

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Tiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 64 geschlechtsreife, weibliche Yucatan-Miniaturschweine³ mit einem Durchschnittsalter von 17,7 Monaten (10,5 bis 30 Monate) zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns (Panepinto, Phillips *et al.* 1978; Panepinto und Phillips 1981; Panepinto und Phillips 1986). Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn regelmäßigen Gewichts- und Gesundheitskontrollen unterzogen und waren zum Versuchsbeginn in einwandfreiem gesundheitlichen Zustand.



Abbildung 3.1-1: Yucatan-Miniaturschweine

3.1.2 Tierhaltung

Die Unterbringung der Tiere erfolgte freilaufend in Gruppen zu 4-6 Tieren in 13,25 m² großen Gehegen auf Betonboden mit Stroheinstreu. Zur Beschäftigung der Tiere standen an Ketten aufgehängte Gummibälle zur Verfügung. Die Gehege wurden täglich gesäubert. Wasser wurde über zwei Nippeltränken pro Gehege ad libitum angeboten, gefüttert wurden die Tiere mit einem kommerziell erhältlichen Alleinfuttermittel in Pelletform⁴.

³ Charles River, Frankreich

⁴ ssniff MPig-H, 4 mm, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

Die Zusammensetzung des Futters war wie folgt:

Rohprotein: 16%, Rohfett: 3% Rohfaser: 6%, Rohasche: 6,5%, Lysin: 0,9%, Methionin: 0,3%, Kalzium: 1%, Phosphor: 0,7%, Magnesium 0,2%, Natrium: 0,2%, sowie folgende Zusatzstoffe: Vitamin A: 15.000 I.E., Vitamin D₃: 1.000 I.E., Vitamin E: 100 mg.

Die Tiere erhielten 2% ihres Körpergewichts an Futter, verteilt auf zwei Rationen täglich.

Es wurde ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus angeboten, die Raumtemperatur betrug in Tierhöhe 20°C, die Luftfeuchtigkeit 70%.

3.2 Methodik

3.2.1 Versuchsanordnung

Die Schweine wurden vor Versuchsbeginn nach ihrem Gewicht und Alter sortiert. Anhand dieser Kriterien wurden annähernd gleiche Paare gebildet, wovon willkürlich eines der beiden Tiere nach der Operation tägliche Injektionen von rekombinantem porcinem Wachstumshormon, das andere als Kontrolltier tägliche Injektionen eines Placebos erhielt. Tiere aus der Wachstumshormon- und der Placebogruppe wurden zusammen gehalten. Die Tiere wurden abhängig vom Eintrittszeitpunkt in den Versuchsablauf fortlaufend nummeriert.

Die vorliegende Studie wurde an Tieren durchgeführt, denen gleichzeitig eine Fraktur am kontralateralen Hinterbein gesetzt wurde. Die Anwendung von zwei Modellen an einem Tier geschah aus Gründen des niedrigen Versuchstierverbrauchs. Alle Versuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde⁵ durchgeführt.

Allen Tieren wurde am linken Femur im proximalen Drittel des lateralen Rollkammes ein osteochondraler Defekt gesetzt. Der Defekt hatte einen Durchmesser von 6 mm und durchdrang den subchondralen Knochen 1 mm. Aufgrund des Tibiadefekts oder der Osteotomie am rechten Hinterbein wurde der Knorpeldefekt in diesen Bereich mit geringer Belastung gelegt, um den Schweinen eine möglichst schnelle Vollbelastung des linken Hinterbeins zu ermöglichen.

Die Tiere 1, 2, 4, 5, 6 und 8 wiesen bedingt durch die Operation am kontralateralen Hinterbein von der Gruppeneinteilung abweichende Heilungszeiten auf. Die Tiere 38, 39, 41 und 42 gehörten einem gesonderten Versuch an. Die osteochondralen Defekte der Tiere 45 und 46 wurden aufgrund einer stationären Patellaluxation nach medial am linken Hinterbein von der Auswertung ausgeschlossen.

⁵ = Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi), G 0447/96

Die Versuchsgruppen waren wie folgt zusammengesetzt:

Gruppe I: 4 Wochen Standzeit, 24 Tiere, Tibiaosteotomie, rechts

	Tiernummer
GH-Gruppe	27, 30, 34, 44, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64
Placebo-Gruppe	29, 31, 36, 43, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63

Gruppe II: 6 Wochen Standzeit, 23 Tiere, Tibiadeфекt, rechts, 1cm

	Tiernummer
GH-Gruppe	3, 7, 9, 10, 13, 14, 17, 24, 26, 33, 37, 48
Placebo-Gruppe	5, 11, 12, 15, 16, 18, 28, 32, 35, 40, 47

Gruppe III: 12 Wochen Standzeit, 6 Tiere, Tibiadeфекt, rechts, 1cm, Periostresektion

	Tiernummer
GH-Gruppe	19, 20, 22
Placebo-Gruppe	21, 23, 25

3.2.2 Narkose und Operation

3.2.2.1 Operationsvorbereitung

Vor der Operation fasteten die Tiere 12 Stunden. Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

Nachdem das entsprechende Tier in einen fahrbaren Käfigwagen separiert worden war, erhielt es eine intramuskuläre Injektion von 0,05 mg/kg KGW Atropin⁶ und 4 mg/kg KGW Azaperon⁷ in einer Mischspritze. Nach 30 min erfolgte die intravenöse Injektion von 0,4 mg/kg KGW Etomidat⁸ in die Ohrvene des sedierten Tieres. Daraufhin wurde das Tier auf einem fahrbaren Operationsisch in den Vorbereitungsraum und dort in Brust-Bauchlage gebracht. Über einen in die Ohrvene gelegten Venenverweilkatheter wurde die erforderliche

⁶ = 0,1ml/kg KGW Atropinsulfat 0,5mg, B. Braun

⁷ = 0,1ml/kg KGW Stresnil[®], Janssen

⁸ = 0,2ml/kg KGW Etomidat-[®] Lipuro, B. Braun

Menge an Blutproben entnommen und 0,5 g Thiopental⁹ intravenös verabreicht. Sofort anschließend wurde das Tier mit einem 9 mm Tubus mit Führungsstab unter Benutzung eines Laryngoskopes nach Foregger intubiert und an die Beatmungsmaschine¹⁰ angeschlossen. Beatmet wurde mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch. Es wurden 2 ml Pancuronium¹¹ intravenös verabreicht. Das Tier wurde nun in die rechte Seitenlage gebracht, die rechte und linke Hintergliedmaße sowie die linke Halsseite wurden geschoren und zunächst gründlich mit Wasser und Waschlotion¹² gewaschen. Die Klauen aller vier Gliedmaßen wurden mit Mullbinden umwickelt. An der seitlichen Brustwand wurden EKG-Klebelektroden angebracht.

An den intravenösen Zugang am Ohr wurde ein Dreiwegehahn angebracht, an dem im Operationssaal eine kontinuierliche Infusion von 0,5 ml/h Fentanyl¹³ über einen Perfusor¹⁴ angeschlossen wurde sowie ein Antibiotikumtropf¹⁵, der dann durch eine Dauertropfinfusion von einem Liter Vollelektrolytlösung¹⁶ ersetzt wurde.

Das Tier wurde mitsamt fahrbarem Operationstisch in den Operationssaal verbracht, dort erfolgte eine Desinfektion beider Hinterbeine und der linken Halsseite mit Jodpolyvidonlösung¹⁷, danach wurde der gesamte Körper unter Aussparung der soeben desinfizierten Bereiche steril abgedeckt.

Die Narkose während der Operation wurde mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch fortgesetzt, wobei die Konzentration des Isoflurans¹⁸ zwischen 1 bis 1,5 Vol%, die des Sauerstoffs bei 40 Vol% lag. Die Lachgasmenge betrug abhängig von der Konzentration der beiden anderen Gase zwischen 58,5 und 59 Vol%. Die Beatmung wie auch die Gasnarkose erfolgten über ein Beatmungsgerät¹⁹ mit separat angebrachtem Isofluranverdampfer²⁰.

⁹ =20 ml Trapanal[®], Byk Gulden

¹⁰ Sulla 800V, Capnolog, Ventilog, Isofluran Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck

¹¹ Pancuronium Curamed[®], Curamed Pharma GmbH, 76202 Karlsruhe

¹² Lifosan soft, B.Braun, Melsungen

¹³ =25 µg/kgKGW/h Fentanyl 0,5mg Curamed[®], Curamed Pharma GmbH, 76202 Karlsruhe

¹⁴ Secura FT, B.Braun, Melsungen

¹⁵ Augmentan 2,2g[®], SmithKline Beecham, 80791 München

¹⁶ Thomaejonin[®], Boehringer Ingelheim, Delta Pharma GmbH, 72793 Pfullingen

¹⁷ Braunol[®], B. Braun, Melsungen

¹⁸ Forene[®], Abbott GmbH, 65205 Wiesbaden

¹⁹ Servo Ventilator 900D, Siemens Elema, Schweden

²⁰ Isoflurane Vaporizer 952, Servo Ventilator, Siemens Elema, Schweden

Als Vitalparameter wurden die Herzfrequenz, die Sauerstoffsättigung über eine Schwanzmanschette²¹ und die expiratorische CO₂-Konzentration über eine Patienteneinheit²² gemessen und angezeigt. Das Atemminutenvolumen wurde zum Beginn der Narkose mit 10 ml/kg KGW und die Atemfrequenz mit 10-12 Atemzügen/min eingestellt und gegebenenfalls unter Kontrolle des respiratorischen CO₂-Wertes korrigiert. Dieser sollte sich zwischen 32 und 36 mmHg befinden.

3.2.2.2 Operation

Die Operationen wurden in folgender Reihenfolge vorgenommen:

Portimplantation in die linke Vena jugularis interna

Das verwendete Portsystem²³ bestand aus einem Katheterschlauch und dem passenden Portkissen. Der Katheterschlauch wurde über die ligierte linke *Vena jugularis interna* herzwärts in die *Vena cava cranialis* vorgeschoben. Das Portkissen wurde mit dem Katheter verbunden und im Bereich der linken *Regio colli posterior* implantiert.

Defektosteotomie rechte Tibia

Im diaphysären Bereich der rechten Tibia wurde eine Defektosteotomie durchgeführt, die Stabilisierung erfolgte von medial mit einer 8- bis 10-Loch-DCP. Bei der Gruppe I wurde die Tibia lediglich in ihrer Mitte mit der oszillierenden Säge durchtrennt, das Sägeblatt besaß eine Stärke von 1mm Die Tiere der Gruppen II und III wurden in identischer Vorgehensweise mit einem 1 cm breiten Defekt versehen, bei der Gruppe III erfolgte eine zusätzliche Resektion des Periostschlauches.

²¹ wiederverwendbarer SaO₂-Aufnehmer/Finger, Hewlett Packard

²² Hewlett Packard Model 66S, M1166A

²³ GPV-AC91S, UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande

Osteochondraler Stanzdefekt linker lateraler Femurkondylus

Nach einem ca. 8 cm langen Hautlängsschnitt anterolateral des linken Kniegelenks erfolgte die Präparation zunächst bis zum Kapsel-Bandapparat sowie die Längseröffnung der Gelenkkapsel etwa 2 mm vom lateralen Patellarand, bis eine spannungsfreie Luxation der Patella nach medial möglich wurde. In ca. 110°-Beugung war jetzt das proximale Drittel des lateralen Femurkondylus gut zugänglich. Dort wurde eine Stanze mit einem Innendurchmesser von 6 mm aufgesetzt und in den Gelenkknorpel eingedrückt. Die Position der Stanze wurde nicht verändert und mit einem 6 mm Bohrer, der mit einem 1 mm Tiefenanschlag versehen war, durch die Stanze noch weiter in die subchondrale Knochenlamelle gebohrt. Somit entstand ein definierter osteochondraler Defekt im proximalen Drittel des linken lateralen Femurkondylus mit einem Durchmesser von 6 mm.

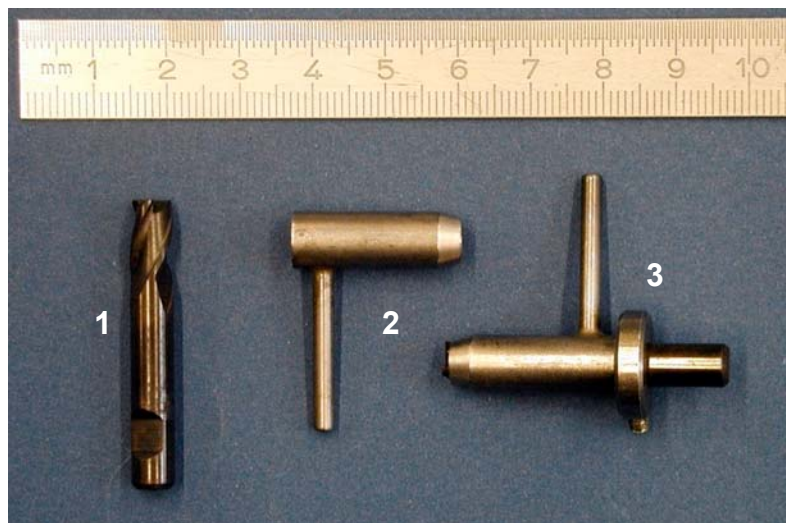
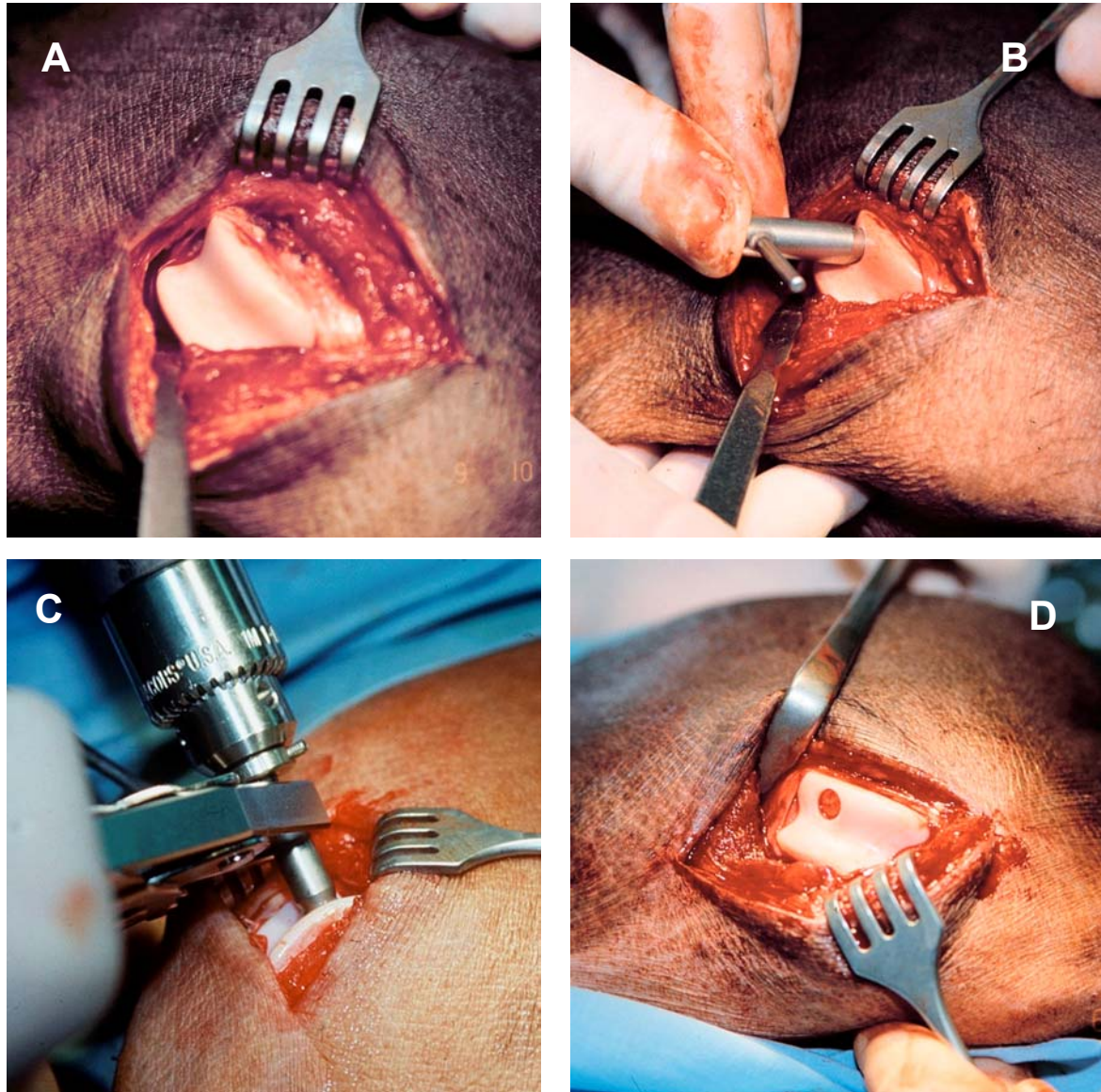


Abbildung 3.2-1 Gegenstände zum Herstellen des osteochondralen Stanzdefekts (1 = Bohrer, \varnothing 6 mm, 2 = Stanzhülse, 3 = Distanzhalter, 1 mm ab Bohrerspitze)

Histologische Untersuchungen von identisch gesetzten Defekten in Femurkondylen von toten Schweinen zeigten, daß der Defekt den subchondralen Knochen im Schnitt 1,5 mm durchdrang. Darauf wird in der Diskussion der Methoden eingegangen. Zudem mußte dieses bei der histomorphometrischen Auswertung berücksichtigt werden.

Unter Streckung des Kniegelenks erfolgte die Reposition der Patella, anschließend eine raffungsfreie Naht des Kapsel-Bandapparates. Unter strenger Kontrolle auf Bluttrockenheit erfolgte nun der schichtweise anatomische Wundverschluß und abschließend die Hautnaht.



*Abbildung 3.2-2 Kreieren des osteochondralen Defekts intra operationem. (\varnothing 6 mm, Tiefe ab Knorpel-Knochen-Grenze durchschnittlich 1,5 mm)
 A: Eröffnetes Kniegelenk, Blick auf die Femurkondylen; B: manuelles Durchstanzen des Gelenknorpels; C: Bohren in die subchondrale Knochenplatte; D: osteochondraler Defekt im proximalen Anteil des lateralen Femurkondylus*

3.2.2.3 Postoperative Versorgung

Die Wunden wurden mit Sprühpflaster²⁴ abgedeckt. Danach wurde das Tier in einen Käfigwagen verbracht, dieser war mit einer Wärmelampe ausgestattet. Wasser wurde sofort nach dem Aufwachen angeboten, Futter erst am Morgen des nächsten Tages. Am auf die Operation folgenden Tag wurde das Schwein wieder in seine gewohnte Gruppe zurückgebracht. Den Tieren war es gestattet, sich frei zu bewegen.

Den Tieren der Gruppe I wurde während der Operationsvorbereitung ein Fentanylpflaster²⁵ auf die Innenseite des rechten Unterarms geklebt. Dieses Pflaster enthält insgesamt 7,5mg Fentanyl und gibt kontinuierlich eine Menge von 75 µg/h ab. Das Pflaster wurde am 4. Tag nach Operation entfernt. Die Tiere der Gruppe II und III erhielten postoperativ für 7 Tage jeweils 50 mg Flunixin-Meglumin²⁶/Tier/d subkutan. Die Fäden wurden am 8. Tag nach der Operation gezogen.

3.2.3 Weiterer Verlauf

3.2.3.1 Haltung

Die Haltung der Tiere erfolgte auch nach der Operation in der gewohnten Umgebung und Gruppe, die Tiere durften sich frei in ihrem Stall bewegen. Das Licht-, Klima-, Fütterungs- und Tränkregime wurde beibehalten.

3.2.3.2 Applikation von Wachstumshormon/Placebo

In einer 50ml Glasflasche befanden sich 100 mg lyophilisiertes rekombinantes porcines Wachstumshormon²⁷, diese wurde mit 11,65 ml sterilem Aqua dest.²⁸ gefüllt, sodaß 0,1 ml der entstandenen Lösung 4 I.E. Wachstumshormon entsprachen. Die Lösung wurde, dem Gewicht der einzelnen Schweine entsprechend, in Insulinspritzen aufgezogen, diese wurden bei -20°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

Jeden Tag zwischen 8⁰⁰ -10⁰⁰ Uhr erhielten die Tiere der GH-Gruppen eine ihrem Gewicht entsprechende Menge (100 µg/kg KGW=1 I.E./2 kg KGW) an Wachstumshormon, die Tiere

²⁴ Ankerplast[®], Chauvin Ankerpharm GmbH, 07407 Rudolstadt

²⁵ Durogesic 75µg/h[®], Janssen

²⁶ =1ml Finadyne[®], Essex

²⁷ porcine growth hormone (met-pGH), Bresatec, Australien

²⁸ aqua ad injectabilia, B. Braun

der Placebogruppen 1 ml sterile NaCl-Lösung. Die Substanzen wurden subkutan am Ohrgrund verabreicht. Die erste Injektion erfolgte am Tag der Operation.

3.2.3.3 Kontrolle des Heilungsverlaufs

Täglich erfolgte eine visuelle Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere, die Futter- und Wasseraufnahme wurden dokumentiert, das Allgemeinverhalten und Gangbild der Tiere registriert. Im viertägigen Rhythmus wurden die Tiere in Sedation eingehend untersucht. Dies erfolgte in Form von Blutentnahmen, Röntgen und Sonographie des rechten Unterschenkels. Das linke Knie wurde palpatorisch befundet. Die aus den Blutentnahmen ermittelten Parameter gingen mit in die Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustands der Tiere ein. Vor der Blutentnahme wurde mit Hilfe eines digitalen Thermometers rektal die Körpertemperatur des zu untersuchenden Schweines bestimmt und abschließend nach jedem Untersuchungskomplex das Gewicht des Tieres ermittelt. Dazu wurde das noch sedierte Tier in einer Hängematte in eine Käfigwaage²⁹ gehängt.

3.2.3.4 Ganganalyse

Jeweils sechs Tiere der Gruppen II und III wurden zu Ganganalysen herangezogen. Die Tiere liefen dabei freiwillig hinter der Untersucherin, die einen futtermgefüllten Eimer hält, über eine drucksensitive Kraftmeßplattform³⁰, sie konnten somit ihr Tempo selbst bestimmen.

Die Messungen erfolgten einen Tag vor der Operation, am dritten postoperativen Tag und dann in wöchentlichen Abständen bis zur Tötung der Tiere.

Ein Meßzyklus umfaßte ein Vorderbein mit dem gleichseitigen Hinterbein. Pro Gliedmaße wurden 7 Abdrücke aufgezeichnet. Parallel wurden die subjektiven Eindrücke des Untersuchers zum Bewegungs- und Allgemeinverhalten der Schweine festgehalten. Das aktuelle Gewicht der Tieres zum jeweiligen Meßzeitpunkt wurde ermittelt.

²⁹ Rewa Typ 111, Rewa Waagenfabrik, 4020 Mettmann 1

³⁰ emed SF-4, novel GmbH, München



Abbildung 3.2-3: Ganganalyse: das Schwein läuft freiwillig hinter der Untersucherin her und bestimmt sein Tempo selbst. Der Laufsteg sowie die in diesen eingelassene Gangmeßplattform sind mit einer 3 mm starken Gummimatte abgedeckt.

3.2.3.5 Polychrome Sequenzmarkierung

Den Tieren der Gruppe I wurde an den Tagen 4, 12 und 20, den Tieren der Gruppe II an den Tagen 4, 20 und 40 und den Tieren der Gruppe III an den Tagen 4, 20 und 80 nach der Operation Substanzen zur polychromen Sequenzmarkierung wie folgt verabreicht:

1. Tetrazyklin³¹: 25 mg/kg KGW
2. Xylenol-Orange³²: 90 mg/kg KGW
3. Calcein-Grün³³: 15 mg/kg KGW

Die Substanzen wurden intravenös über das Portsystem verabreicht.

³¹ Supramycin[®], pro infusione, Grünenthal GmbH, 52068 Aachen

³² X-0127, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim

³³ C-0875, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim

3.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Präparate

3.3.1 Tötung und Sektion der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgte abhängig von den zuvor beschriebenen Operationsmethoden nach 28, 42 bzw. 84 Tagen. Das zu tötende Tier wurde zunächst in einem Käfigwagen separiert und über den Port wurden die üblichen Blutproben entnommen. Anschließend erhielt das Tier über den Port 1g Thiopental und 40 ml 14,9 %iges Kaliumchlorid.³⁴ Der Tod wurde über Auskultation des Herzens festgestellt.

Sowohl am linken als auch am rechten Hinterbein wurden Ober- und Unterschenkelknochen präpariert, wobei das Kniegelenk bis zuletzt geschlossen blieb. Nach Eröffnung des linken Kniegelenks wurden zunächst Proben der Synovialmembran entnommen und in gepuffertes Formalin gegeben. Nach vollständiger Befreiung der Ober- und Unterschenkelknochen von Kniegelenkscapsel, -bändern und Menisken wurden die Femora in gepuffertes Formalin gegeben.

3.3.2 Sägen

Zum Sägen der Knochenpräparate wurde ein Trennschleifsystem³⁵ mit einem 1 mm-Sägeband verwendet. Zunächst wurde der linke Oberschenkelknochen so in der Einspannvorrichtung befestigt, daß der Knorpeldefekt senkrecht zum Sägeband lag, das Sägeband sollte sich genau in der Mitte des Knorpeldefekts, in paralleler Ausrichtung zum äußeren Rollkamm befinden.

Mit Hilfe eines Meßschiebers wurden zuvor die genauen Maße der latero-medialen und proximo-distalen Abmessungen des Knorpeldefekts festgestellt. Nun wurde senkrecht zum Defekt, in der Mitte seiner latero-medialen Ausdehnung, gesägt. Dann wurde medial und lateral des Defekts mit identischer Sägeausrichtung gesägt. Jetzt war der laterale Rollkamm des linken Oberschenkels in drei Scheiben zersägt, um diese aus ihrem Gefüge zu lösen, waren noch zwei Sägevorgänge oberhalb und unterhalb des Defekts, im 90°-Winkel zu den drei vorherigen Sägevorgängen, nötig.

Hierbei wurde darauf geachtet, daß mindestens 0,5 cm gesunder Knorpel ober- und unterhalb des Defekts stehenblieben. So erhielt man zwei etwa 3-4 mm dicke viertelkreisförmige Scheiben, in deren abgerundeten Seiten sich jeweils eine Hälfte des senkrecht durchteilten Knorpeldefekts befand.

³⁴ KCL 14,9%, B. Braun, Melsungen

³⁵ Makro-Trennschleifsystem, Exakt Apparatebau GmbH, 22851 Norderstedt

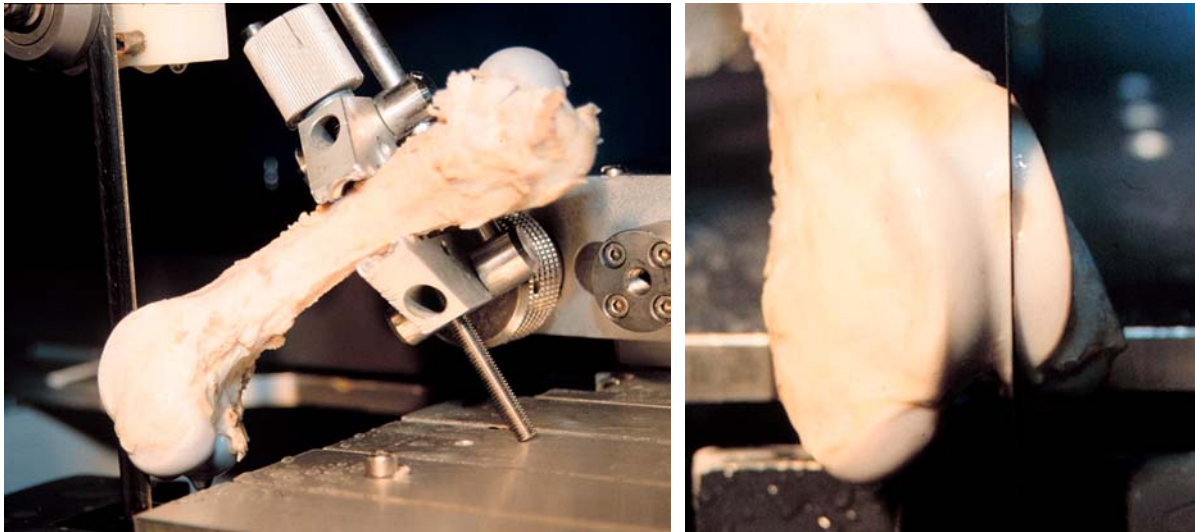


Abbildung 3.3-1: Sägen des Knorpeldefekts. Das Sägeband traf rechtwinklig auf den Defektbereich, der äußere Rollkamm war parallel zum Sägeband ausgerichtet.



Abbildung 3.3-2: Präparatscheibe mit einer Stärke von 3 mm (Knorpeldefekt oben rechts, Mitte)

Die zwei Scheiben wurden in entsprechend beschriftete Uni-Kassetten³⁶ eingelegt. Dabei wurde die zur Defektmittle weisende Seite nach unten positioniert.

³⁶ Tissue IITek®, Sakura Finetek BV, Niederlande

Die mediale Knochen-Knorpel-Scheibe wurde für die histomorphometrische Auswertung genutzt und in Methylmetacrylat eingebettet. Die laterale Scheibe wurde in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch aufgearbeitet.

3.3.3 Fixation

Alle Knochen-Knorpel-Scheiben wurden zunächst für 2-3 Tage in Fixierlösung gelegt. Bei dieser handelte es sich um eine neutrale isotone Formaldehyd-Alkohol-Lösung, die wie folgt zusammengesetzt war: 324 ml Formol (Formaldehyd) 36 %ig, 540 ml Ethanol 100 %ig, 130 ml Barbital-Natrium-Puffer pH 7,4/0,1 molar, 6 g Glukose.

3.3.4 Behandlung der Präparate für die histomorphometrische Auswertung

3.3.4.1 Dehydrieren

Nach der Fixierung wurden die Präparate zunächst unter fließendem Leitungswasser $\frac{1}{2}$ h formalinfrei gewaschen, danach kurz in 40 %iges Ethanol und dann 1 h in 70 %iges Ethanol gegeben. Es folgte für jeweils 2 x 7 Tage die Lagerung in 80 und 96 %igem Ethanol, d.h. das Ethanol wird nach Ablauf einer Woche gewechselt. Dann wurden die Präparate für 3 x 7 Tage in 100 %igem Ethanol gelagert. Als letztes folgte für einen Tag die Aufbewahrung in 100 %igem Xylol, um die Präparate zu entfetten. Für die optimale Infiltration des Alkohols bzw. des Xylols in die Gewebe wurden die Präparategläser mit den enthaltenen Präparaten auf einen Schüttler³⁷ gestellt. Desweiteren waren die Präparategläser lichtdicht mit Alufolie umwickelt.

3.3.4.2 Einbetten in Methylmetacrylat

Bei dem in unserem Histologielabor verwendeten Einbettmedium für die Hartschnitt-Technik handelte es sich um einen Kunststoff auf Methylmetacrylatbasis³⁸. Er wird aus drei Komponenten angesetzt: der Basislösung (Methylmetacrylat), dem Weichmacher und dem Aktivator und polymerisiert bei 30°C unter Luftausschluß aus. Die Anwendung dieses Kunststoffs erlaubt laut Hersteller die Anfertigung von Schnitten ab einer Stärke von 2 µm sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse.

³⁷ HS 501 digital, IKA Labortechnik

³⁸ Technovit 9100®, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

Der Kunststoff wurde direkt vor Gebrauch angesetzt, dabei wurden 94 ml Basislösung, 5 ml Weichmacher und 1 g Aktivator, wie in der beiliegenden Gebrauchsanleitung empfohlen, angesetzt.

Zunächst wurden die Präparate für zweimal 7 Tage in Technovit 9100[®] gegeben. Während der Infiltration wurden die im Kunststoff befindlichen Präparate im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt, um ein Aushärten des Kunststoffs zu vermeiden. Nach der Infiltration wurden die Knochen-Knorpel-Scheiben aus den Uni-Kassetten genommen und einzeln mit der Seite, die den Defekt enthält, nach unten in Glasgefäße plaziert. Deren Boden war mit einer dünnen Schicht bereits auspolymerisierten Technovits 9100[®] bedeckt, damit wurde eine planparallele Lage des Präparats im Glas gewährleistet. Um weiterhin eine Identifikation der Präparate zu ermöglichen, wurde zum einen der Verschluss des Gefäßes entsprechend beschriftet, zum anderen ein mit Bleistift beschrifteter Streifen Papier von oben auf das Präparat gelegt. Danach wurde das Ganze etwa 3 cm mit frisch angesetztem Technovit 9100[®] aufgegossen. Zum Auspolymerisieren wurden die Gefäße für drei Tage bei 37°C in den Brutschrank³⁹ gestellt. Die vollständig ausgehärteten Kunststoffblöcke wurden durch Zerschlagen des Gefäßes freigelegt. Im Anschluß wurde auf der dem Präparat abgewandten Seite mit Hilfe eines Graviergerätes⁴⁰ die Präparatkennung in den Kunststoff gefräst.

3.3.4.3 Anfertigen von Schnitten

Die Blöcke wurden zunächst auf einer Tischanleifmaschine⁴¹ so angeschliffen, daß sie beim Einspannen in das Mikrotom optimalen Halt hatten.

Mit dem Hartschnittmikrotom⁴² mit einem 16 cm 40° Hartmetallmesser wurden 5 µm starke Serienschnitte von den einzelnen Präparaten angefertigt, die auf Glasobjektträger aufgebracht wurden. Zum Aushärten wurden diese in einer Presse zwei Tage im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Vor dem Färben wurden die Schnitte für dreimal 30min in MEA⁴³ (2-Methoxyethylacetat) entplastet, in 100%iges Xylol gegeben und durchliefen dann die absteigende Alkoholreihe.

³⁹ Function Line, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

⁴⁰ Minimot Netzgerät NG 219, Graviergerät GG 12, Proxxon, Niersbach/Eiffel

⁴¹ Phoenix 3000, Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf

⁴² Polycut S Heavy-Duty-Mikrotom, Reichert-Jung Cambridge Instr. GmbH, Nussloch

⁴³ Merck 806061, Merck, Darmstadt

3.3.4.4 Färben der Schnitte

Folgende zwei Standardfärbungen wurden für die histomorphometrische Beurteilung des Defektbereichs ausgewählt:

Safranin-Orange-von Kossa⁴⁴: Knochen ist schwarz, Knorpel und Osteoid leuchtend orangerot gefärbt, Mineralisationsfronten sind schwarz granuliert.

Safranin-Orange-Lichtgrün⁴⁵: Bindegewebe und Knochen sind intensiv grün, Knorpel und Osteoidsäume sowie Zellkerne leuchtend orangerot gefärbt.



Abbildung 3.3-3: Schnittpräparat gefärbt mit Safranin-Orange / von Kossa ca. 15-fache Vergrößerung, Gruppe II: 6 Wochen Standzeit

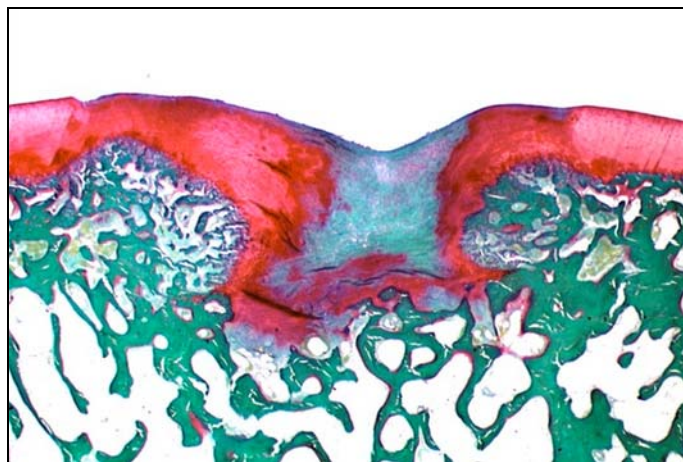


Abbildung 3.3-4: Schnittpräpara, gefärbt mit Safranin-Orange / Lichtgrün ca. 15-fache Vergrößerung, Gruppe II: 6 Wochen Standzeit

⁴⁴ Safranin-Orange: Merck 1382, Silbernitratlösung: Merck 1512,

Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung: Merck 6392, Natriumthiosulfat: Merck 6516, Merck, Darmstadt

⁴⁵ Lichtgrün: 1B 211, Chroma-Gesellschaft, 73257 Köngen/N.