen Scores wurden als Boxplots dargestellt. Während der Score nach Wakitani für die Beurteilung sowohl initial ungefüllter als auch mit Substituten gefüllter Knorpeldefekte entwickelt wurde, diente der Score nach O'Driscoll der Beurteilung von mit Substituten versehenen Knorpeldefekten.

#### HISTOLOGIC GRADING SCALE FOR CARTILAGE DEFECTS

A	Cell morphology (metachromasia)	hyaline cartilage	0
		mostly hyaline cartilage	1
		mostly fibrocartilage	2
		mostly noncartilage	3
		noncartilage only	4
B	Matrix staining (metachromasia)*	normal (compared to host)	0
		slightly reduced	1
		significantly reduced	2
		no metachromatic stain	3
C	Surface regularity <sup>a</sup>	smooth (>3/4)	0
		moderate (1/2-3/4)	1
		irregular (1/4-1/2)	2
		severely irregular (<1/4)	3
D	Thickness of cartilage <sup>b</sup>	>2/3	0
		1/3-2/3	1
		<1/3	2
E	Integration of donor to host adjacent cartilage	both edges integrated	0
		one edge integrated	1
		both edges not integrated	2

<sup>a</sup> Total smooth area of reparative cartilage compared to the whole area of the cartilage defect

<sup>b</sup> Average thickness of reparative cartilage compared to that of surrounding cartilage

Tabelle 3.4-1: *Histologischer Score zur Beurteilung von Knorpeldefekten nach Wakitani et al., modifiziert nach Pineda et al.*

\* Schnitte gefärbt mit Toluidinblau

*HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL GRADING SCORE*

I	Nature of the predominant tissue	Cellular morphology	Hyaline articular cartilage	4
			Incompletely differentiated mesenchyme	2
			Fibrous tissue or bone	0
II	Nature of the predominant tissue	Safranin-O staining of the matrix	Normal or nearly normal	3
			Moderate	2
			Slight	1
			None	0
III	Structural characteristics	Surface regularity	Smooth and intact	3
			Superficial horizontal lamination	2
			Fissures — 25 to 100 per cent of the thickness	1
			Severe disruption, including fibrillation	0
IV	Structural characteristics	Structural integrity	Normal	2
			Slight disruption, including cysts	1
			Severe disintegration	0
V	Structural characteristics	Thickness	100 per cent of normal adjacent cartilage	2
			50-100 per cent of normal cartilage	1
			0-50 per cent of normal cartilage	0
VI	Structural characteristics	Bonding to the adjacent cartilage	Bonded at both ends of graft	2
			Bonded at one end, or partially at both ends	1
			Not bonded	0
VII	Freedom from cellular changes of degeneration	Hypocellularity	Normal cellularity	3
			Slight hypocellularity	2
			Moderate hypocellularity	1
			Severe hypocellularity	0
VIII	Freedom from cellular changes of degeneration	Chondrocyte clustering	No clusters	2
			<25 per cent of the cells	1
			25-100 per cent of the cells	0
IX	Freedom from degenerative changes in adjacent cartilage		Normal cellularity, no clusters, normal staining	3
			Normal cellularity, mild clusters, moderate staining	2
			Mild or moderate hypocellularity, slight staining	1
			Severe hypocellularity, poor or no staining	0

Tabelle 3.4-2: *Histologischer und histochemischer Score zum Beurteilen von Knorpeldefekten nach O' Driscoll et al.*

### 3.4.3 Immunhistochemie

#### 3.4.3.1 Mikroskopische Auswertung der Wachstumsfaktoren

Die immunhistologischen Färbungen mit den Antikörpern gegen IGF-I, IGF-II, IGF-I Rezeptor, TGF- $\beta$  und BMP-6 wurden zunächst auf die Spezifität und Sensitivität des verwendeten Antikörpers überprüft, Positiv- und Negativkontrollen wurden bewertet.

Die im Regenerat erkennbaren Zellen wurden in Anlehnung an Bostrom (Bostrom 1998) nach Kriterien bezüglich ihrer Morphologie und Lokalisation im Defekt wie folgt klassifiziert:

- undifferenzierte Mesenchymzellen: Fibroblasten sehr ähnlich. Pluripotent, d.h., sie sind in der Lage, sich in andere Zellen umzuwandeln
- Fibroblasten: besitzen viele irreguläre zytoplasmatische Fortsätze.
  - in der oberflächennahen Schicht des Defekts: spindelförmig lang gestreckt
  - in den arkadenförmig angeordneten Schichten in der Defektmittle: tangential ausgerichtet, mit Ausläufern
  - am Defektgrund bzw. Übergang zu Knochen oder Knorpelinseln: polymorph, sternförmig
- Osteoprogenitorzellen, Chondroprogenitorzellen: morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Eine Zuordnung ist nur aufgrund ihrer Lage möglich, d.h. ob sie einer Knorpelinsel oder einem neugebildeten Knochenareal benachbart liegen, .
- Chondroblasten: nur bei 4 und 6 Wochen Präparaten vorhanden, große kubisch bis runde Zellen, in direkter Nachbarschaft einer Knorpelinsel liegend
- Chondrozyten:
  - in hyalinem Knorpel: große runde Zellen, Chondrone bzw. isogene Gruppen und Höfe erkennbar.
  - in Faserknorpel: kleinere polymorphe Zellen
- Osteoblasten: kubische Zellen, die sich an Knochenbälkchen entlangreihen und Osteoid produzieren
- Osteozyten: von knöcherner mineralisierter Hartsubstanz umgeben, klein, wenig Zytoplasma
- Osteoklasten: sehr große, mehrkernige Zellen, in der direkten Umgebung eines Knochenbälkchens im knöchernen Anteil des Defekts liegend.
- Gefäße: wurden in ihrer Gesamtheit erfaßt (*Tunica intima*, d.h. Endothel und *Tunica media*, respektive glatte Muskelzellen).

Eine Auswertung erfolgte in deskriptiver Form durch einen Untersucher.

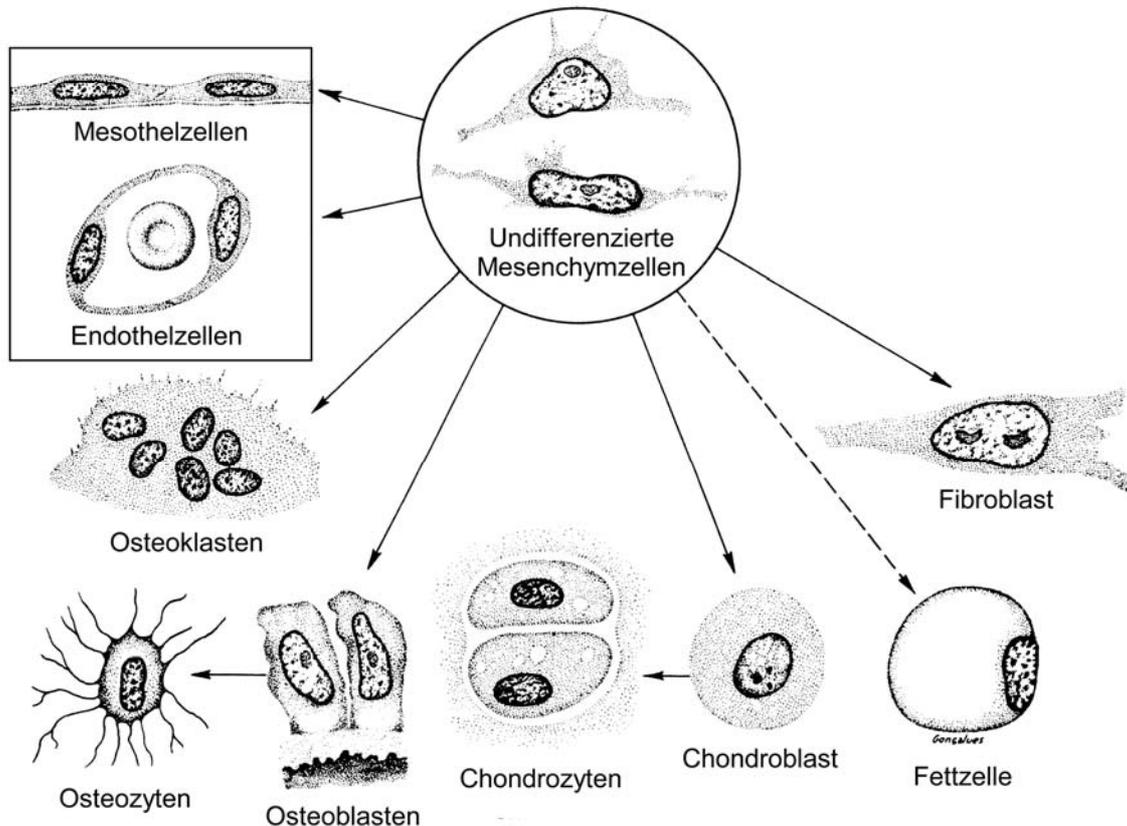


Abbildung 3.4-12: Vereinfachte Darstellung von Beziehungen zwischen verschiedenen Bindegewebszellen. Der gestrichelte Pfeil gibt an, daß zwischen Ausgangs- und Endzellen Zwischenstadien vorkommen. Nicht berücksichtigt sind die Größenverhältnisse der Zellen zueinander (Junqueira und Carneiro 1996)

### 3.4.3.2 Mikroskopische Auswertung der Gefäßdarstellung

Die immunhistologische Darstellung der Gefäße wurde zunächst in der Übersicht betrachtet, um das Einsprossungs- und Wachstumsverhalten der Gefäße zu erfassen. Die Auswertung erfolgte, indem der gesamte Defektbereich bei 200-facher Vergrößerung betrachtet wurde und die angefärbten Gefäße im bindegewebigen Teil des Defekts ausgezählt wurden. Die Gefäße in den angrenzenden Knochenmarksräumen wurden nicht berücksichtigt. Es wurde der Quotient aus Anzahl der so ermittelten Gefäße und dem Bindegewebsanteil des Defekts gebildet, was die Anzahl der Gefäße/mm<sup>2</sup> Bindegewebe ergab. Somit waren die Gefäßzahlen aller Defekte untereinander vergleichbar.