

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

Die Implantate wurden von der Arbeitsgruppe S.I. Stupp (Department of Material Science and Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign) hergestellt und die Herstellungsweise publiziert [22;23;125].

Es wurden 3 verschiedene Hydroxyapatit-Implantatmaterialien durch Präzipitation in wässriger Lösung mit einer Kristallgröße von 10 x 50 nm produziert. Die chemische Herstellung der Organoapatite beruht auf Nukleation und Wachsen von Apatitkristallen in einer wässrigen Lösung mit organischer Komponente, was zu einer Dispersion der Kristalle im Netzwerk der organischen Moleküle führte. Der organische Zusatz induziert einerseits die Nukleation, andererseits behindert er ein weiteres Wachstum und das Reifen der Kristalle, was die Kristallgröße im gewünschten Rahmen hält und den Prozeß der Mineralisation in vivo nachahmt. Die Präzipitation erfolgte einmal unter Zugabe einer 1%igen Lösung eines Indomethacin-Tyrosin-Hydroxyethylmethacrylat-Makromonomer (Indo-OA) in einer HEMA-Lösung mit nachfolgender Photopolymerisation in blauem Licht. HEMA ist in diesem Makromonomer über eine Esterbindung mit Tyrosin verbunden, welches über eine Peptidbindung mit Indomethacin verbunden ist. Diese Bindungen können gespalten und somit die Komponenten ausgewaschen werden. Bei der Polymerisation kommt es zu einer Verbindung vieler HEMA-Moleküle durch Aufspaltung einer endständigen Doppelbindung, welche dann als Polymer sozusagen einen Anker in der Implantatmatrix bilden. Die übrigen Proben wurden in Gegenwart von Hydroxyethylmethacrylat (HEMA-OA) allein bzw. L-Lysin (PLL-OA), welche auch polymerisiert wurden, präzipitiert. Die Organomineralpartikel wurden nach 1 Stunde Wachstum aus dem Reaktionsmedium isoliert und in zylindrische Implantate gepreßt. Hierzu wurden 0,13 g (bzw. 1993 und 1994 0,065 g) des so gewonnenen Pulvers mit Hilfe einer hydraulischen Presse für 5 Minuten bei 538 MPa gepreßt. Dieser Druck reichte in mikrobiologischen Vorstudien aus, um die Implantate zu sterilisieren. Die Zylinder zeigten einen Durchmesser von 3,5 mm und eine Länge von 8 mm. In den Vorversuchen 1993 und 1994 betrug die Länge 4 mm und der Durchmesser 1994 betrug nur 3 mm. Anschließend wurden die Implantate noch bei 130°C bei einem Druck von 2 kg/cm<sup>2</sup> für 20 Minuten in steril verschließbaren Glasgefäßen autoklaviert und innerhalb von 48 h verwendet. Die Implantate, insbesondere PLL-OA, hatten eine relativ brüchige Konsistenz.

## **2.2 Versuchsaufbau**

Es sollte die biologische Reaktion auf diese neue Art von Implantatmaterialien untersucht und unterschiedliches Reaktionsverhalten dokumentiert werden. Hierzu wurde ein von unserer Arbeitsgruppe entwickeltes standardisiertes Tiermodell mit einem „critical size defect“ gewählt, um die Implantatintegration in spongiösen Knochen zu untersuchen. Nach den Vorversuchen 1993 und 1994 mit nur einer Liegezeit (28d) und kleiner Anzahl an Implantaten / Versuchstieren, wurde für den Versuch 1998 die Tierzahl auf je 6 pro Material und Liegezeit mit je 11 Implantaten und einer Leerlochkontrolle festgelegt. Dies hatte sich aus Voruntersuchungen als Kompromiß zwischen validen, aussagekräftigen Ergebnissen und Verbrauch von Ressourcen ergeben.

Es wurde die Gewebereaktion und Veränderungen der Implantatmaterialien 7d, 28d und 84d nach Implantation makroskopisch, histologisch mit Hilfe der Lichtmikroskopie, ultrastrukturell mit der Elektronenmikroskopie und molekular mit der In-situ-Hybridisierung qualitativ und quantitativ untersucht. Die Ergebnisse wurden dann im Kontext der Literatur unter Berücksichtigung insbesondere der schon klinisch eingesetzten Hydroxylapatitmaterialien gewertet.

## **2.3 Versuchstiere und Tierhaltung**

Als Versuchstiere wurden weibliche Chinchilla-Kaninchen mit einem präoperativen Gewicht zwischen 3300 g und 4740 g verwendet. Die Wahl fiel trotz möglicher Einflüsse des Menstruationszyklus auf das weibliche Geschlecht, da männliche Artgenossen aufgrund ihrer Aggressivität nicht einfach zu halten sind. Die Kaninchen wurden zu zweit in Käfigen unter standardisierten Bedingungen (12 Stunden Tag- / Nachtrhythmus bei einer Raumtemperatur von 17 – 19°C und einer Luftfeuchte von 50 %) gehalten. Ernährt wurden die Tiere mit pelletiertem Trockenfutter Altromin® Standard (Altromin Tier-Labor Service GmbH, Lage Lippe, Deutschland) und Wasser ad libitum. Insgesamt wurden 3 Versuchsreihen mit insgesamt 69 Kaninchen (Versuchsreihe 1993: 8 Tiere, Versuchsreihe 1994: 7 Tiere, und Versuchsreihe 1998: 54 Tiere, je 6 pro Material und Liegezeit) untersucht. Die Tierversuche wurden von der entsprechenden Behörde der Berliner Regierung mit den Genehmigungs-Nummern 02272/93 (Versuch 1993/94) und G0274/97 (Versuch 1998) gestattet.

## **2.4 Operationsverfahren**

### **2.4.1 Implantation**

Der Eingriff wurde in Vollnarkose unter Spontanatmung durchgeführt. Hierzu wurde eine Mischung aus dem Anästhetikum Ketamin (Ketanest<sup>®</sup> Parke-Davis, Berlin, Deutschland) mit 65mg/kg Körpergewicht (KG) und dem Muskelrelaxans Rompun<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen, Deutschland) mit 15mg/kg KG intramuskulär (M. gluteus) verabreicht. Es wurde eine präoperative Infektionsprophylaxe durch intramuskuläre Applikation von 7mg/kg KG Gentamicin (Gentamicin 80<sup>®</sup> B.R.A.H.M.S. GmbH, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Ein Austrocknen der Augen während der Narkose wurde durch Bepanthen<sup>®</sup>-Augensalbe (Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) verhindert. Das OP-Feld wurde großzügig und gründlich, unter Vermeidung von Verletzungen der Cutis rasiert. Das übrige Fell wurde mit Verbandsmull abgedeckt. Es erfolgte dann eine chirurgische Hautdesinfektion mit Braunoderm<sup>®</sup> (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Nach steriler Abdeckung des OP-Feldes erfolgte die Inzision an der medialen Seite des distalen Oberschenkels in dessen Längsachse. Die distale Epiphyse des Femurs wurde durch Luxation der Patella nach lateral dargestellt und mittels eines diamantierten Hohlzylinderbohrers ein 4 mm durchmessendes Implantatlager durch Bohrung von ventral nach dorsal geschaffen. Um die Traumatisierung des Gewebes gering zu halten, wurde unter ständiger Kühlung mit physiologischer 0,9 %iger Kochsalzlösung bei geringer Drehzahl gebohrt. Es wurde dann je ein Zylinder gepressten Apatits nicht pressfit (locker im Implantatbett liegend) eingebracht. In der Höhe endeten die Zylinder kurz unterhalb des patellaren Gleitlagers. Das Implantatbett wurde nicht mit einem Knorpel- / Knochendeckel verschlossen. Nach Reposition der Patella und deren Fixierung an dem medial durchtrennten Bandapparat mit Vicryl<sup>®</sup> (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) der Fadenstärke 3-0, schichtweiser Wundverschluß mit Vicryl 3-0. Für die Hautnaht wurde Mersilene<sup>®</sup> (Ethikon GmbH) der Fadenstärke 3-0 verwendet. Postoperativ wurden die Wunden lokal antibiotisch mit Nebacetin<sup>®</sup>-Puder (Yamanouchi Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland) behandelt, und die Tiere erhielten eine einmalige systemische Analgesie durch intramuskuläre Applikation von 330 mg/kg KG des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Aubikal<sup>®</sup> (Atarost, Twistring, Deutschland). Alle Kaninchen wurden beidseitig operiert. In der Versuchsreihe 1993 mit nur einer Liegezeit (28 Tage) wurden pro Material von je 2 Kaninchen die Proben lichtmikroskopisch untersucht

(n = 4) und von je einem Kaninchen die Proben elektronenmikroskopisch untersucht (n = 1), somit blieb ein Knie unaufgefüllt als Kontrolle. In der Versuchsreihe 1994 mit nur einer Liegezeit (28 Tage) wurden pro Material je 2 Kaninchen operiert, wobei 2 Proben auf die Lichtmikroskopie und je eine auf Elektronenmikroskopie und In-situ-Hybridisierung (ISH) entfielen. Für das Material Poly-L-Lysin-Organopapatit wurde noch ein 3. Kaninchen operiert, wobei nur ein Implantat eingesetzt wurde, welches für die Lichtmikroskopie aufgearbeitet wurde. Die gegenüberliegende Seite diente als Kontrolle. In der Versuchsreihe von 1998 wurde pro Versuchsreihe bei einem Kaninchen zur Kontrolle ein Bohrloch unaufgefüllt belassen. Somit standen pro Material und Liegezeit 11 Proben und eine Kontrolle zur Verfügung. Von jedem Tier wurde eine Probe lichtmikroskopisch untersucht (n = 6). Von den kontralateralen Seiten wurden je 3 Proben der ISH (n = 3) zugeführt, je 1 der Elektronenmikroskopie (n = 1) und je 1 wurde in flüssigem Stickstoff (n = 1) tiefgefroren. Die jeweiligen Leerloch-Kontrollen wurden ebenfalls für die ISH (n = 1) aufgearbeitet.

#### **2.4.2 Explantation**

Nach 7, 28 oder 84 Tagen wurden die Versuchstiere - wie oben beschrieben - tief narkotisiert. Die Zuordnung der Tiere zur entsprechenden Verwendung der Proben war bereits vor der Implantation festgelegt worden. Tiere mit Proben für die ISH wurden vor der Explantation mit 100 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) in Posphat-gepufferter Lösung (PBS) über die Aorta abdominalis perfundiert, um eine möglichst rasche Fixierung des Gewebes und die Inaktivierung von Ribonukleinsäure zersetzenden Enzymen (RNasen) zu erreichen. Nach erfolgter Perfusion, deren Güte am Ablassen und Versteifung der Muskulatur beurteilt werden konnte, wurde das Kniegelenk in o.g. Weise dargestellt, exartikuliert und von angrenzendem Gewebe befreit. Die seitlichen Kortikalisschichten der Femurkondylen wurden abgetragen, um die Diffusion des Fixiermittels und Einbettungsmaterials zu erleichtern. Anschließend wurde das Femur proximal des Implantatbettes durchtrennt und der distale das Implantat enthaltende Anteil des Femur wie unten genannt weiterbearbeitet. Bei allen Tieren trat der Tod in tiefer Vollnarkose ein. Unperfundierte Tiere wurden in tiefer Narkose nach Explantation in einer CO<sub>2</sub>-Box getötet.

Eine Übersicht über Versuchsnummern, Implantatmaterialien, Liegezeiten und Schnitte findet sich in **Tab. 2.3.1** (s. S. 148).

## **2.5 Aufarbeitung der Proben**

### **2.5.1 Lichtmikroskopie**

Die Verfahrensschritte werden in **Tab. 2.5.1** (s. S. 149 ff.) dargestellt. Nach mehrtägigem Aushärten des Kunststoffes in einem 38°C warmen Wasserbad wurden die Kunststoffblöcke getrimmt, d.h. überschüssiger Kunststoff so entfernt, dass die Orientierung der Proben nach Fixierung der Blöcke mittels Technovit® (Kutzer & Co., Wehrheim, Deutschland) auf den Sägetellern mit der gewünschten sagittalen oder horizontalen Schnittrichtung möglichst gut übereinstimmte. Von den Blöcken wurde dann eine Schnittfolge mit einer Innenlochsäge (Modell 1600, Leitz, Wetzlar, Deutschland) gesägt. Von ventral nach dorsal mit aufsteigender Nummerierung, wobei leider aufgrund der schlechten Einschätzbarkeit des Implantatverlaufes von außen (durch Knochen und Kunststoff) die Nummerierung nicht immer mit derselben Lokalisation im Implantatbett übereinstimmt. In der Versuchsreihe 1993 wurden nur frontale, in der Versuchsreihe 1994 je ein sagittaler Schnitt durch das Implantatzentrum und nach dessen Verklebung frontale Schnitte in o.g. Weise angefertigt. In der Versuchsreihe 1998 wurden je 5 Blöcke in frontaler und je einer in sagittaler Schnittführung in o.g. Weise gesägt. Die Schnittdicke betrug ca. 50 µm. Die Schnitte wurden mit Instantbond® (Instantbond, Berlin, Deutschland) auf selbstangefertigten Kunststoffobjektträgern befestigt. Anschließend erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle auf einem halbautomatischen Schleif- / Poliergerät (Exact GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit Naßschleifpapier in aufsteigender Körnung zuerst eine Beseitigung von Oberflächenunebenheiten und dann mit einer 2000er Körnung eine Polierung. Von den so gewonnenen Rohschnitten wurden je 2 Schnitte nach Giemsa (**s. Tab. 2.5.2**) und je 2 Schnitte entweder nach von Kossa / Fuchsin für die Versuche 1993 und 1994 oder von Kossa / Paragon für den Versuch 1998 (**s. Tab. 2.5.3**) mit den entsprechend von Gross und Strunz entwickelten Modifikationen gefärbt [126;127].

### **2.5.2 Elektronenmikroskopie**

Bei den für die Elektronenmikroskopie (EM) vorgesehenen distalen Femura wurde das Implantatbett mit einer diamantierten Trennscheibe eng umschnitten und so überschüssiger umgebender Knochen entfernt. Die distale Hälfte des verbliebenen Blockes wurde geviertelt und randomisiert der Aufarbeitung für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zugeführt. Eine detaillierte Anleitung der

Aufarbeitung findet sich in **Tab. 2.5.4**. Im Anschluß wurden die Proben luftgetrocknet, entgast und auf REM-Probentellern mit Leitsilber befestigt. Frühestens nach 24 Stunden wurden die Proben mit einem Sputter-Gerät (Modell SC 500, Emscope, USA) im Hochvakuum mit Gold-Palladium bedampft. Für den Rückstreu-Elektronen-Modus des REM wurden Schnitte wie für die Lichtmikroskopie gewonnen und aufgearbeitet, die dann wie o.g. mit Leitsilber auf den REM-Probentellern befestigt und besputtert wurden. Neben den aufgearbeiteten Proben wurden zum Vergleich auch nicht implantierte, sterilisierte Proben der Versuchsreihe 1993 für die REM-Untersuchung vorbereitet. Die Untersuchung erfolgte mit einem Philips SEM 505 Rasterelektronenmikroskop bei 20 kV.

Für die TEM-Proben wurden sehr dünne Knochenscheibchen radiär auf das Implantat zugehend geschnitten. Eine detaillierte Anleitung der Aufarbeitung findet sich in **Tab. 2.5.5**. Danach wurden die Proben in Silikonformen eingebettet und in einem Exsikkator bei 70°C und 600-800 mbar Überdruck für 1-3 Tage polymerisiert. Anschließend wurden mit einem Ultramikrotom (Modell Ultracut E, Reichert-Jung / jetzt Leica, Wien, Österreich) Schnitte mit einer Dicke von 80 nm geschnitten und auf mit Formvar<sup>®</sup> (Monsanto Chemical Company, St. Louise, Montana, USA) befilmten Kupfernetzen aufgebracht. Die Untersuchung erfolgte mit einem Philips EM 410 Transmissionselektronenmikroskop.

Eine Übersicht über alle zur Aufarbeitung für die Licht- und Elektronenmikroskopie verwendeten Reagenzien findet sich in der **Tab. 2.5.13**.

### **2.5.3 In-situ-Hybridisierung**

Bei den für die In-situ-Hybridisierung (ISH) vorgesehenen distalen Femura wurde das Implantatbett mit einer diamantierten Trennscheibe zu einem ca. 1 x 1 x 1 cm messenden Knochenquader umschnitten und von ventral nach dorsal gedrittelt in ca. 3 mm starke Scheiben und mit V (Vorne), M (Mitte) und H (Hinten) benannt. Die folgende Prozessierung der Proben fand unter RNase freien Kautelen statt. Die Proben wurden in 4% PFA/PBS fixiert und über 10d in 10% EDTA in PBS, pH 7,4 unter täglichem Lösungswechsel bei Raumtemperatur entkalkt. Die Einbettung erfolgte in Paraffin. Nach vorherigem Anfrieren der Blöcke wurden Schnitte einer Dicke von 5 µm mit einem halbautomatischen Mikrotom (HM 330, Leica, Wien, Österreich) angefertigt. Bei nicht ausreichender Entkalkung wurde mit 10% EDTA in PBS, pH 7,4 die Schnittfläche über wenige Stunden nachentkalkt. Die Paraffinschnitte wurden in ein warmes, RNase-armes Wasserbad (DEPC-Wasser, 30-40°C)

überführt und auf APES/Glutaraldehyd-beschichtete, RNase-freie Glasobjektträger aufgezogen, mit folgender Trocknung über 12 - 24 Stunden bei 37°C.

Mit dieser Methode wurde versucht, messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), den zentralen intrazellulären Botenstoff der Proteinbiosynthese, verschiedener Proteine semiquantitativ darzustellen. Es wurden Sonden für humanes  $\alpha 1$ -Prokollagen, Transforming Growth Factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), bovines Osteonektin (bON) und murines Osteopontin (mOP), die eine wichtige Rolle im Intermediärstoffwechsel des Knochens einnehmen, gewählt (s. **Tab. 2.5.6**). Das Prinzip dieser Nachweismethode beruht darauf, dass „in situ“, also in den Zellen des entsprechenden Schnittes, spezifische (einzelssträngige) RNA-Transskripte sich mit komplementären, markierten Basensträngen zu einem Doppelstrang zusammenlagern können (Hybridisierung). Dieser ist dann durch das einzelstrangzersetzende Enzym RNase nicht mehr verdaubar, welches nun gezielt eingesetzt wird, um überschüssige markierte RNA zu verdauen und aus dem Gewebe als Hintergrund zu eliminieren. Bei den verbliebenen doppelsträngigen Abschnitten wird nun der mit Digoxigenin oder mit radioaktivem Schwefel ( $^{35}\text{S}$ ) markierte Anteil durch eine Farbreaktion bzw. durch Autoradioaktivität und indirekten Nachweis mit Belichtung einer aufgetragenen Fotoemulsion semiquantitativ nachgewiesen. Die einzelnen Unterschritte werden in den **Tab. 2.5.7 bis 2.5.11** zusammengefaßt und nachfolgend kurz erläutert. Die Verfahrensschritte wurden nach einem Protokoll von Angerer et al. [128] mit Modifikationen nach Milani / Herbst et al. [129] wie publiziert übernommen und für die speziellen Gegebenheiten der ISH an Knochen durch die Arbeitsgruppe Gross, wie von Neo et al. beschrieben [130;131], modifiziert.

### **2.5.3.1 Herstellung der RNA-Sonden**

Die Herkunft der Sonden mit Angaben über die Klonierung, Länge und Orientierung der Inserts sind in **Tab. 2.5.6** aufgeführt.

#### **2.5.3.1.1 Klonierung und Linearisierung**

Die Sonden wurden kloniert, d.h. alle Plasmide mit subklonierten cDNA Fragmenten wurden in E.coli transformiert und nach Standardmethoden vermehrt (Vermehrung in Plasmiden mit Antibiotika-Resistenz in Wirtsorganismus), aufgereinigt und in zwei Ansätzen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (Linearisierung) [132]. In einem 1% Agarosegel wurde die Vollständigkeit der Linearisierung kontrolliert (s. **Tab. 2.5.7**).

Die Nukleinsäuresequenz der Sonden wurde mit einem DNA Sequencer (373 Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) bestimmt und durch Vergleich mit Literaturangaben verifiziert. Klonieren und Sequenzieren war nicht Teil dieser Arbeit.

#### **2.5.3.1.2 In vitro Transkription**

Die Verfahrensschritte werden in **Tab. 2.5.8** dargestellt.

Die Polymerasen werden nach Lokalisation und Orientierung der Sonden ausgewählt (**s. Tab. 2.5.6**). Zur Markierung wird Uraciltriphosphat (rUTP), das entweder mit radioaktivem Schwefel ( $^{35}\text{S}$ , ein  $\alpha$ -Strahler) oder mit einem an die Schwefelgruppe angehängten Digoxigenin-Molekül markiert wird, verwendet. Die  $^{35}\text{S}$ -markierten RNA-Sonden wurden mittels Phenolextraktion und Äthanolpräzipitation nach Standardmethoden aufgereinigt [128]. Anschließend Kontrolle der Transkription im Minigel (1% Agarose). Die  $^{35}\text{S}$ -Sonden hatten eine durchschnittliche erzielte Aktivität von  $1,3 - 1,9 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{l}$ , wurden mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  mit 10 mM DTT resuspendiert und innerhalb von 14 Tagen verwendet.

#### **2.5.3.1.3 Alkalische Hydrolyse**

Um eine optimale Gewebedurchdringung der RNA-Sonden zu erreichen, wurde die Transkriptlänge durch kontrollierte alkalische Hydrolyse auf 100 bis 150 Nukleotide eingestellt. Die Verfahrensschritte werden in **Tab. 2.5.9** dargestellt. Die Hydrolysedauer wurde nach der Gleichung von Cox et al. [128] berechnet.

$$t = L_0 - L_f / k \times L_0 \times L_f$$

t= Hydrolysezeit,  $L_0$  = Anfangslänge des RNA-Transkripts in kb (Kilobasen),  
 $L_f$ = gewünschte Endlänge des Transkripts in kb,  $k = 0,11$  kb/Minute

#### **2.5.3.2 Nicht-radioaktive ISH**

Die In-situ-Hybridisierung wird über 2 Tage durchgeführt und gliedert sich in einen RNase-freien ersten Teil bis einschließlich der Hybridisierung und einen nicht RNase-freien 2. Teil. Die Verfahrensschritte werden in **Tab. 2.5.10** sowie **2.5.11** dargestellt. Eine Übersicht über alle für die In-situ-Hybridisierung verwandten Reagenzien findet sich in der **Tab. 2.5.14**.



### **2.5.3.3 Kontrollen**

Bei der Herstellung der markierten Sonden wurden sowohl sense- als auch anti-sense-RNA-Transkripte hergestellt. Zur Kontrolle der Spezifität des nachgewiesenen Signals wurden bei allen Experimenten und Sonden jeweils 1 Schnitt pro Versuch mit dem <sup>35</sup>S- oder Digoxigenin-markierten sense-RNA-Transkript hybridisiert. Diese zeigten alle nur einen minimal, gleichmäßig über das Präparat verteilten Hintergrund und keine spezifischen Signale, die im Vergleich hierzu eine charakteristische Verteilung und eine deutlich höhere Konzentration über den markierten Zellen aufwiesen. Dass es sich bei den Zielmolekülen um RNA handelt, wurde durch das Verschwinden des Signals nach Inkubation der Schnitte in Micrococcus Nuclease (50 µg/ml in 10 mM Tris-Puffer pH 8,8 und 1 mM CaCl<sub>2</sub>) vor Durchführung der ISH bestätigt.

### **2.5.3.4 Radioaktive ISH**

Die radioaktive ISH war nicht Teil dieser Arbeit und soll daher nur kurz gestreift werden. Sie wurde an Osteoblastenkulturen und Schnitten des Versuchs 1998 durchgeführt und sollte semiquantitativ das zeitliche Exprimierungsmuster der oben genannten mRNA-Sonden zeigen. Die Verfahrensschritte werden in **Tab. 2.5.10** sowie **2.5.12** dargestellt. Der 2. Tag unterscheidet sich durch erheblich höheren Waschaufwand zur Vermeidung von Hintergrundradioaktivität. Die positiven Zellen konnten durch die Akkumulation von schwarzen Silberkörnchen (Grains) im Bereich der Fotoemulsion über den Zellen identifiziert werden.

## **2.6 Auswertung**

Die Reaktion auf Fremdkörper in lebenden Organismen lassen sich in Veränderungen am eingebrachten Material (Materialantwort) und die Reaktion des Körpers / umliegenden Gewebes (Gewebeantwort) untergliedern. Beide bedingen sich gegenseitig, haben aber auch ihre eigenen Variablen. Sie lassen sich qualitativ und quantitativ (morphometrisch) erfassen. Die Parameter und Kriterien der Beurteilung werden nachfolgend erläutert. Besonders berücksichtigt wurde das Interface, die Kontaktzone zwischen Implantat und Gewebe.

Um bei im Tierversuch kleinen Fallzahlen Fremdeinflüsse möglichst gering zu halten, wurden Standardbedingungen geschaffen (ein bewährtes Tiermodell, erfahrene Operateure,

standardisierte Aufarbeitungs- und Auswertungsbedingungen). Trotz der sorgfältigen Verarbeitung konnten einige wenige Proben nicht ausgewertet werden, welche nachfolgend unter Angabe der Ursache einzeln genannt werden. Die unten genannten Parameter wurden jeweils zwischen den Materialien über die Zeit und unter den Versuchen (1993, 1994, 1998) verglichen. Es wurden die Schnittfolge, Orientierung im Schnitt, Gewichts Differenz der Tiere prä- / postoperativ und ggfs. Heilungsstörungen oder OP-Komplikationen einbezogen. Im weiteren wurden Daten zur Optimierung des Tiermodells gesammelt.

### **2.6.1 Makroskopische Auswertung**

Beurteilt wurden das makroskopische Erscheinungsbild des Implantats und der Gewebereaktion bei Implantation und Explantation.

### **2.6.2 Auswertung der Lichtmikroskopie**

Es wurde pro Präparat ein Minimum von 4 Schnitten angefertigt. Die Zahl der Präparate und die Liegezeiten waren bei den Versuchen unterschiedlich. Bei der Auswertung mußte ein Implantat (97-1060, PLL-OA, 84d, Lichtmikroskopie) wegen fehlerhafter Beschriftung ausgeschlossen werden. Die Implantate 93-1021R und 93-1021L (Indo-OA, 28d, Lichtmikroskopie) zeigten eine sekundäre Infektion bei schon bestehender Knochenbindung und mußten auch ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Versuchsreihe 1994 sind nur eingeschränkt verwertbar, da der Implantatdurchmesser ca. 1 mm kleiner war als das Bohrloch und so die Implantate instabil im Implantatbett lagen. Es wurden im Versuch 1993 für die Unterversuche 93-104I und 93-104II je 20 Schnitte, im Versuch 93-104III aufgrund der o.g. Infektion bei 2 Implantaten nur 10 Schnitte vermessen. Im Versuch 1994 für die Unterversuche 94-125 wurden 15 Frontalschnitte und 4 Sagittalschnitte, für die Unterversuche 94-124 9 Frontalschnitte und 2 Sagittalschnitte sowie für die Unterversuche 94-123 11 Frontalschnitte und 2 Sagittalschnitte vermessen. Für den Versuch 1998 wurde aus jedem Präparat eine Schnittfolge von ca. 7 Schnitten angefertigt, davon wurden 4 Schnitte ausgesucht und vermessen, wobei versucht wurde, die Schnitte gleichmäßig der Schnittfolge zu entnehmen. Ein Schnitt wurde für den Backscatter-Mode der Elektronenmikroskopie verwendet und 2 Schnitte als Ersatzschnitte. Pro Material und Liegezeit wurden somit 24 Schnitte vermessen, bis auf den Unterversuch 97-110, wo wie o.g. nur 20 Schnitte ausgewertet werden konnten. Jeweils 4 Schnitte (= 1 Implantat) pro Material und Liegezeit

wurden sagittal, der Rest frontal geschnitten. Die lichtmikroskopischen Proben wurden qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die Messungen wurden mit der modifizierten Software Morph<sup>®</sup> (Systec, Berlin, Deutschland) durchgeführt [133]. Als Hardware diente ein handelsüblicher PC mit Matrox<sup>®</sup> Grafikkarte (Rauscher GmbH, München, Deutschland), die mit einer handelsüblichen Sony-Video-Kamera verbunden war, über die mit Hilfe eines Leitz Orthoplan Foto-Mikroskops die zu vermessenden Bildausschnitte eingespielt wurden.

### **2.6.2.1 Parameter zur Auswertung der Gewebeantwort**

#### **2.6.2.1.1 Qualitative Gewebeantwort**

Beurteilt wurden neben dem Gesamterscheinungsbild insbesondere das Ausmaß und Vorliegen von Entzündungszeichen (Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten), Abbau und Einbau von durch das Implantationstrauma entstandener Gewebe- und Zelltrümmer sowie Vaskularisation und Gefäßneubildung im Implantatbett. Hinsichtlich der knöchernen Integration wurde die Art des knöchernen Einbaus (primäre oder sekundäre Knochenbildung), die Knochenart und das Knochenalter (Zellreichtum, Organisation), die Knochen- / Osteoid-Haftung bei aufarbeitungsbedingter Spaltbildung im Interface bestimmt. Die Trabekelarchitektur um das Implantat, die Art der Knocheninsertion auf dem Implantat (ringförmig, bälkchenartig) und die Knochenbildungsaktivität wurden bewertet. Als Zeichen einer erhöhten Implantatmobilität wurde nach der Ausbildung von Pseudoganglien geschaut. An den Sagittalschnitten wurde die Regeneration des Knorpel- und Knochendefekts des subpatellaren Gleitlagers beurteilt.

#### **2.6.2.1.2 Quantitative Gewebeantwort**

Es wurde der Anteil in Prozent an der gesamten Implantatzirkumferenz von Knochen-, Osteoid-, Chondroid- und Weichgewebekontakt bestimmt (s. **Abb. 3.1.33**, s.S. 111). Als Parameter der zellulären Degradierbarkeit bzw. Fremdkörperreaktion / Bioverträglichkeit wurde die Anzahl der gesamten multinukleären Riesenzellen am Interface bestimmt. Es erfolgte eine morphologische Subspezifizierung in Fremdkörperriesenzell-ähnliche Zellen (riesige Zellsynzytien, s. **Abb. 3.1.13 u. 3.1.28**) und Osteoklasten-ähnliche Zellen u.a. geringere Zellgröße, geringere Mehrkernigkeit, Sitz in Lakune mit Auslaugungszone (vom Knochen als Howshipsche Lakune bekannt), Polarität (v.a. elektronenmikroskopisch) mit

apikaler Sekretionszone und basaler Resorptionszone, Bürstensaum als aktive extrazelluläre Knochenresorptionszone mit umgebender Haftzone, die das subzelluläre Kompartiment abgrenzt (**s. Abb. 3.1.14 u. 3.1.15**). Für die letztere und die folgenden sehr zeitaufwendigen Messungen wurde jeweils nur die Hälfte der Schnitte (also 2) pro Implantat und Liegezeit des Versuches 1998 ausgewertet, wobei versucht wurde, diese Schnitte in der Schnittfolge möglichst weit auseinander zu wählen. Um einen Vergleich mit den Vorversuchen herstellen zu können, wurde jeweils 1 Schnitt pro Implantat des Versuches 1993 mit von Kossa/Paragon nachgefärbt und auch nach den gleichen Kriterien ausgewertet. Es wurde die Lokalisation des maximalen Knochenkontaktes bestimmt und Lokalisation sowie Ausmaß (Länge und Dicke) bindegewebiger Umscheidung am Interface vermessen (**s. Abb. 3.1.9 u. 3.1.11**).

## **2.6.2.2 Parameter zur Auswertung der Materialantwort**

### **2.6.2.2.1 Qualitative Materialantwort**

Beurteilung der Brüchigkeit sowie Veränderungen des Implantatmaterials, welche für Veränderungen der Implantatstabilität wichtig sind (**s. Abb. 3.1.35**). Hier wurde insbesondere auf Kalzifizierung, welche sich in einer Schwarzfärbung in der Kossa/Paragon-Färbung zeigte (**s. Abb. 3.1.15 u. 3.1.26**), Dekalzifizierung, welche umgekehrt zu einer Aufhellung führte (**s. Abb. 3.1.15**), Veränderung der Implantatstruktur, mit Spalt- und Bruchbildung, sowie Proteineinlagerung an Weichgewebe- / Knochenkontakt oder Lakunen, welche zu einer Verfärbung führten (**s. Abb. 3.1.8**), geachtet. Es wurde nach Implantatabrieb / -präzipitaten im umliegenden Gewebe gesucht, als Zeichen eines Bewegungsartefakts oder von Dissolution mit erneuter Präzipitation (**s. Abb. 3.1.12**). Es erfolgte eine Beurteilung der Implantate in polarisiertem Licht, um evtl. fluoreszierende Polymerstrukturen nachweisen zu können.

### **2.6.2.2.2 Quantitative Materialantwort**

Für die folgenden sehr zeitaufwendigen Messungen wurden, wie oben ausgeführt, jeweils nur 2 Schnitte pro Implantat und Liegezeit des Versuches 1998 und jeweils 1 Schnitt pro Implantat des Versuches 1993 ausgewertet.

Hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit wurde die degradierte Implantatoberfläche, welche v.a. durch azelluläre, weniger zelluläre Prozesse entstanden war, in Kontakt mit den verschiedenen Gewebearten vermessen. Als Kriterien galten: veränderte, rauhe Oberflächen mit abgelösten kleineren Implantatkrümeln mit Degradationszeichen, mit Lakunen, mit

Zeichen der Auslaugung, in diesem Zusammenhang ggfs. mit Besatz von resorbierenden Zellen sowie oberflächlicher Rißbildung (**s. Abb. 3.1.8 u. 3.1.36**). Davon strikt zu trennen waren artifizielle Abbruchzonen durch Aufarbeitung oder Einbringen des Implantates, die sich durch eine scharfe, glatte Bruchkante unterschieden. Diese wurden in Prozent der beurteilbaren Implantatoberfläche, welche sich aus der gesamten degradierten und intakten Implantatoberfläche ergab, angegeben. Diese hinsichtlich Degradation „beurteilbare Implantatoberfläche“ unterschied sich um den Betrag der „nicht beurteilbaren Oberfläche“ z.B. durch Aufarbeitungsartefakte, wie Abbruch oder Blasenbildung, von der gesamten Implantatoberfläche und lag allen Berechnungen von Parametern in Zusammenhang mit degradierter Oberfläche zugrunde. Die beurteilbare Implantatoberfläche lag im Mittel bei 90% der gesamten Implantatoberfläche. Es wurden die auf degradierter Oberfläche inserierenden Gewebearten bestimmt und in Prozent der gesamten degradierten Implantatoberfläche als auch in Prozent des jeweiligen gesamten Gewebekontaktes zu beurteilbarer Implantatoberfläche angegeben, um das Degradationsverhalten und das Bindungsverhalten in Abhängigkeit von der Gewebeart zu untersuchen.

Als Marker der zellulären Degradation und somit der biologischen Degradierbarkeit wurde die Lakunenanzahl, -länge und -fläche, bezogen auf Weichgewebe- oder Knochen- / Osteoidkontaktzonen, an hinsichtlich Degradation beurteilbarem Interface bestimmt und pro Millimeter der jeweiligen Oberfläche angegeben. Morphologisch mußten die Lakunen der typischen Form entsprechen, möglichst mit Riesenzellen besetzt sein und im Bereich der Lakune eine Auslaugung des Implantates zeigen (**s. Abb. 3.1.15 u. 3.1.32**). Es wurden dann die durchschnittliche Lakunenlänge und -fläche berechnet, um eine Materialabhängigkeit bestimmen zu können unter der Annahme, dass Degradation durch Fremdkörperriesenzellen v.a. zu größeren und flacheren Lakunen (**s. Abb. 3.1.36**) und Degradation durch Osteoklasten v.a. zu kleineren, tieferen Lakunen führt (**s. Abb. 3.1.32**).

Die Auswaschung der organischen oder anorganischen Implantatkomponente wurde anhand der Auslaugung, d.h. der Aufhellung und Veränderung des Färbeverhaltens des Implantates unter Verlust der präzipitierten Struktur von 4 Implantatseiten (medial / lateral oder ventral / dorsal je nach Schnittrichtung sowie proximal / distal) vom Implantatrand vermessen und in Prozent des jeweiligen Durchmessers angegeben und über das Implantat gemittelt (**s. Abb. 3.1.11, 3.1.18, 3.1.33 u. 3.1.34**).

Eine Übersicht der morphometrischen Messparameter findet sich in **Tab. 2.6.1** (s. S. 164 f.).

### **2.6.2.3 Auswertung in Bezug auf die Aufarbeitungstechnik**

Anzahl und Lokalisation von Blasen durch Implantataufarbeitung (s. **Abb. 3.1.31**) über die Zeit, unter den Materialien und den Versuchen sowie in Abhängigkeit von der Perfusion mit Paraformaldehyd/PBS und dem Explantations- / Aufarbeitungsverfahren.

### **2.6.3 Auswertung der Elektronenmikroskopie**

Es wurden die elektronenmikroskopischen Proben (TEM und SEM) qualitativ hinsichtlich der Material- und Gewebeantwort ausgewertet. Die Proben 93-1017R (HEMA-OA 28d) und 98-1007 (Indo-OA 84d) waren nur eingeschränkt auszuwerten für TEM, da kein sicherer Anschnitt des Interfaces trotz mehrmaligen Nachschneidens gefunden werden konnte.

### **2.6.4 Auswertung der In-Situ-Hybridisierung**

Die In-Situ-Hybridisierungs-Proben wurden qualitativ ausgewertet. Die quantitative Auswertung war nicht Teil dieser Arbeit. Aufgrund der Aufarbeitung (mangelnde Entkalkung, fehlende Probe durch Verschnitt) konnten die Proben 97-1057L-H (PLL-OA 84d), 98-1004R-M (HEMA-OA 84d), 98-1022R-H (HEMA-OA 28d), 98-1033L-V (Indo-OA 28d) und 98-1038R-M (PLL-OA 7d) nicht ausgewertet werden.

Nur mit der  $\alpha 1$ -Prokollagen-Sonde war eine positive Signalantwort zu erzielen. Für die übrigen Sonden war entweder die Übereinstimmung der Basensequenzen nicht hinreichend, die exprimierten Mengen zu den Sektionszeitpunkten zu gering oder es kam bei geringeren Konzentrationen (im Vergleich zu Prokollagen) im Knochen vor oder während der Aufarbeitung (insbesondere bei der Entkalkung) zu einem Abbau, der die Nachweisgrenze unterschreiten ließ. Es wurde je 1 Schnitt pro Ebene, Implantat, Material und Liegezeit ausgewertet. Die Anzahl von negativen (blauen) inaktiven und  $\alpha 1$ -Prokollagen-positiven (roten) aktiven Osteoblasten wurde zwischen den Liegezeiten, unter den Materialien und mit den Leerlochkontrollen verglichen.

### **2.6.5 Statistische Auswertung**

Durch die oben erläuterte Art der Aufarbeitung und Schnittführung konnten die Schnittebenen nicht von vornherein festgelegt und auch nicht per Zufallsverfahren ausgewählt werden,

sondern lagen von Implantat zu Implantat unterschiedlich. Festgelegt wurde für alle Tiere in den Versuchen 1993 und 1998 allerdings dieselbe Anzahl von Schnitten. Da die Verteilung der verschiedenen Gewebe über das gesamte Implantat unterschiedlich war, z.B. bei Knochenkontakt ein Gradient von ventral nach dorsal bestand, erschien es sinnvoll, alle Schnitte in die Auswertung mit einzubeziehen, um möglichst wenig Information zu verlieren. Ein histologischer Schnitt wurde somit für die Auswertung als statistische Einheit definiert. Dies stellte insofern kein Problem dar, als die Anzahl einbezogener Schnitte pro Tier gleich war. Im Versuch 1994 war PLL-OA zwar somit stärker repräsentiert, die Ergebnisse dieses Versuchs wurden jedoch aufgrund des o.g. methodischen Problems nur eingeschränkt gewertet.

Als Nullhypothese wurde definiert, dass sich die nach Material und Liegezeit geordneten Gruppen bezüglich der untersuchten Parameter nicht unterscheiden. Als Alternativhypothese wurde definiert, dass sich die nach Material und Liegezeit geordneten Gruppen bezüglich der untersuchten Parameter unterscheiden. Als Signifikanzniveau galt  $\alpha < 0,05$ . Unterschreitungen des kritischen Wertes von  $\alpha = 0,1$  wurden als Trend gewertet.

Bei normal verteilten Daten wurden parametrische Tests (Unianova, gepaarter T-Test) eingesetzt. Bei Daten, die nicht normal verteilt waren, wurden zur Prüfung der Unterschiede auf statistische Signifikanz nonparametrische Testverfahren eingesetzt. Die Testwahl fiel hier bei mehr als 2 unabhängigen Gruppen nicht normal verteilter Daten auf den Kruskal-Wallis-Test. Zeigten sich hier signifikante Unterschiede, wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests in den nächsten Schritten jeweils 2 der Gruppen auf Signifikanz getestet. Bei normal verteilten Variablen kam die Unianova zur Anwendung und zur weiteren Analyse der Gruppen gegeneinander der Duncan-Test. Zur Analyse von abhängigen Daten (z.B. verschiedene Gewebe am selben Implantat) wurde bei nicht normal verteilten der Wilcoxon Test und bei normal verteilten der gepaarte-T-Test benutzt. Bei vermuteter Zunahme der Veränderungen über die Zeit erfolgte die Testung mit Hilfe des Jonckheere-Terpstra-Tests. Bei einem signifikanten Unterschied wurden die einzelnen Liegezeiten gegeneinander mit dem Mann-Whitney-U-Test getestet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS<sup>®</sup> für Windows Version 10,0 (SPSS inc., Chicago, USA).