

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden mit Genehmigung des Tierversuchsvorhabens durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (Genehmigungsnummer G 0036/04) 32 männliche Sprague Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 410-460 g verwendet. Die Tiere wurden in den Laboren der Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland aufgezogen. Sowohl die Tierhaltung als auch die Versuchsdurchführung erfolgten in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, mit Ausnahme der in-vitro Zellexpansion. Diese erfolgte im Zelllabor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité (CMSC), Campus Mitte, Berlin.

3.1.1 Haltung und Fütterung

Die Tiere wurden während der Versuchsdauer zunächst in Gruppen von bis zu fünf Ratten in Makrolonkäfigen (Typ IV) mit einer Bodenfläche von 1800 cm² und einer Höhe von 19 cm gehalten. Nach der Osteotomie wurden sie einzeln in 18 cm hohen Käfigen mit einer Bodenfläche von 810 cm² (Typ III) untergebracht, um eine gegenseitige Manipulation der Wunden zu vermeiden. Die Ratten waren einem künstlichen Tag/Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden bei einer Temperatur von 21 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70 % ausgesetzt. Als Nahrung erhielten sie Alleinfuttermittel (sniff-Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum. Wasser stand ihnen durch eine Selbsttränke ebenfalls ad libitum zur Verfügung. Als Einstreu diente ein staubfreies Weichholzgranulat (Rettenmaier und Söhne GmbH und Co. KG, Rosenberg, Deutschland). Die Käfige wurden einmal wöchentlich, Wasser und Futter täglich gewechselt.

3.1.2 Gruppeneinteilung

Wie der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen ist, wurden die 32 am Versuch beteiligten Tiere randomisiert in zwei Gruppen zu jeweils 16 Tieren eingeteilt. Die Gruppeneinteilung erfolgte entsprechend der Applikation in den Osteotomiespalt. Dabei wurde bei den Tieren der MSC-Gruppe (MSC= mesenchymal stem cell) eine Injektion autologer mesenchymaler Stammzellen in den Osteotomiespalt vorgenommen. Die Tiere der Medium-Gruppe erhielten lediglich das Kultivierungsmedium. Diese Gruppe dient der Kontrolle. In beiden Gruppen

erfolgte entsprechend der jeweiligen histologischen Aufarbeitung und Untersuchung eine nochmalige Unterteilung in je zwei Subgruppen á 8 Tiere. Die Tiere beider Gruppen unterschieden sich nicht bezüglich Alter und Gewicht.

	Anzahl der Tiere	
	Gruppe	
Subgruppe	Medium	MSC
Einbettung in polymerisierten Methylmetacrylat (PMMA)	8	8
Einbettung in Paraffin	8	8

Tab. 1: Gruppeneinteilung

3.2 Operatives Vorgehen und in vitro-Zellexpansion

3.2.1 Knochenmarkentnahme

Vor der Knochenmarksentnahme erfolgte die Selektion der Versuchstiere entsprechend ihres Gewichtes. Für die Knochenmarksentnahme kamen nur Tiere mit einem Körpergewicht von 410-460 g in Betracht. Zur Gewichtserfassung wurden die Ratten in eine Schale gesetzt und mit einer Feinwaage gewogen (Sartorius TE 6100, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Tiere, die nicht im vorgesehenen Gewichtsfeld lagen, wurden vom Versuch ausgeschlossen.

Präoperativ erhielten die Tiere eine 3,5 % Isofluran-Inhalationsnarkose (Forene[®], ABBOTT GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Dem Narkosegas wurden zusätzlich 0,6 l/min Sauerstoff und 0,4 l/min Lachgas zugeführt. Die Ratten wurden zunächst in eine mit einem Deckel verschließbare durchsichtige Tupperware-Schale gesetzt, so dass der Narkoseeintritt adspektorisch festgestellt werden konnte. In diese Schale wurde das Narkosegas durch einen Schlauch aus dem Inhalationsgerät (STEPHAN-Respirator ABV, F. Stephan, Gackebach, Deutschland) geleitet. Nach Eintritt der Anästhesie wurden die Tiere auf einen fahrbaren OP-Beitisch gelegt. Während der gesamten Knochenmarkentnahme wurden die Ratten mit dem Narkosegas-Gemisch über eine Gesichtsmaske beatmet. Vor der Entnahme des Knochenmarks wurde die rektale Körpertemperatur mit einem digitalem Thermometer (Momento, Wertheim, Deutschland) ermittelt, die physiologischerweise zwischen 37,5-

38,5 °C liegt. Nachdem die Ratten auf den Rücken gelegt wurden, erfolgte nach Trockenrasur des rechten Knies und des entsprechenden Unterschenkels, die Desinfektion des rasierten Bereiches mit Braunoderm[®] (Polividon-Iod-haltige Lösung, Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland) und die Kennzeichnung der Tiere mit einer wasserfesten fortlaufenden Nummerierung auf dem Schwanz.

Nach Abschluss der Operationsvorbereitungen erfolgte mit einem Einmal-Skalpell (No 15, Feather[®], Japan) ein ca. 1 cm langer Hautschnitt medio-ventral der rechten Tuberositas tibiae bis auf den Knochen. Gegebenenfalls musste die dort vorhandene Muskulatur nach lateral verlagert werden. Die Tuberositas tibiae wurde etwas lateral im Winkel von 45° nach distal mit einem Kugelfräser (ca. 1 mm Durchmesser, Fa. Proxoon, Niersbach, Deutschland) oder alternativ mit einem Diamantkugelschleifstift gleichen Durchmessers (Fa. Proxoon) aufgebohrt. Im Anschluss wurde eine 22G Kanüle (BDTM GmbH, Deutschland), die auf eine 1 ml Einmalspritze (BD PlastipackTM, Madrid, Spanien) gesetzt wurde, unter vorsichtigem Druckaufwand durch den Kortex der Tuberositas tibiae geschoben. Die Spritze wurde vor dem chirurgischen Eingriff mit ca. 0,2 ml Medium (α -DMEM (Invitrogen, Cambrex) + 10% FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 1% Penicillin/Streptomycin) gefüllt. Das eventuell dabei austretende Hämatom wurde unter vorsichtigem Vorwärtsschieben der Kanüle aspiriert. Sobald die Kanüle leichter durch den Knochen glitt, konnte davon ausgegangen werden, dass sie sich in der Knochenmarkhöhle befand. Nun erfolgte die Aspiration des Knochenmarks, wobei unter zusätzlichem Hin- und Herschieben der Kanüle weiteres Knochenmark gewonnen wurde. Das gewonnene Material wurde unmittelbar im Anschluss in ein steriles 15 ml Falcon-Tube (BD^{TD}, Franklin Lakes, USA), in dem sich weitere 5 ml Medium befanden, umgefüllt. Das Leerspülen der Spritze erfolgte durch vorsichtiges aspirieren und ausspritzen des Mediums. Abschließend wurde die Haut mit einem nicht resorbierbaren Faden (3-0 Prolene[®] mit Nadel, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) durch Einzelknopfnahte verschlossen. Während des gesamten Eingriffes wurden die Vitalfunktionen (Kreislauf und Atmung) adspektorisch und ggf. auch palpatorisch überwacht. Das Gewicht und die rektal gemessene Körpertemperatur wurden in einem Laborbuch sowie in einer elektronischen Datenbank festgehalten.

3.2.2 Zellexpansion in vitro

Die Aspirat-Medium-Suspension wurde unverzüglich unter sterilen Kautelen im Zelllabor des CMSC in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc[®], Roskilde, Dänemark) gesät und bei 37 °C bebrütet (95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂). Ziel der in-vitro Expansion war die Vermehrung

der MSCs auf ca. zwei Millionen Zellen pro Tier. Am zweiten Kultivierungstag wurden Zellen, die nicht am Boden der Kulturflasche adhärten, zusammen mit dem Medium abgenommen. Anschließend erfolgte ein einmaliges Spülen der Zellen mit PBS (Phosphatpuffer, Dulbecco's PBS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), bevor die Kultivierungsflaschen mit frischem Medium (37 °C) befüllt wurden. Dabei wurden pro cm^2 Flaschenboden 0,2 ml Medium substituiert, so dass eine 25 cm^2 -Flasche insgesamt mit 5 ml Medium befüllt wurde. Am vierten Kultivierungstag erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % wurden die MSCs gesplittet. Das Splitten ist notwendig, da die Zellen die stärkste Expansion bei einer Dichte von $2,5 \times 10^3$ Zellen/ cm^2 Flaschenboden aufweisen. Da sich die mesenchymalen Knochenmarkszellen der Ratten als sehr proliferationsfreudig erwiesen, wurde diese Konfluenz z. T. schon am vierten Tag erreicht. Zum Splitten wurden die Zellen zweifach mit PBS (Raumtemperatur, ca. $\frac{1}{2}$ des Mediumvolumens) gewaschen (dient der Entfernung des Trypsin-alpha-1-Protease-Inhibitor-Komplexes) und durch 4-minütige Inkubation in Trypsin (Konzentration 9 I.U./ml entspricht 130 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Flaschenboden) bei 37 °C vom Untergrund der Kulturflasche gelöst. Der Erfolg der Trypsinierung wurde unter dem Mikroskop (Leitz DMIL, Wetzlar GmbH, Deutschland) bewertet. Um Zellschäden zu vermeiden, sollte nicht zu lange trypsiniert werden. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe des Mediums von mind. der 2,5fachen Menge des Trypsinvolumens gestoppt. Dies ist möglich, da das Medium Trypsinasen beinhaltet, die das Trypsin neutralisieren. Die Zell-Medium-Trypsinsuspension wurde anschließend in ein Falcon-Röhrchen entsprechender Größe pipettiert und die Zellzahl/ml durch ein automatisches Zählsystem (Casy 1 Zellzähl- und Analyse System Modell TT, Schärfe System) gezählt. Dieses System zählt Partikel und bewertet Partikel kleiner als 7,8 μm als Zelltrümmer, Partikel mit einer Größe von 7,8-12,8 μm als tote Zellen und Partikel mit einer Größe von 12,8-100 μm als lebende Zellen. Zur Zellzählung wurden 70 μl der Zellsuspension in 7 ml Casyton-Flüssigkeit (eine komplett teilchenfreie Flüssigkeit) gegeben. Das Gerät errechnet die Zellzahl pro Milliliter, daher muss der ermittelte Wert auf das Gesamtvolumen der Zell-Medium-Suspension hochgerechnet werden. Im Anschluß erfolgte das Aussähen der Zellen bei einer Dichte von etwa $2,5 \times 10^3$ Zellen/ cm^2 und die Zugabe des nötigen Mediumvolumens entsprechend der ermittelten Flaschengröße (25 cm^2 , 75 cm^2 , 175 cm^2 , 300 cm^2). Ab der zweiten Passage erfolgte der Mediumwechsel zweimal wöchentlich. Die Kultivierungsdauer betrug, je nach Wachstumsrate der Zellen zwei bis drei Wochen.

3.2.3 Osteotomie

Fixateur externe

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten monolateralen Fixateur externe handelte es sich um ein nicht-industriegemäß angefertigtes Fixationssystem. Der Fixateur besteht aus zwei Stahlplatten mit einer Dicke von 2,8 mm resp. 1,8 mm, einer Länge von 29 mm und einer Breite von 5 mm. Beide Platten wurden über zwei Schrauben (M 2,5) zu einem Fixateur-Querbalken verbunden. Die dickere der beiden Platten besitzt Gewindelöcher für die Schrauben, sowie eine Kerbe in der Mitte der Platte, die bei der Zelltransplantation als Führungsschiene verwendet wurde. Die dünnere Platte weist Vertiefungen zum Versenken der Schraubenköpfe auf. Beide Platten besitzen vier korrespondierende Kerben für das Einspannen der Kirschner-Drähte (Fa. M. Jagel, Bad Blankenburg, Deutschland). Diese 10 cm langen Drähte haben einen Durchmesser von 1,25 mm. An der Spitze weisen sie ein 10 mm langes Gewinde auf. Der Fixations-Querbalken wurde als Bohrführer für die Kirschner-Drähte verwendet. Das Gesamtgewicht des externen Fixateurs beträgt ca. 5,6 g.

Operatives Vorgehen

Sobald die MSCs eines Tieres auf eine Anzahl von ca. zwei Millionen expandierten, erfolgte die Osteotomie. Den Ratten standen bis zur Operation Futter und Wasser ad libidum zur Verfügung. Präoperativ wurden die Tiere erneut gewogen, um eventuell zu leichte oder zu schwere Tiere von der Operation auszuschließen.

Zur Narkoseeinleitung erhielten die Tiere, wie unter 3.2.1 beschrieben, das Isofluran/Lachgasgemisch. Zum Schutz vor dem Austrocknen der Kornea wurde prophylaktisch Bepanthen-Augensalbe (Jenapharm[®], Deutschland) auf beide Hornhäute aufgetragen. Anschließend wurde die rektale Körpertemperatur gemessen.

Nach Abschluss der Narkoseeinleitung wurden die Tiere auf die rechte Körperseite gelagert. Es folgte eine großzügige Rasur des linken Ober- und Unterschenkels, des Bauches und Rückens bis zum Rippenbogen.

Zur Aufrechthaltung der Narkose erhielten die Ratten i. p. 0,5 ml einer Injektionsnarkose. Diese bestand aus 10 %igem Ketamin (Ursotamin[®], Bernburg, Deutschland) und Rompun[®] (1,0 ml/KGW, Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in einem Verhältnis von 4 : 3. Zur Wahrung der Analgesie wurde ca. fünf Minuten vor dem Hautschnitt 0,05 ml Temgesic[®] (0,1 ml/KGW, Wirkstoff: Buprenorphin) s. c. appliziert. Nach großzügiger Desinfektion des freigeschorenen Operationsfeldes mit

Braunoderm[®] wurden die Tiere in rechter Seitenlage auf den zuvor steril vorbereiteten Operationstisch gelagert. Um eine Unterkühlung während des Eingriffes zu vermeiden, lagen die Tiere auf einer Wärmeplatte, die sich unter dem sterilen Operationstuch (Foliodrape[®], Fa. Hartmann, Heidenheim, Deutschland) befand. Die Tiere wurden anschließend mit einem sterilen Epiduraltuch (Allegiane Santé S. A.[®], Châteaubriant, Frankreich) so abgedeckt, das ausschließlich die linke Hintergliedmaße für Operateur und Assistent sichtbar blieb.

Nach einem lateralen Hautschnitt über die gesamte Femurlänge wurde die subkutane Fascie durchtrennt. Mit einer chirurgischen Schere erfolgte das stumpfe Spreizen der Muskulatur entlang der Fascie, die Adduktoren und Abduktoren trennt (zwischen M. quadrizeps und Kniesehnenmuskulatur). Unter weitgehender Schonung der proximo-lateralen Muskelansätze wurde das Os femoris nach ventral stumpf freipräpariert.

Die Implantation aller Kirschner-Drähte erfolgte senkrecht zur Achse des Femurs. Zur Verankerung des Fixationssystems wurde zunächst mit einem 0,9 mm dicken Bohrer (Fa. Proxoon) das Gewindeloch für den „4“ (distalen) Kirschner-Draht vorgelegt und dieser bikortikal im Knochen mit Hilfe des Handbohrfutters verankert. Der Verbindungsbalken des Fixateurs diente als Schablone für die Lokalisation der folgenden drei Bohrlöcher. Es erfolgte die Bohrung und Implantation des „1“ (proximalen) Kirschner-Drahtes parallel zum „4“ Kirschner-Draht. Beide Drähte wurden nach der Implantation mit einem Bolzenschneider gekürzt. Anschließend wurden die Löcher für die Kirschner-Drähte „2“ und „3“ gebohrt (Abb. 1A). Die Drähte „1“-„3“ wurden monokortikal gebohrt und bikortikal versenkt. Alle Bohrungen erfolgten unter ständigem Spülen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (Plastipur[®], Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Bei der Implantation der Drähte „2“ und „3“ wurde sich adspektorisch an der Ausrichtung des proximalsten Kirschner-Drahtes orientiert. Nach Einbringen aller Kirschner-Drähte in den Knochen wurden zwei Fixateur-Querbalken montiert, wobei der obere der temporären Fixation des Systems und der untere als verbleibender Querbalken diente. In Vorbereitung auf die Osteotomie wurde in Diaphysenmitte zwischen den beiden inneren Kirschner-Drähten die Muskulatur auf einer Länge von ca. vier Millimeter stumpf vom Os femoris gelöst.

Die Osteotomie erfolgte unter Verwendung einer kreisrunden Diamanttrennscheibe (Fa. Proxoon) in Schaftmitte zwischen den Drähten „2“ und „3“ (Abb. 1B) unter Spülung mit steriler isotonischer Kochsalzlösung.

Zur Wahrung eines standardisierten Knochen/Querbalken-Abstandes wurden die beiden Stahlplatten eines dritten Verbindungselementes als Schablone quer zwischen dem dauerhaften, unteren Querbalken und dem Knochen platziert. Der optimale Abstand zwischen

Knochen und Querbalken (Abstand Knochen-Fixateur-Querbalken: 10 mm) konnte auf diese Weise standardisiert ermittelt werden. Der verbleibende Querbalken wurde nun entsprechend des ermittelten Abstandes montiert, während der obere zu diesem Zeitpunkt das System fixierte. Dieser wurde im Anschluss entfernt und die beiden mittleren Kirschner-Drähte mit einem Bolzenschneider auf Höhe der oberen Fixateurkante gekürzt.

Um eine atrophe Pseudarthrose-Situation zu induzieren, erfolgte, nachdem der Querbalken erneut entfernt wurde, die manuelle Entnahme des Knochenmarks auf beiden Seiten der Osteotomie in Richtung auf die mittleren Pins mit Hilfe einer feinen Pinzette (Abb. 1C). Zusätzlich wurde dieser Bereich mit isotonischer Kochsalzlösung gespült. Das Periost wurde 2 mm proximal und distal des Osteotomiespaltes mit einem elektrischen monopolaren Kauter thermisch zerstört (Abb. 1D).

Der Fixateur-Querbalken konnte nun in seiner endgültigen Position montiert werden (Abb. 1E). Der Osteotomiebereich wurde gründlich mit isotonischer Kochsalzlösung gespült und, falls nötig, debridiert.

Nachdem mögliche Blutungen gestillt worden sind, erfolgte die Adaptation der Muskulatur durch eine fortlaufende Naht mit einem resorbierbaren Faden (7-0 Vicryl® mit Nadel, St-Stevens-Woluwe, Belgien). Die Haut wurde durch Einzelknopfhefte mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (3-0 Metric) verschlossen. Die Dauer des operativen Eingriffs betrug ca. 45 Minuten.

Nach Wundverschluss wurden Röntgenaufnahmen des osteotomierten Femurs angefertigt. Eine streng laterale bzw. mediale Aufnahme war zur Beurteilung des Osteotomiebereiches nicht möglich, da der Querbalken des Fixateurs den osteotomierten Bereich überdeckte. Um dennoch möglichst genau Aussagen treffen zu können, wurden drei Röntgenaufnahmen angefertigt. Zum einen wurde dabei die der Sitz der Kirschner-Drähte und zum anderen die Breite des Osteotomiespaltes begutachtet.

Die Tiere wurden in Brust-Bauchlage in ihren Käfig verbracht und bis zum Aufwachen unter Rotlichtbestrahlung gehalten. Nach der Osteotomie wurden die Ratten in Einzelkäfigen gehalten, um ein gegenseitiges Manipulieren der Wunden und auf diese Weise hervorgerufene Wundinfektionen zu vermeiden. Den Ratten war es nach der Osteotomie erlaubt, das Femur voll zu belasten.

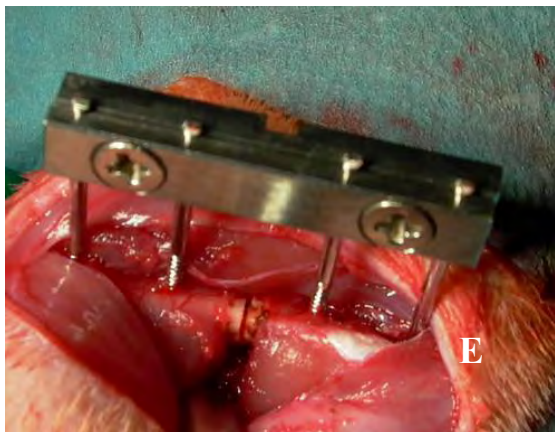
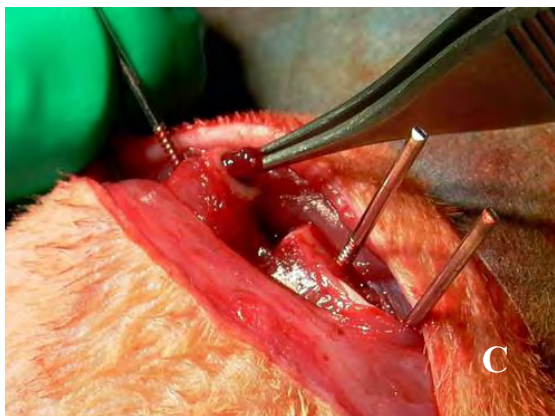
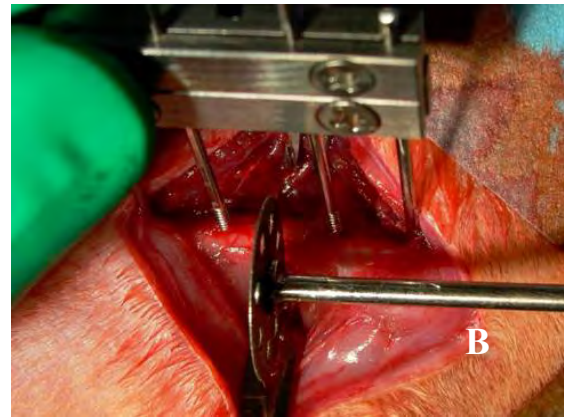
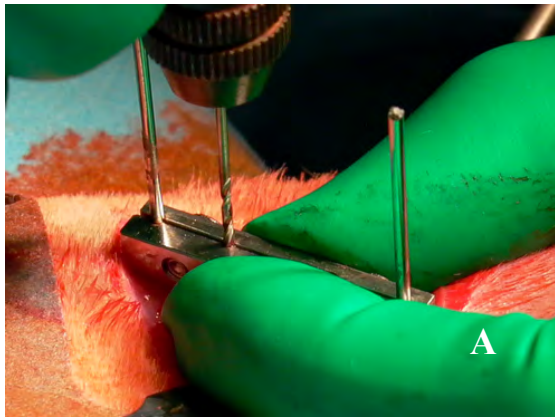


Abb. 1:

- A) Einbringen des Kirschnerdrahtes „3“ mit dem Handbohrfutter
- B) Darstellung des Operationsfeldes vor der Osteotomie
- C) Entfernung des Knochenmarks
- D) Kauterisierung des Periosts 2 mm proximal und distal der Osteotomie
- E) Operationsfeld nach endgültiger Montage des FE.

3.2.4 Transplantation der autologen MSCs bzw. des Mediums

Die Transplantation der autologen mesenchymalen Zellen erfolgte zwei Tage nach der Osteotomie. Zunächst mussten die Zellen, wie unter 3.2.2 beschrieben, trypsinisiert werden. Die so gewonnene Suspension wurde anschließend 10 Minuten zentrifugiert (15.000 U/min) und der gewonnene Überstand bis auf verbleibende 3-4 ml vorsichtig abgesaugt. Es erfolgte

ein erneutes Zentrifugieren für eine Minute. Der verbleibende Überstand wurde mit einer Pipette so entommen, dass nur noch etwa 0,02-0,05 ml im Falcon-Röhrchen verblieben. Das Zellpellet wurde mit dem Medium vermischt und anschließend für den Transport in die Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum, wo die Transplantation der Zellen erfolgte, in ein Eppendorfgefäß umgefüllt.

Die Tiere wurden zunächst wie unter 3.2.1 beschrieben, mit dem Isofluran-Gasgemisch narkotisiert. Die Inhalationsnarkose wurde während des gesamten Eingriffs aufrechterhalten. Es erfolgte ebenfalls eine Gewichts- und Temperaturkontrolle.

Mit einer 1 ml Einmalspritze und einer 24G-Kanüle (BD MicrolanceTM 3, Irland) wurde, da es sich um ein sehr niedriges Volumen der Zell-Medium-Suspension handelt, Luft entsprechend dem Volumen in Kanüle und Spritzenhals angesaugt. Damit wurde ein Verbleiben der Suspension in der Kanüle verhindert. Es folgte ein erneutes Durchmischen der Zell-Medium-Suspension mit der Kanülenspitze. Die Suspension wurde anschließend in die Spritze vorsichtig aspiriert.

Starke Verkrustungen und Verklebungen der Haut mit den Kirschner-Drähten wurden vor der gründlichen Desinfektion der Injektionsstelle, des Wundbereiches und der Kirschner-Drähte mit Braunoderm[®] gelöst. Die Punktion des Oberschenkels erfolgte entlang der Kerbe im Fixateur-Querbalken. Der Osteotomiespalt wurde mit der Kanülenspitze ertastet und die Suspension vollständig in den Spalt injiziert. Im Anschluss wurde das Injektionsgebiet erneut desinfiziert. Das Transplantationsvolumen betrug ca. 2×10^6 MSCs/100 μ l Kultivierungsmedium. In der Medium-Gruppe erfolgte eine analoge Vorgehensweise mit äquivalenter Menge zellfreien Mediums.

3.2.5 Postoperative Untersuchungen

Postoperative Untersuchungen umfassten eine Temperatur- und Gewichtserfassung, die Beurteilung der Wund- und Pinverhältnisse und eine radiologische Kontrolle. Die Untersuchungen erfolgten am Tag der Transplantation (mit Ausnahme der Röntgenaufnahmen) sowie ein und zwei Wochen nach der Osteotomie. Alle bei diesen Untersuchungen erhobenen Befunde bzw. Werte wurden in einem Laborbuch sowie in einer elektronischen Datenbank festgehalten.

Die Temperatur- und Gewichtserfassung erfolgte analog wie unter 3.2.1 beschrieben.

Bei der Wund- und Pinpflege wurden eventuell vorhandene Krusten und Verklebungen vorsichtig mit einer sauberen Pinzette gelöst und die Wunde ggf. mit Braunoderm[®] desinfiziert.

Die radiologischen Kontrollen erfolgten wie beschrieben unmittelbar nach der Osteotomie, eine Woche post operationem sowie nach der Tötung der Tiere zwei Wochen nach der Osteotomie. Sie dienten der Kontrolle des Heilungsverlaufes sowie zur Feststellung eines Implantatversagens bzw. Ausbrechens der Kirschner-Drähte, was zum Ausscheiden der Tiere aus dem Versuch und zur Vermeidung unnötigen Leidens zu einer frühzeitigen Euthanasie der Tiere geführt hätte.

Die Aufnahmen entstanden mit Hilfe eines mobilen Röntgenapparates (Mobilett Plus[®], Siemens, München, Deutschland). Die Röntgenfilme (CRONEX 5 Medical X-Ray-Film[®], AGFA-Gevaert, Belgien) wurden bei 52 kV und 1,8 mAs belichtet. Der Abstand zwischen Röntgenplatte und Strahlenquelle betrug 60 cm. Je Tier wurden zwei Aufnahmen in einem Winkel von 45° vorgenommen, wobei bei einer Aufnahme die Ratte auf dem Bauch, bei der anderen auf dem Rücken lag. Die dritte Aufnahme erfolgte im anterioposteriorem Strahlengang. Je Röntgenfilm wurden zwei Tiere in den genannten drei Ebenen abgelichtet.

3.2.6 Tötung und Probengewinnung

Nach einer zweiwöchigen Standzeit wurden die Tiere euthanasiert. Temperatur- und Gewichtserfassung sowie die Kontrolle der Wund- und Pinverhältnisse erfolgten wie unter 3.2.1 resp. 3.2.5 beschrieben. Zur Narkotisierung wurden die Tiere mit einem 5%igem Isofluran-Gasgemisch beatmet, wobei das Tier während des gesamten Vorgangs über eine Kopfmaske das Narkosegas inhalierte. Durch eine intrakardiale Injektion von 7 ml einer 1 M-KCl-Lösung[®] (Fresenius Kabi) wurde der Tod durch Herzstillstand hervorgerufen.

Unmittelbar nach dem Eintritt des Todes wurden Röntgenaufnahmen, wie unter 3.2.5 beschrieben, angefertigt.

Im Anschluss an die Tötung wurde das linke Femur freipräpariert und im Hüft- und Kniegelenk exartikuliert. Das um den Oberschenkel verbliebene Muskelpaket (Abb. 2A) wurde unter besonderer Schonung des Osteotomiebereiches vom Femur abpräpariert (Abb. 2B).

Um eine zu starke Manipulation des Kallus und damit ein mögliches Zerreißen dieses Gewebes zu vermeiden, erfolgte die Demontage des Fixateurs erst nach der Fixation, da im Zuge dieses Fixationsprozesses die Festigkeit des Gewebes zunahm. Zusätzlich wurde für erste Schneid- und Färbeversuche die kontralaterale Tibia jedes Tieres entnommen.

Zur Sicherung der optimalen Infiltration der Fixierungslösung wurden die proximalen und distalen Enden des Femurs mit einer Trennscheibe (Fa. Proxoon) entfernt.

Die isolierten Knochen wurden mit Mullbinden umwickelt. Alle Isolate erhielten eine dem Tier entsprechende Nummerierung und wurden unverzüglich in eine Fixierungslösung gegeben, um postmortale Zerfallserscheinungen zu stoppen. Die Fixierungslösung bestand aus 37 %igem Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ethylalkohol 100 % (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland), Barbitol-Natrium-Puffer, pH 7,4/0,1 M (Apotheke der Charité, Berlin, Deutschland) und Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland).

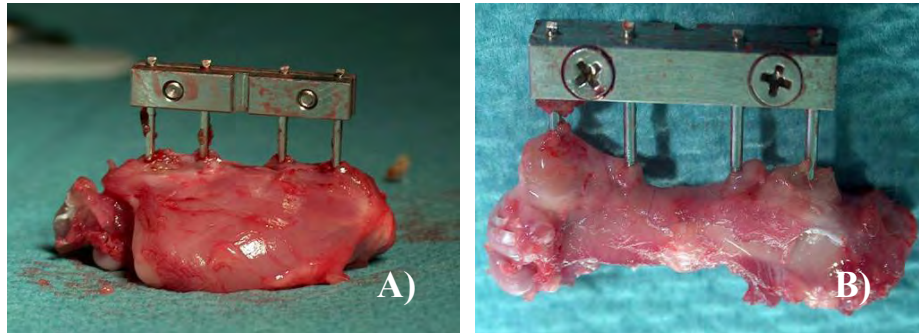


Abb. 2: Femur vor A) und B) nach der Präparation der Muskulatur

3.3 Histologische Aufarbeitung der Präparate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Präparate für die Auswertung histomorphometrisch, immunhistochemisch und histologisch aufgearbeitet, daher ergeben sich unterschiedliche Arbeitsabläufe. Die Femora, die histomorphometrisch ausgewertet wurden, durften nicht entkalkt werden. Daher wurden sie in einem speziellen Kunststoff eingebettet, der nach entsprechenden Färbungen in der späteren Analyse die quantitative Bestimmung mineralisierter und nicht mineralisierter Gewebsanteile erlaubt. Für die immunhistochemische und histologische Bearbeitung der Präparate müssen diese entkalkt und in Paraffin eingebettet werden. Es folgt daher zunächst die Beschreibung der Arbeitsabläufe einschließlich der dafür verwendeten Materialien in Vorbereitung auf die histomorphometrische Auswertung. Im Anschluss werden die Abläufe der immunhistochemischen und histologischen Aufarbeitung beschrieben.

3.3.1 Aufarbeitung für die histomorphometrische Analyse

Entwässerung und Einbettung

Um eine optimale Durchtränkung der Knochen während der Fixierung, der Entwässerung, der Entfettung und der Präinfiltration zu gewährleisten, wurden die luftdicht verschlossenen Gläser mit den Präparaten auf einen Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik) gestellt.

Die Entwässerung der 16 Femora erfolgte manuell in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema:

7 Tage	70 %
7 Tage	80 %
2 x 7 Tage	96 %
3 x 7 Tage	100 %

Nach der Entwässerung wurden die Präparate zur Entfettung für vier Stunden in Xylol (Xylene[®], J.T. Baker, Deventer, Niederlande) überführt. Das Xylol verdrängt dabei den Alkohol aus dem Gewebe und mischt sich mit dem Einbettungsmedium, welches wiederum das Xylol vollständig ersetzt.

Die Einbettung der Präparate für die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte in einem Polymerisationssystem auf Basis von Methylmetacrylat (Technovit[®] 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland), welches speziell für die Einbettung von mineralisiertem Gewebe für die Lichtmikroskopie entwickelt wurde. Die chemische Polymerisation erfolgt unter Ausschluss von Sauerstoff mit Hilfe eines Katalysatorensystems aus Peroxid und Amin. Die zusätzlichen Komponenten PMMA-Pulver (polymerisiertem Methylmetacrylat-Pulver) und Regler ermöglichen die gesteuerte Polymerisation bei Kälte, so dass eine vollständige Ableitung der während der Polymerisation entstehenden Wärme ermöglicht wird.

Die entfetteten Präparate wurden vor der Kunststoff-Einbettung für 48 Stunden in einer Präinfiltrationslösung bei Raumtemperatur und anschließend für sieben Tage in einer Infiltrationslösung bei 4 °C gelagert.

Für die Einbettung der Knochen in polymerisiertem Methylmetacrylat wurden diese in verschließbare kreisrunde Plastikschaalen so platziert, dass die laterale Oberfläche des Knochens möglichst plan auf dem Boden des Kunststoffgefäßes auflag, um beim späteren Schneiden möglichst wenige Lagekorrekturen vornehmen zu müssen. Um die Knochen später den jeweiligen Tieren zuordnen zu können, wurde die Tiernummer auf einem Filterpapier für

histologische Techniken zu den Knochen in die Kunststoffgefäße gelegt. Die Gefäße wurden anschließend mit dem Polymerisationsgemisch gefüllt und die Lage des Knochens, falls erforderlich, nochmals korrigiert. Die Lagerung der luftdicht abgeschlossenen Gefäße erfolgte für mindestens 24 Stunden bei 4 °C, um so die Abgabe der entstehenden Polymerisationswärme an die Umgebung zu ermöglichen. Sobald die Kunststoffblöcke ausgehärtet waren, wurden sie aus den Gefäßen gelöst.

Schneiden am Hartschnittmikrotom

Die Kunststoffblöcke wurden mit einem weiteren Kunststoff (Technovit[®] 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) an der Unterseite ummantelt. Dies führte zu einer Vergrößerung der Oberfläche und damit der Stabilität der Kunststoffblöcke, so dass das Risiko des Zerschneidens der Blöcke beim Einspannen in das Hartschnittmikrotom (Leica SM 2500S, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) reduziert wurde. Um das Schneiden am Mikrotom zu erleichtern, wurden die Blöcke bis zur Schnittebene des Knochens mit einer Schleifmaschine (Phoenix 3000, EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) angeschliffen.

Die präparierten Kunststoffblöcke wurden nun in das Hartschnittmikrotom eingespannt. Unter ständiger Benetzung mit einer Wasser-Seifenlösung wurden 6 µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf zuvor beschriftete und mit 70 %igem Alkohol benetzte Standardobjektträger gezogen. Zum Strecken und Entfalten der Schnitte wurden diese mit einer Streckflüssigkeit (bestehend aus zu 60 Teilen aus 70 % Alkohol und zu 40 Teilen aus Butoxyethylacetat) beträufelt und mit einem Pinsel vorsichtig geglättet. Zum Schutz wurden die Präparate möglichst luftblasenfrei mit einer Krisolfolie (Polyethylen-Schutzfolie) abgedeckt. Das Auflegen von Filterpapier ermöglichte die Aufnahme von Flüssigkeit. Die Präparate kamen übereinander gestapelt in eine Presse und wurden in einem Brutschrank bei 60° C getrocknet. Der Druck der Presse ermöglichte die Haftung der Präparate auf den Objektträgern, so dass ein Abschwemmen der Präparate beim späteren Färben verhindert wurde.

- **Safranin Orange/von Kossa-Färbung**

Um die Präparate für die histologischen Farbstoffe zugänglich zu machen, musste der Kunststoff zunächst aus den Geweben entfernt werden. Diese so genannte Entplastung erfolgte durch das dreimalige Eintauchen der Kunststoffschnitte in Methylmethacrylat (MEA)

für jeweils 30 Minuten. Die anschließende Rehydrierung der Präparate erfolgte, indem die Präparate eine absteigende Alkoholreihe durchliefen. Durch das luftdichte Einschließen der Präparate nach der Färbung mit Vitro-Clud® (R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland), einem Einschlussmittel für die mikroskopische Technik, wurde eine möglichst lange Haltbarkeit der Präparate garantiert.

Die kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung dient der Unterscheidung der mineralisierten und nicht mineralisierten Gewebeanteile (Abb. 4A). Mineralisierter Knochen und Knorpel werden schwarz, nicht mineralisierte Strukturen, wie z. B. Bindegewebe und Muskulatur, in unterschiedlichen Rottönen dargestellt. Der nicht mineralisierte hyaline Knorpel kann von den anderen, nicht mineralisierten Geweben anhand seiner leuchtend roten Färbung und charakteristischen Morphologie unterschieden werden. Mineralisationsfronten, z. B. unter Osteoidsäumen, zeigen sich schwarz granuliert.

Die Färbung erfolgt nach folgendem Schema:

- | | | |
|-----|--|---------------|
| 1. | Schnitte in MEA 3 x 30 Minuten entplasten und in | |
| | a) 100-96-80-70 %igem | je 2 Minuten |
| | b) Aqua dest. bringen | 2 Minuten |
| 2. | Färben in 3 %iger wässriger Silbernitratlösung | 5 Minuten |
| 3. | Spülen in Aqua dest. | 3 x kurz |
| 4. | Reduzieren in Natrium-Formaldehydlösung | 2 Minuten |
| 5. | Wässern in Leitungswasser | 10 Minuten |
| 6. | Natriumthiosulfat 5 % | 5 Minuten |
| 7. | Wässern in Leitungswasser | 10 Minuten |
| 8. | Spülen in Aqua dest. | kurz |
| 9. | Färben in Safranin O | 8 Minuten |
| 10. | Spülen in Aqua dest | kurz |
| 11. | Entwässern in: 2 x 96 und 100 %igem Alkohol | kurz |
| 12. | Entfetten in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 13. | Eindeckeln mit Vitro-Clud® | |

3.3.2 Aufarbeitung der Präparate für die Immunhistochemie

Entkalken, Entwässern und Einbetten

Für die immunhistochemischen Färbungen ist es notwendig, die Antigene zur Darstellung bestimmter Gewebsstrukturen zugänglich zu machen. Dazu müssen die Knochen entkalkt werden.

Nach 15-20 minütiger Wässerung in Leitungswasser erfolgte die Entkalkung der Knochen in EDTA (Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland). EDTA ist ein Komplexbildner und geht an seinen freien Bindungsstellen eine Verbindung mit Kalzium-Ionen ein, so dass sich EDTA-Kalzium-Präzipitate bilden. Um eine möglichst effektive Entkalkung zu gewährleisten, wurden die Knochen drei Wochen entkalkt, wobei die EDTA-Lösung zweimal wöchentlich erneuert wurde. Um diesen Prozess zu beschleunigen, erfolgte die Lagerung der Knochen während dieser Zeit in einem Brutschrank bei 37 °C.

Nach erneuter gründlicher Wässerung in Leitungswasser wurden die Präparate drei Tage maschinelle mit Hilfe eines Entwässerungsautomaten (Leica TP 1020, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) nach folgendem Schema entwässert: 1 x 70 %, 2 x 80 %, 2 x 96 %, 3 x 100 % Alkohol, 2 x Xylol, 2 x Paraffin. Nach Beendigung der Entwässerung mussten die Knochen noch am selbigen Tag in Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Tyco Healthcare, Mansfield, USA) eingebettet werden.

Zur Einbettung wurden die Knochen in einer ihrer Größe angepassten metallenen Gussform in möglichst achsengerader Lage der Schnittfläche des Knochens zum Boden der Gussform platziert und mit flüssigem Paraffin aus dem Paraffinbad (Leica EG 1120, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) übergossen. Die Kennzeichnung der Blöcke erfolgte auf Filterpapier, welches auf die Oberfläche des noch flüssigen Paraffins gelegt wurde. Zur Aushärtung wurden die Paraffinblöcke auf eine Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) gestellt. Nach Erkaltung des Paraffins konnte die Gussform entfernt werden.

Schneiden am Rotationsmikrotom

Paraffin hat die Eigenschaft, sich bei höheren Temperaturen auszudehnen, was zu einer Reduzierung der Schneidfähigkeit der Knochen führt. Die Blöcke wurden deshalb vor dem Schneiden sowie zwischen den Schneidevorgängen auf einem Eisblock gekühlt. Um die Objektträgergröße so klein als möglich zu halten und somit das spätere Färben zu erleichtern, wurden die Paraffinblöcke bis zu den Konturen der Knochen mit einem Messer beschnitten.

Das Einspannen der gekühlten Paraffinblöcke in das Rotationsmikrotom (Leica RM 2125, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) erfolgte so, dass die Schnittebene des Blockes parallel zum Schneidemesser ausgerichtet war. Gegebenenfalls musste die Ausrichtung des Paraffinblockes am Mikrotom korrigiert werden. Die Schnittebene wurde so gewählt, dass der Osteotomiespalt und mindestens die Kirschner-Drähte „2“ und „3“ in der Ebene lagen.

Unter wiederholter Kühlung der Knochen wurden 4 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden zunächst in ein ca. 20 °C warmes Wasserbad überführt, mit einem feinen Pinsel so gut als möglich geglättet, entfaltet und auf Objektträger aufgezogen. Da sich das Paraffin, wie oben erwähnt, bei höheren Temperaturen ausdehnt, erfolgte die Überführung der mit den Präparaten versehenen Objektträger in ein 45 °C warmes Wasserbad (Leica HI 1210, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland). Durch die Ausdehnung des Paraffins entfalteten sich die Präparate weiter. Um die Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu erhöhen, wurden die beschrifteten Objektträger für mindestens zwei Tage bei 37 °C in einem Brutschrank getrocknet.

Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip immunhistochemischer Färbungen basiert auf der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Um bestimmte Gewebe sichtbar zu machen, werden Antigene (Ag) dieser Strukturen durch die Zugabe von unkonjugierten Primärantikörpern (Primär-Ak), die sich gegen die Gewebs-Ag richten, markiert. Die Detektion dieser Ag-Ak-Komplexe erfolgt durch die Zugabe biotinylierter (biotinmarkierter) Sekundärantikörper (Sekundär-Ak), die sich gegen die Primär-Ak richten. Stammen die Primär-Ak aus dem Kaninchen, müssen die Sekundär-Ak gegen die Immunglobuline des Kaninchens gerichtet sein. Die hohe Sensitivität der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen basiert auf der Zugabe eines Avidin-Biotin-Enzymkomplexes (AB-Komplex). Hierbei spielt die hohe Affinität von Avidin (ein aus dem Hühnereiweiß gewonnenes Protein) zu Biotin (Vitamin H) eine große Rolle. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, es bindet an den biotinylierten Sekundär-Ak. An das im AB-Komplex enthaltene Biotin ist das Enzym Alkalische Phosphatase gebunden, welches die Farbreaktion katalysiert. Nach Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung, Chromogen sorgt dabei für den für die Reaktion optimalen pH-Wert, wird das Substrat vom Enzym des AB-Komplexes umgesetzt. Als Substrat dient Neufuchsin (Dako CemMate, Dako A/S, Dänemark), welches im Rahmen der enzymatischen Reaktion zum roten Chromogen reduziert wird. Dieser Vorgang wird als Farbreaktion

sichtbar und färbt so die gewünschten Gewebsstrukturen, die daraufhin quantitativ bestimmt werden können (Abb. 3). Eine unspezifische Hintergrundfärbung wird durch die Inkubation der Präparate in 1 % igem Normalserum so weit als möglich unterdrückt. Das Normalserum stammt aus der Tierart, in der die Sekundär-AK produziert wurden.

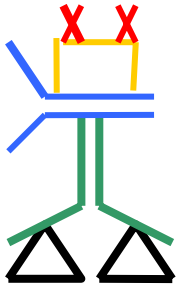


Abb. 3: Schematische Darstellung immunhistochemischer Färbungen. Schwarz: Antigene, grün: Primär-Ak, blau: Sekundär-Ak, gelb: enzymgekoppelter AB-Komplex, rot: Substrat.

- **Durchführung der immunhistochemischen Färbungen**

1. a) Entparaffinieren in Xylol 2 x 10 Minuten
b) Rehydrieren 2 x 100 -96-80-70 % Alkohol und Aqua dest. je 2 Minuten
2. Spülen in Puffer (pH 7,2) bestehend zu 9 Teilen aus Aqua dest. und zu 1 Teil Phosphatpufferlösung (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland) 2 x 5 Minuten
3. Gegebenenfalls Inkubation mit Hyaluronidase u./o. Pepsin zur Demaskierung der Antigene bei 37 °C
a) Spülen in Puffer 2 x 5 Minuten
4. Inkubation mit Normalserum (Vector[®] Laboratories, Burlingame, USA) bei Raumtemperatur (RT) 20 Minuten
5. Inkubation mit dem Primär-Ak (Biologo, Kronshagen, Deutschland) bei 4 °C über Nacht
6. Spülen in Puffer 2 x 5 Minuten
7. Inkubation mit dem biotinylierten Sekundär-Ak (Vector[®] Laboratories, Burlingame, USA) bei RT 30 Minuten
8. Spülen in Puffer 2 x 5 Minuten
9. Inkubation mit dem AB-Komplex (Alkaline Phosphatase Standard Kit AK 5000, Vector[®] Laboratories, Burlingame, USA) bei RT 50 Minuten
10. Spülen in Puffer 2 x 5 Minuten
11. Inkubation in Chromogen-Puffer (pH-Wert: 8,2) 2 x 5 Minuten

12. Inkubation mit dem AP-Substrat (Vector[®] Red Alkaline Phosphatase Substrat Kit 1, Burlingame, USA), wobei die Farbreaktion unter dem Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Deutschland) begutachtet wird 5-30 Minuten
13. Spülen in Puffer kurz
14. Kerngegenfärbung mit Häkalaun nach Mayer:
 - a) Spülen in Aqua dest. kurz
 - b) Häkalaun (Häkalaunlösung, Merk, Darmstadt, Deutschland) 3-6 x eintauchen
 - c) Spülen in Aqua dest kurz
 - d) Spülen in Leitungswasser 1-2 Minuten
 - e) Aufsteigende Alkoholreihe (70-80-96-2 x 100 %) max. je 1 Minute
 - f) Entfetten in Xylol 2 x 5 Minuten
 - g) Eindeckeln in Vitro-Clud[®]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistologisch Kollagen-II und α -SMA (α -smooth muscle actin) zur Darstellung der glatten Muskulatur der Gefäße nachgewiesen (Abb. 4B und C). In Vorversuchen erfolgte die Ermittlung der jeweils optimalsten Konzentration der Primär-Ak, um so die nachzuweisenden Antigene bestmöglich darstellen zu können (Tab. 2) Der Primär-Ak wurde dabei mit einem Puffer (Dako Cytomation Antibody Diluent, Dako Cytomation, Via Real, USA) verdünnt. Die Herstellung der Gebrauchslösungen sind den Herstellerangaben zu entnehmen. Als Negativkontrolle dienten Präparate, die nicht mit dem Primär-Ak inkubiert wurden.

Antigen	Vorbehandlung		Konzentration des Primär-Ak
	Hyaluronidase	0,1 % Pepsin	
Kollagen II (polyklonal)	4 h	40 min	1: 100
α -SMA (polyklonal)	keine	keine	1 : 100

Tab. 2: Vorbehandlung der Präparate und Verdünnung des jeweiligen Primär-Ak mit dem Puffer.

Das auf diese Weise angefärbte Kollagen-II wurde quantitativ mit Hilfe der computer-gestützten Bildanalyse bestimmt. Die α -SMA-Färbung erleichterte die Zählung der Gefäße.

Histologische Färbungen

An den entkalkten und in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden, neben den immunhistochemischen Färbungen, eine Alcianblau-Färbung, eine TRAP- sowie eine Movat Pentachrom-Färbung vorgenommen.

- **Alcian Blau-Färbung**

Diese Färbung fand Verwendung in der deskriptiven Histologie (Abb. 4D). Sie erlaubt die Unterscheidung von Faserknorpel und hyalinem Knorpel entsprechend der Farbintensität und der Struktur. Der Faserknorpel stellt sich zartblau dar und lässt eine faserige Struktur erkennen. Der hyaline Knorpel wird intensiv blau angefärbt. Die Knorpelzellen des hyalinen Knorpels sind in dieser Färbung sehr gut an ihrer charakteristischen Erscheinung (große, runde z. T. blasig erscheinende Zellen) erkennbar. Der Hintergrund färbt sich zartrosa, die Zellkerne hellrot.

Durchführung:

- | | | |
|-----|--|----------------|
| 1. | a) Entparaffinieren in Xylol | 2 x 10 Minuten |
| | b) 100-96-80-70 %iger Alkohol | je 2 Minuten |
| | c) Aqua dest. | 2 Minuten |
| 2. | Essigsäure (3 %) | 3 Minuten |
| 3. | 1 %ige Alcianblaulösung (8GX, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) | 30 Minuten |
| 4. | Abspülen in Essigsäure (3 %) | kurz |
| 5. | Waschen in Aqua dest. | kurz |
| 6. | Färbung mit Kernechtrot (Waldeck GmbH, Dicsion Chroma [®] , Münster, Deutschland) | 5 Minuten |
| 7. | Waschen in Aqua dest. | kurz |
| 8. | Aufsteigende Alkoholreihe (70-80-96-2 x 100 %) | max. 1 Minute |
| 9. | Entfetten in Xylol | 2 x 5 Minuten |
| 10. | Eindeckeln mit Vitro-Clud [®] | |

- **TRAP-Färbung**

Diese Färbung dient der Identifizierung der Osteoklasten (Abb. 4E) durch die Anfärbung der für diese Zellen typischen tartrat-resistenten sauren Phosphatase (Tartrat-resistent acid phosphatase, TRAP). Da aber auch andere Zellen, wie z. B. Makrophagen, gefärbt werden,

erfolgt die Quantifizierung der Osteoklasten nicht nur aufgrund des positiven Färbeergebnisses, sondern auch anhand ihrer Lokalisation (an der Knochenoberfläche) und ihrer Mehrkernigkeit (mind. zwei Zellkerne).

Durchführung:

Nach Entfettung in Xylol und Rehydrierung in 2 x 100-96-80-70 %igem Alkohol erfolgte die zehnminütige Spülung in 200 ml TRAP-Puffer. Dieser bestand aus 3,28 g Na-Acetat (Fa. Merk, Darmstadt, Deutschland) und 46,01 g Na-Tartrat (Fa. Merk, Darmstadt, Deutschland) und Aqua dest. Der pH-Wert des Puffers wurde zuvor mit Hilfe eines pH-Meters (inoLab[®], pH Level 1, WTW, Weilheim, Deutschland) auf 5,0 eingestellt. Im Anschluss wurden die Präparate zwei Stunden bei 37 °C in der TRAP-Färbelösung inkubiert. Auch diese Lösung musste im Vorfeld hergestellt werden. Sie bestand aus 40 mg Naphtol AS-Mix Phosphat (N 5000, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 240 mg Fast Red Violett LB Salt (F 3381, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 4 ml N-N-Dimethylformamid (D 4551, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) sowie 2 ml Triton X (Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Um einen möglichst starken Farbkontrast zu erzielen, wurden die Präparate nach kurzem Spülen in Aqua dest. mit Methylgrün (CERTISTAIN[®], Merk, Darmstadt, Deutschland) durch zehnmaliges kurzes Eintauchen gegengefärbt und anschließend erneut 2 x in Aqua dest. gespült. Die Konservierung erfolgte durch den luftdichten Abschluss der Präparate mit einem dünnen Deckgläschen. Als Verschlussmittel wurde zuvor erwärmte Gelatine (Kaisers Glyceringelatine, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

- **Movat Pentachrom-Färbung**

Diese Färbung ermöglicht die farbenprächtige Unterscheidung der Hart- und Weichgewebekomponenten (Abb. 4F). Knochengewebe wird leuchtend gelb und nicht mineralisierter Knorpel grün dargestellt. Das Bindegewebe stellt sich in unterschiedlichen Grün- und Blautönen dar, die Zellkerne werden dunkel gefärbt. Aufgrund dieses Kontrastreichtums ist eine eindeutige Unterscheidung der Gewebekomponenten leicht möglich. Bindegewebe und Knochen konnten so mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse quantitativ histomorphometrisch bestimmt werden. Die Identifizierung der Knochenfläche (mm²) im Paraffinschnitt war notwendig, da die Anzahl der Osteoklasten auf die Knochenfläche (mm²) bezogen werden musste. Das Bindegewebe musste quantitativ bestimmt werden, um die identifizierten Gefäße auf die Bindegewebsfläche (mm²) beziehen

zu können. Die histomorphometrische Bestimmung dieser Parameter an einem in Technovit[®] eingebetteten und damit nicht entkalkten Präparat war nicht möglich, da Auszählung der Gefäße und Quantifizierung des Bindegewebes sowie Zählung der Osteoklasten in Relation zur Knochenoberfläche an ein und dem selben Tier erfolgen muss.

Durchführung:

1. a) Entparaffinieren in Xylol 2 x 10 Minuten
b) 100-96-80-70 %iger Alkohol je 2 Minuten
c) Aqua dest. 2 Minuten
2. 1% ige Alcianblaulösung (8GX, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) 10 Minuten
3. Abspülen unter Leitungswasser 5 Minuten
4. Alkalischer Alkohol (10 ml 25 % Ammoniak (Merk, Darmstadt, Deutschland) auf 180 ml 96 %Alkohol) 60 Minuten
5. Wässern in Leitungswasser 10 Minuten
6. Waschen in Aqua dest. kurz
7. Weigerts Eisenhaematoxylin (Eisenhaematoxylin A und B (Waldeck GmbH, Dicsion Chroma[®], Münster, Deutschland) im Verhältnis 1:1) 10 Minuten
8. Waschen in Aqua dest. kurz
9. Wässern in Leitungswasser 15 Minuten
10. Brillant Crocein-Säurefuchsin (Brillantcrocein R, Waldeck GmbH, Dicsion Chroma[®], Münster, Deutschland) 10 Minuten
11. 0,5 % Essigsäure kurz
12. 5 % Phosphormolybdänsäure (Siegma Aldrich, Seelze, Deutschland) 15 Minuten
13. 3 x 100 % Ethanol 5 Minuten
14. Saffron du Gatinais (Waldeck GmbH, Dicsion Chroma[®], Münster, Deutschland) in 100 % Ethanol 60 Minuten
15. 3 x 100 % Ethanol 3 Minuten
16. Entfetten in Xylol 2 x 5 Minuten
17. Eindeckeln mit Vitro-Clud[®]

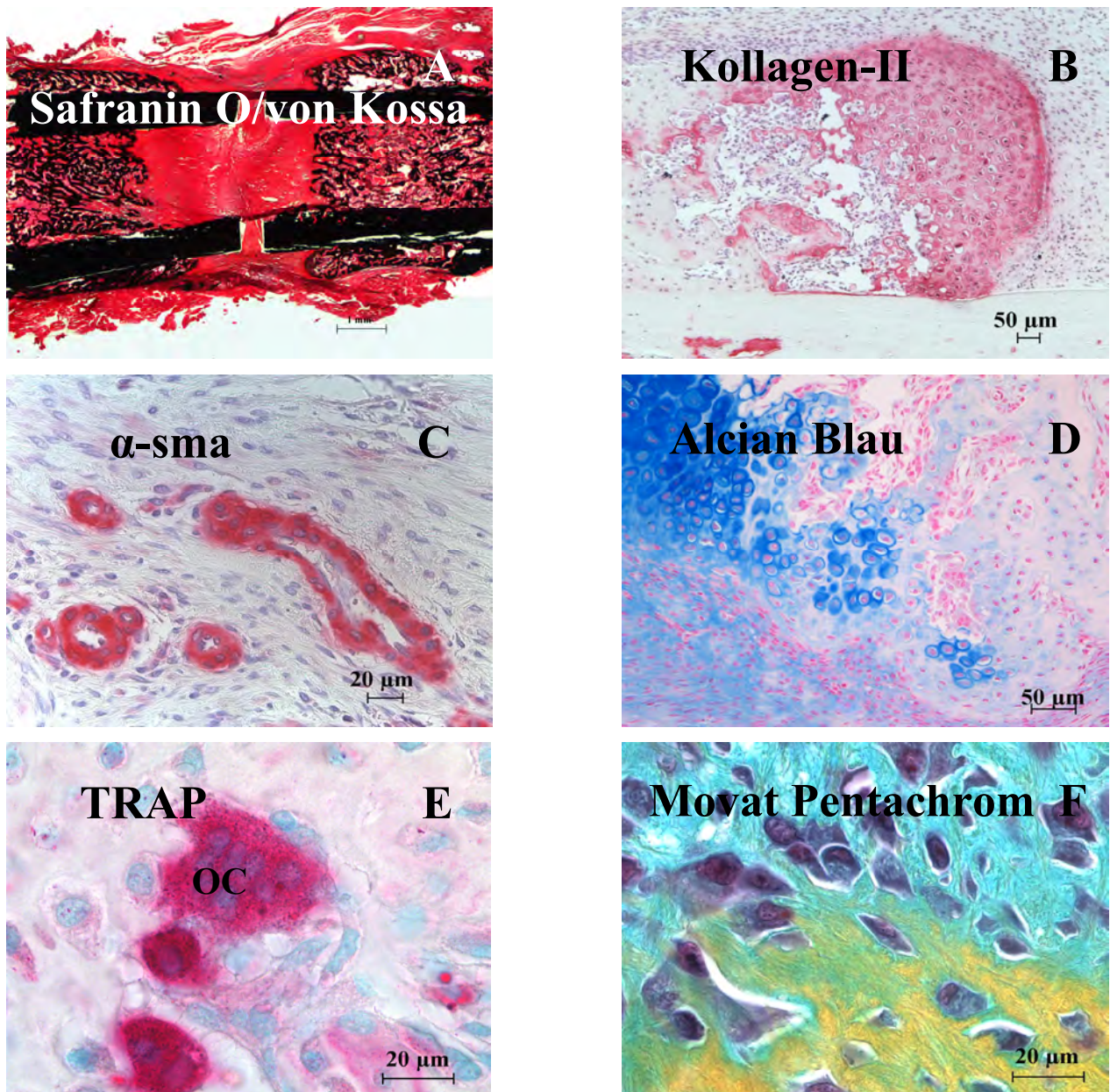


Abb. 4: In der Studie verwendete Färbungen.

- A) Safranin O/von Kossa-Färbung zur histomorphometrischen Analyse (MSC-Tier, 2,5x).
- B) Kollagen-II-Färbung (rosa), periostaler Kallus eines MSC-Tieres (20x).
- C) α -sma-Färbung zur Darstellung der Gefäße (rot) (MSC-Tier, 100x).
- D) Alcian Blau-Färbung, hypertrophe Chondrozyten intensiv blau gefärbt (Medium-Tier, 20x).
- E) TRAP-Färbung zur Darstellung der Osteoklasten (OC), (MSC-Tier, 100x).
- F) Movat Pentachrom-Färbung für Histomorphometrie und deskriptive Histologie (MSC-Tier, 100x).

3.4 Auswertung der Röntgenbilder

Zur Auswertung kamen die Röntgenbilder post OP und post mortem. Geachtet wurde v. a. auf die Kortikalisenden der Osteotomiefragmente und auf die Entwicklung eines endostalen und periostalen Kallus. Um Resorptionsvorgänge an den Kortizes und damit einhergehend eine

Verbreiterung des Osteotomiespaltess bewerten zu können, wurde die Breite des Osteotomiespaltess auf den post OP-Röntgenbildern mit der Spaltbreite der Röntgenbilder zum Zweiwochenzeitpunkt verglichen. Zur standardisierten Auswertung der Röntgenbilder erfolgte die Bezifferung der Osteotomieenden der Kortikalis mit „1“-„4“ (Abb. 5). Analog galt diese Einteilung auch für die histologischen Präparate. Der Femurkopf diente als Orientierung. Die Kortikalis, die diesem am nächsten lag, wurde als Kortikalis „3“ beziffert. Die Kortikalis „4“ lag ebenfalls medial, Kortikalis „1“ gegenüber Kortikalis „3“ und lateral, Kortikalis „2“ lag gegenüber Kortikalis „4“ und ebenso lateral wie Kortikalis „1“. Demzufolge befanden sich die Kortizes „1“ und „2“ Fixateur nah, die Kortizes „3“ und „4“ Fixateur fern. Der periostale und endostale Bereich sowie die entsprechende Kortikalis wurden zusammenfassend als Quadrant bezeichnet, so dass je Röntgenbild vier Quadranten bewertet wurden, es sei denn, die Aufnahmequalität oder Lagerungstechnik ließen dies nicht zu.

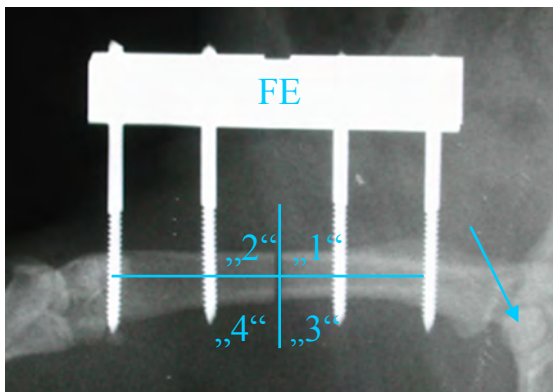


Abb. 5: Einteilung des Osteotomiebereiches in Quadranten entsprechend der jeweiligen Kortikalis. Der Pfeil markiert die Lage des Femurkopfes, FE = Fixateur externe-Querbalcken.

3.5 Auswertung der Schnittpräparate

3.5.1 Definition der Region Of Interest (ROI)

Die Festlegung der Region Of Interests, das Gebiet von Interesse, diente der einheitlichen und möglichst standardisierten Auswertung der Präparate. Der Rest des Präparates blieb unberücksichtigt. Die Präparate konnten so nach einer festgelegten Vorgehensweise einheitlich ausgewertet und untereinander verglichen werden.

Eine schematische Darstellung der ROI zeigt Abbildung 6. Ausgangspunkt für die Festlegung der ROI war der Osteotomiespalt. Um Reaktionen des Knochens und der Weichteile durch die implantierten Pins (Abstand von Pin zu Pin betrug 10 mm) von der Auswertung auszuschließen, wurde die Höhe der ROI, ausgehend von Osteotomiespaltmitte, in proximale und distale Richtung auf je 3,5 mm begrenzt. Die Höhe der ROI betrug so

insgesamt 7 mm. Die Breite der ROI richtete sich nach der Gesamtbreite des periostalen Kallus innerhalb der zuvor festgelegten ROI-Höhe. Da diese Reaktion von Tier zu Tier unterschiedlich ausfiel, konnte die Breite des Auswertungsgebietes nicht einheitlich definiert werden. Um die laterale und mediale Seite vergleichen zu können, wurde die mediale Seite des Knochens zuvor mit einem roten wasserfesten Punkt markiert, wobei sich zur Bestimmung der medialen Seite am Femurkopf orientiert wurde. Die Gesamt-ROI wurde in Sub-ROIs unterteilt. Dazu wurden zunächst die Mitte des Markraums und der Kortikalis jeder Seite bestimmt. Der Bereich von Markraummitte bis Kortikalismitte galt als endostale ROI der jeweiligen Kortikalis, die, wie unter 3.4 beschrieben, mit „1“-„4“ gekennzeichnet wurde. Die periostale ROI der einzelnen Kortikalis erstreckte sich von Kortikalismitte bis zur äußeren Begrenzung der externen Kallusreaktion. Zusätzlich wurde der Osteotomiespalt als eine weitere Sub-ROI definiert. Die Höhe dieser ROI erstreckte sich vom proximalen zum distalen Kortikaliseende, die Breite von der äußeren Begrenzung der periostalen Kallusreaktion der medialen Seite bis zur äußersten Begrenzung der periostalen Kallusreaktion der lateralen Seite des Femurs. Die Gesamt-ROI wurde so in neun Sub-ROIs unterteilt.

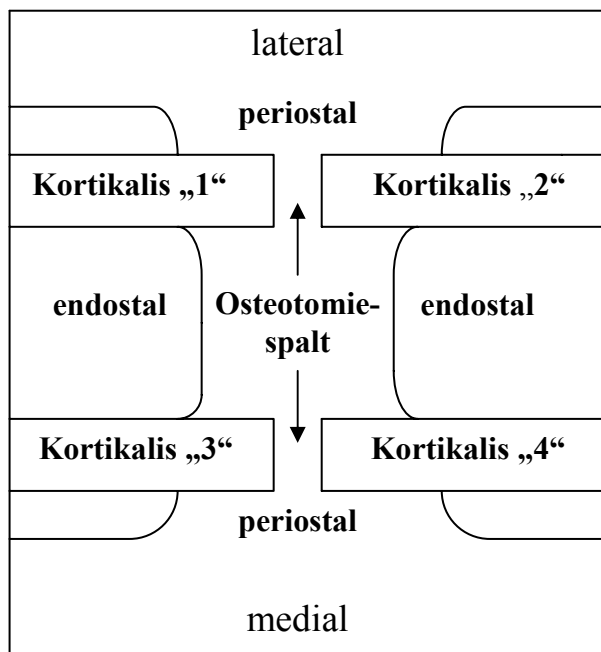


Abb. 6:
Schematische Darstellung
des Osteotomiebereiches.
Die Linien auf bzw.
zwischen den Kortizes
stellen den knöchernen
Kallus dar.

3.5.2 Deskriptive Analyse der histologischen Präparate

Für die Beschreibung der Osteotomiezone wurden aus jeder Gruppe 16 Präparate (je Gruppe acht nach Movat Pentachrom und acht nach Alcian Blau gefärbt) herangezogen.

Die histologische Analyse erfolgte bei allen Präparaten nach dem gleichen Muster. Beurteilt wurden die Kortikalis, Zusammensetzung und Ausmaß des periostalen Gewebes, der Markraum mit besonderem Augenmerk auf den endostalen Kallus sowie das Gewebe des Osteotomiespaltes.

3.5.3 Histomorphometrische Auswertung der Präparate

Die histomorphometrische Auswertung der Präparate mit Hilfe der computergestützten Analyse-Software (KS Run 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland) ermöglicht eine qualitative und quantitative Erfassung einzelner Gewebearten. Je nach Färbung und den zu ermittelnden Parametern wurde das Computerprogramm modifiziert. Es ist in der Lage, anhand bestimmter Farbpixel Flächen zu erkennen und zu berechnen. Zusätzlich können Flächen oder Strukturen manuell umfahren und somit sequenziert werden. Pro Tier, deren Knochen in Paraffin eingebettet wurden, erfolgte die Auswertung je eines Kollagen-Typ-II gefärbten und eines Movat Pentachrom gefärbten Präparates. Von den in Technovit eingebetteten Knochen gelangen pro Tier jeweils vier nach Safranin Orange/von Kossa gefärbte Präparate in die Auswertung. Dazu wurden die Präparate mit einer hochauflösenden Spiegelreflex-Digitalkamera vor einem Leuchttisch digitalisiert. Für die später notwendige Kalibrierung wurde ein Lineal am lateralen Rand des Objektträgers mit fotografiert.

Nachdem das Programm geöffnet und das jeweilige Präparat aufgerufen wurde, konnte den Anweisungen des Programms Folge geleistet werden. Als erstes erfolgte anhand des mit fotografierten Lineals die Kalibrierung des Systems (Abb. 7A). Nachfolgend wurde die ROI definiert. Dazu wurde der Kortikalisdurchmesser (Außenkante der Kortikalis auf der lateralen und der medialen Seite je proximal und distal des Osteotomiespaltes) (Abb. 7B), der Gesamtkallusdurchmesser (Abb. 7C) und der maximale knöcherne Kallusdurchmesser auf Höhe des Osteotomiespaltes manuell festgelegt. Im Anschluss wurde die maximale Breite des Osteotomiespaltes zwischen den proximalen und distalen Kortikales sowohl auf der lateralen als auch auf der medialen Seite gemessen und der Mittelpunkt des proximalen und distalen Markraums sowie der lateralen und medialen Kortikalis bestimmt (Abb. 7D). Anhand der so eingegebenen Parameter berechnete der Computer die Gesamt-ROI und

unterteilte diese, ausgehend von der Mitte der Kortizes und des Markraums, in einen periostalen und endostalen Bereich. Diese wurden nochmals in einen lateralen und medialen Bereich unterteilt. Da die Höhe der ROI von 3,5 mm, ausgehend von der zuvor anhand der eingegebenen Parameter errechneten Osteotomiespaltmitte, nach proximal und distal Bestandteil des Programms war, musste diese nicht manuell eingegeben werden. Da der Gesamtkallusdurchmesser innerhalb der ROI nicht einheitlich war, wurden auch Bereiche aufgenommen, die keinen Eingang in die Auswertung finden sollten, wie z. B. Muskulatur (Abb. 7E). Diese Bereiche galten als Leerräume. Die Kortizes wurden manuell umfahren und durch den Computer gelb markiert (Abb. 7F). Die Leerräume konnten im folgenden Schritt manuell detektiert und so aus der Analyse ausgeschlossen werden. Als Leerraum wurden auch durch die Schnitttechnik bedingte Ausbrüche markiert (Abb. 8A). Diese Bereiche konnten nicht zur Auswertung herangezogen werden, da nicht bekannt war, welcher Gewebetyp in diesen Bereichen vorhanden war. Nachfolgend wurde der Osteotomiespalt manuell markiert (Abb. 8B). Im Anschluss folgte die Segmentierung der zu untersuchenden Gewebetypen. Das Programm erfasst im Falle der Safranin Orange/von Kossa-Färbung die schwarz gefärbten Anteile des Knochens als mineralisiertes Gewebe (Abb. 8C) und die unterschiedlichen Rottöne des Präparates als Bindegewebe (Abb. 8D). Bei den Movat Pentachrom gefärbten Präparaten mussten alle in der ROI befindlichen Knochenareale manuell umfahren werden, da das Programm nicht in der Lage war, den Knochen selektiv zu markieren. Das Bindegewebe konnte in dieser Färbung mit Hilfe des Computers sequenziert werden. Bei den Kollagen-Typ-II gefärbten Präparaten wurden die intensiv rosa gefärbten Areale als Kollagen-Typ-II erfasst. Eine manuelle Korrektur der markierten Anteile war möglich. Beispielsweise stellte sich das Knochenmark in der Safranin Orange/von Kossa-Färbung ebenfalls in unterschiedlichen Rottönen dar. Diese sollten aber nicht in die Berechnung aufgenommen werden und musste so manuell entfernt werden (Abb. 8E). Im folgenden Schritt musste die periostale und endostale Kallusfläche manuell gekennzeichnet werden, so dass der Computer die jeweilige Kallusfläche und den jeweils zu ermittelnden Gewebeanteil in diesen Arealen errechnen konnte (Abb. 8F). Von den nach Safranin Orange/von Kossa gefärbten Präparaten wurde der Median der vier Präparate in die Auswertung einbezogen. Der Gruppenvergleich erfolgte bei allen histomorphometrisch analysierten Färbungen auf Ebene der Median-Werte.

Folgende vom Computer erhobene Daten wurden ausgewertet:

- Gesamtfläche der ROI [mm²].
- Gesamtflächen des periostalen und endostalen Kallus [mm²].

- Gesamtknochenfläche (einschl. der Kortikalis), Gesamt-mineralisierte Knochenfläche, Gesamtbindegewebsfläche und Gesamtknorpelfläche in mm².
- Knochenfläche des periostalen und endostalen Kallus als Absolut [mm²]- und Relativwerte [%] und deren Unterteilung in lateralen und medialen periostalen bzw. endostalen Kallus. Diese Unterteilung galt auch für die nachfolgenden Parameter. Diese Fläche umfasst den schwarz gefärbten mineralisierten Knochen und von diesem eingeschlossene Knorpel- und Bindegewebsanteile.
- Mineralisierte Knochenfläche [mm² und %] des periostalen und endostalen Kallus. Diese Fläche beinhaltet nur den mineralisierten Knochen ohne Bindegewebe und Knorpel.
- Bindegewebsfläche des periostalen und endostalen Kallus [mm² und %].
- Knorpelfläche des periostalen und endostalen Kallus [mm² und %].
- Analyse des Osteotomiespaltes.
- Kollagen-II Areale des periostalen und endostalen Kallus im Paraffinpräparat [%].
- In der Movat Pentachrom-Färbung Analyse der Bindegewebs- und Knochenflächen des periostalen und endostalen Kallus sowie des Osteotomiespaltes für die Bestimmung der Dichte der Gefäße und Osteoklasten sowie für die Berechnung des Kollagen-II Anteils.

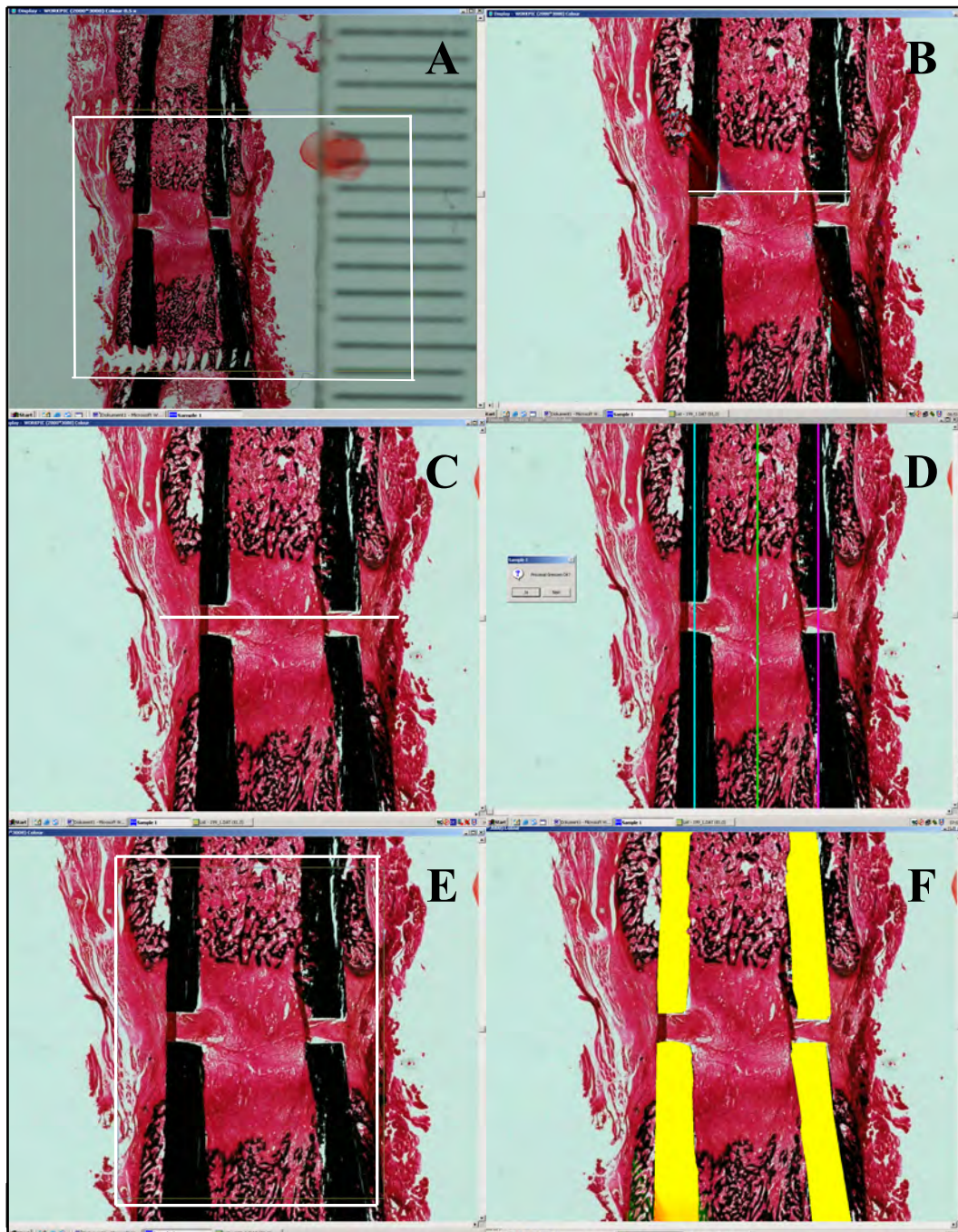


Abb. 7: Wichtige Schritte der histomorphometrischen Bildanalyse (Safranin O/v. Kossa)

- A) Kalibrierung auf 10 mm Kantenlänge anhand des fotografierten Lineals.
- B) Einzeichnung der Kortikalisbreite (Durchmesser der Kortikalis).
- C) Einzeichnung der maximalen Gesamtkallusbreite auf Höhe des Osteotomiespaltes.
- D) Bestimmung der proximalen Markraummittelpunktes sowie der lateralen (linken) und medialen (rechten) Kortikalismitte.
- E) Einstellung der rechteckigen ROI durch den Computer. Die Höhe wird vom Computer vorgegeben, die Breite orientierte sich am Gesamtkallusdurchmesser.
- F) Einzeichnen der Kortikalis (gelb).

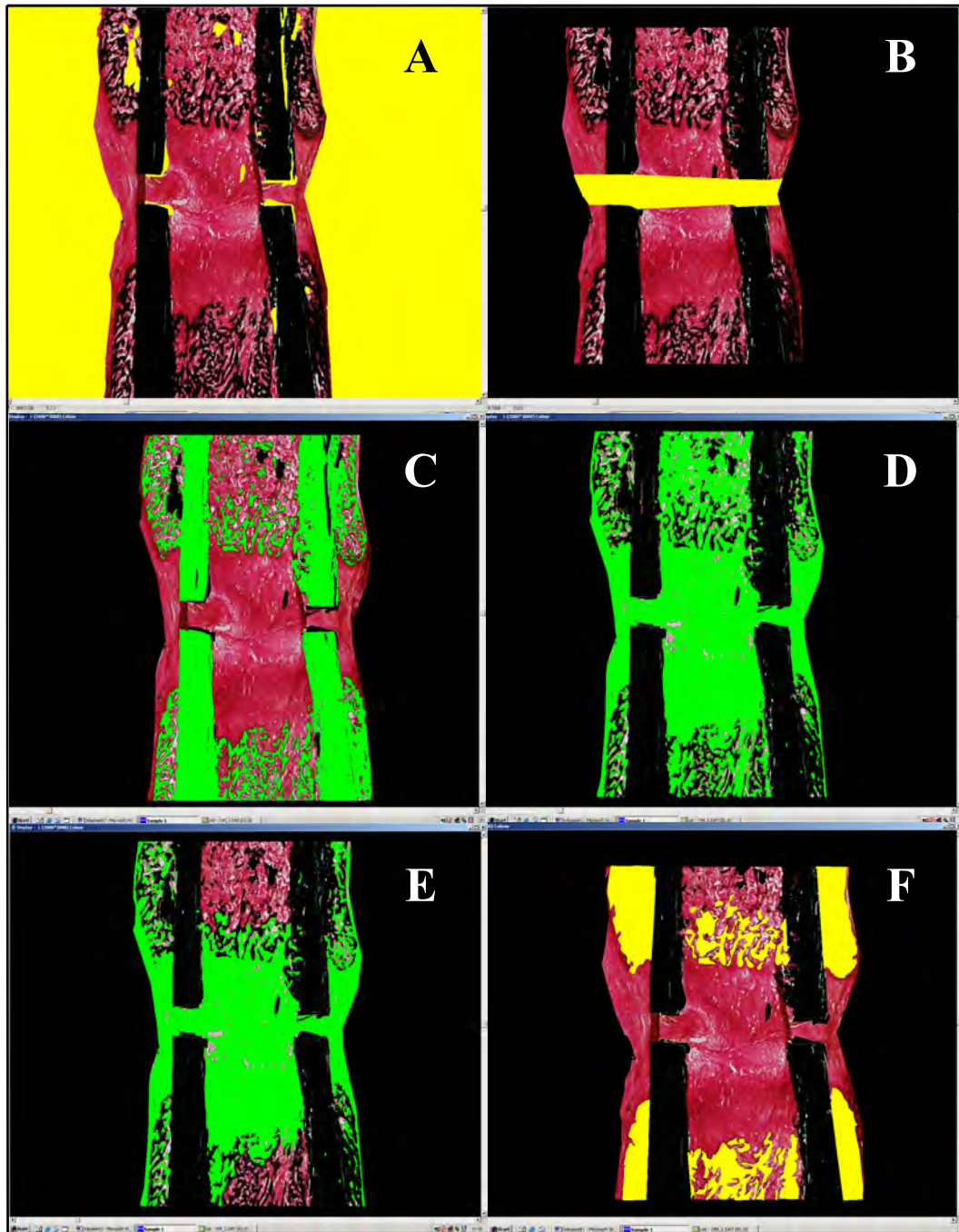


Abb. 8: A) Manuelle Festlegung der endgültigen ROI-Breite und Markierung aller Artefakte als Leerräume (gelb). Diese Leerräume werden von den jeweiligen Flächen subtrahiert, da nicht bekannte ist, welche Gewebe sie enthalten.
B) Markierung der Osteotomiespaltfläche (gelb).
C) Sequenzierung des Knochengewebes. Der Computer erkennt schwarz gefärbte Strukturen und markiert diese grün. Manuelle Korrektur durch den Benutzer möglich.
D) Sequenzierung des Bindegewebes . Der Rechner erkennt rot gefärbte Strukturen und markiert diese bei diesem Arbeitsschritt grün. Hier ohne Entfernung des Knochenmarks.
E) Darstellung der Bindegewebsmaske nach manueller Entfernung des Knochenmarks.
F) Manuelle Festlegung der Hartkallusbereiche (gelb).

3.5.4 Histologische Auswertung

- **Gefäßzählung**

Um die Zählung der mit Hilfe immunhistochemischer Methoden dargestellten Gefäße zu vereinfachen und zu standardisieren, wurden die α -SMA gefärbten Präparate mit Hilfe eines Mikroskops und einer computergestützten Software (AxioVision) digitalisiert. Im Anschluss erfolgte die Erstellung der ROIs mit einem Photoprogramm (Adobe Photoshop Version 7.0). Dadurch wurde gewährleistet, dass die Zählung der Gefäße innerhalb der definierten ROI erfolgte. Während der Digitalisierung der Bilder wurde ein Maßstabsbalken eingefügt. Mit Hilfe dieses Maßstabes war es möglich, die Höhe der ROIs von Präparat zu Präparat einheitlich zu ermitteln. Die Breite der ROIs variierte, wie unter 3.5.1 beschrieben, von Tier zu Tier. Auch war es durch den Maßstabsbalken möglich, die Gefäße in kleine und große Gefäße zu unterteilen. Als kleine Gefäße galten dabei solche, deren Außendurchmesser weniger als 40 μm betrug, als groß entsprechend Gefäße, deren Durchmesser über 40 μm lag. Das Photoprogramm ermöglichte die farbliche Markierung bereits gezählter Gefäße, so dass diese nicht versehentlich mehrmals gezählt wurden. Als Gefäß galten dabei alle Strukturen, die eine positive Farbreaktion zeigten und/oder bei denen Endothelzellen identifiziert werden konnten. Die Darstellung des Lumens war nicht zwingen erforderlich, half aber bei der Identifizierung eines Gefäßes, wenn die eben genannten Kriterien erfüllt wurden.

Die Auszählung der Gefäße fand innerhalb der unter 3.5.1 definierten Bereiche statt. Zunächst erfolgte die Zählung an jeder mit „1“-„4“ bezifferten Kortikalis im periostalen und endostalen Bindegewebe. Die an der Kortikalis „1“ im periostalen resp. endostalen Bindegewebe gezählten Gefäße wurden mit denen des periostalen resp. endostalen Bindegewebes der Kortikalis „2“ addiert, so dass auf diese Weise die Gefäßzahl der lateralen Seite ermittelt wurden. Ebenso wurde mit den Gefäßen der medialen Seite verfahren. Die Gesamtgefäßzahl des Bindegewebes des periostalen bzw. endostalen Kallus konnte durch die Summierung der lateralen mit der medialen Seite ermittelt werden. Die Gefäßzahl des Osteotomiespaltes wurde zusätzlich bestimmt. Es muss dabei beachtet werden, dass der Osteotomiespalt eine Teilfläche der periostalen und endostalen ROIs darstellt. Die Gefäßdichte erhielt man durch Dividierung der Gefäßzahl durch die in der Movat-Pentachrom-Färbung histomorphometrisch bestimmten Bindegewebsfläche einer jeden Sub-ROI.

- **Bestimmung der osteoklastischen Dichte**

Da das Digitalisieren der Präparate aufgrund der erforderlichen Vergrößerung durch das Axio Vision Programm nicht möglich war, erfolgte die Osteoklastenzählung manuell unter dem Mikroskop in einer 40fachen Vergrößerung. Als Osteoklasten galten alle Zellen, die sich positiv (rosa) durch die Anfärbung des Enzyms saure Phosphatase darstellten, mindestens zwei Zellkerne besaßen und Kontakt zu knöchernen Strukturen aufwiesen. Die Festlegung der interessierenden Bereiche erfolgte mit Hilfe eines eigens zu diesem Zweck konstruierten Plexiglasses, dessen Breite exakt sieben Millimeter betrug und in deren Mitte, also bei 3,5 mm, eine Markierung ersichtlich war. Da die Fehlerquelle durch diese Zählweise im Vergleich zur Zählung der Gefäße höher lag, wurden die Osteoklasten dreifach gezählt. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet. Die Zählung der Osteoklasten erfolgte an jeder Kortikalis („1“-„4“) und im entsprechenden periostalen und endostalen Kallus. Die im periostalen Kallus an den beiden lateralen bzw. medialen Kortikalis gezählten Osteoklasten wurden im Anschluss addiert. So erhielt man die Anzahl Osteoklasten im periostalen Kallus der jeweiligen Seite. Auf die gleiche Weise wurde mit den endostal und kortikal gezählten Osteoklasten verfahren. Die Gesamtzahl der Osteoklasten des periostalen und endostalen Kallus sowie der gesamten Kortikalis wurde durch die Addition der lateralen und medialen Seite des jeweiligen knöchernen Bereiches erreicht. Die Osteoklasten gingen nicht als Absolutzahl in die Auswertung ein, sondern wurden auf einen Quadratmillimeter Knochenfläche bezogen. Die Osteoklastendichte erhielt man, indem die Osteoklasten, die innerhalb einer Knochenfläche vorkamen, durch die jeweilige Knochenfläche dividierte, die histomorphometrisch mit Hilfe der Movat Pentachrom-Färbung bestimmt wurde.

3.5.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogrammes SPSS für Windows 14.0 (SPSS Deutschland GmbH, München, Deutschland).

Als beschreibende Statistik wurden in tabellarischer Form der Median-, der Minimum- und Maximumwert (Min-Max) sowie der p-Wert angegeben.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Boxplots (Abb. 9). Ein Boxplot zeigt die Lage und Verteilung der Werte einer Variablen. Er besteht aus einer Box und zwei Whisker. Der Median (50 %-Perzentil) wird als schwarze horizontale Linie innerhalb des Körpers der Box dargestellt. Die untere Grenze der Box kennzeichnet das 25 %-Perzentil, die obere Grenze das 75 %-Perzentil. Innerhalb des durch die Box

dargestellten Wertebereichs liegen die mittleren 50 % der Werte. Die Whisker schließen sich dem Körper der Box an und umfassen maximal die 1,5-fache Boxenbreite nach unten bzw. oben. Die Querstriche der Whisker markieren den kleinsten resp. größten Wert, jedoch ohne Ausreißer und Extremwerte. Ausreißer werden in Form eines Kreises dargestellt und umfassen Werte, die zwischen der 1,5-fachen und dreifachen Länge der Box vom 25 %- bzw. 75 %-Perzentilpunkt entfernt liegen. Extremwerte sind mehr als drei Boxenlängen von der Begrenzung des Boxenkörpers entfernt und werden als Stern markiert. Die Zahlen neben den Ausreißern und Extremwerten bezeichnet die dazugehörige Tiernummer.

Da nicht von einer Normalverteilung der betrachteten Parameter ausgegangen werden konnte, erfolgte der Vergleich beider von einander unabhängiger Gruppen (Einteilung siehe 3.1.2) mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Dieser Test ist ein nichtparametrischer Zwei-Stichproben-Test, der keine Normalverteilung voraussetzt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $\alpha = 0,05$ angenommen, das Signifikanzniveau wurde somit bei 5 % festgelegt.

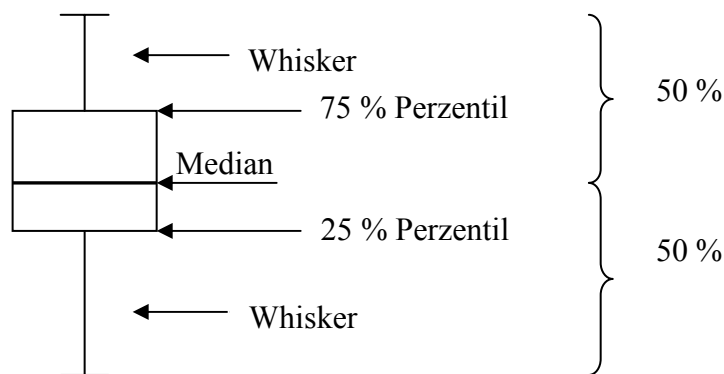


Abb. 9: Boxplot