

4.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung

4.5.1 Wachstumsfaktoren

Ein Ziel der Studie war, ein reproduzierbares immunhistochemisches Färbeprotokoll für die vorliegenden knöchernen und knorpeligen Strukturen zu entwickeln. Es wurden ausgewählte Antikörper gegen Wachstumsfaktoren, denen bei der Knorpel- bzw. Knochenheilung eine tragende Rolle zugesprochen wird, verwendet. Das benutzte ABC-Peroxidase bzw. alkalische Phosphatase System erfüllte diese Anforderungen. Alle verwendeten Antikörper zeigten positive Reaktionen in den verwendeten porcinen Präparaten. Parallel gefärbte humane Positivkontrollen sowie Negativkontrollen bestätigten die Spezifität der Färbungen.

Der Antikörper gegen BMP-6 zeigte deutliche intrazelluläre Signale. Der Hintergrund war nicht angefärbt. Der Antikörper gegen TGF- β zeigte ähnlich deutliche intrazelluläre Signale bei einer leichten Verfärbung des umliegenden Gewebes. Die Antikörper gegen IGF-I und IGF-II bewirkten sowohl starke intrazytoplasmatische Signale, als auch eine starke Anfärbung des umliegenden Gewebes. Der gegen den IGF-I- Rezeptor gerichtete Antikörper zeigte eine den IGF-I und II Antikörpern vergleichbare starke intrazytoplasmatische Darstellung mit einem im Vergleich zu diesen etwas schwächer angefärbten Hintergrund.

Die zum Teil sehr starke Hintergrundfärbung konnte durch die Verwendung von 3%igem H₂O₂ zum Blockieren der endogenen Peroxidase nur geringfügig vermindert werden. Hintergrund und Zellzytoplasma färbten sich zum gleichen Zeitpunkt an. Durch ein frühzeitigeres Abbrechen der Farbreaktion konnte also keine selektive Reduktion der Hintergrundfärbung erreicht werden.

Bei einzelnen Präparaten war mit keinem der gegen Wachstumsfaktoren gerichteten Antikörper eine Farbreaktion feststellbar. Allerdings war die Gefäßdarstellung mit dem Antikörper gegen *α -smooth muscle actin* bei diesen Präparaten durchweg erfolgreich.

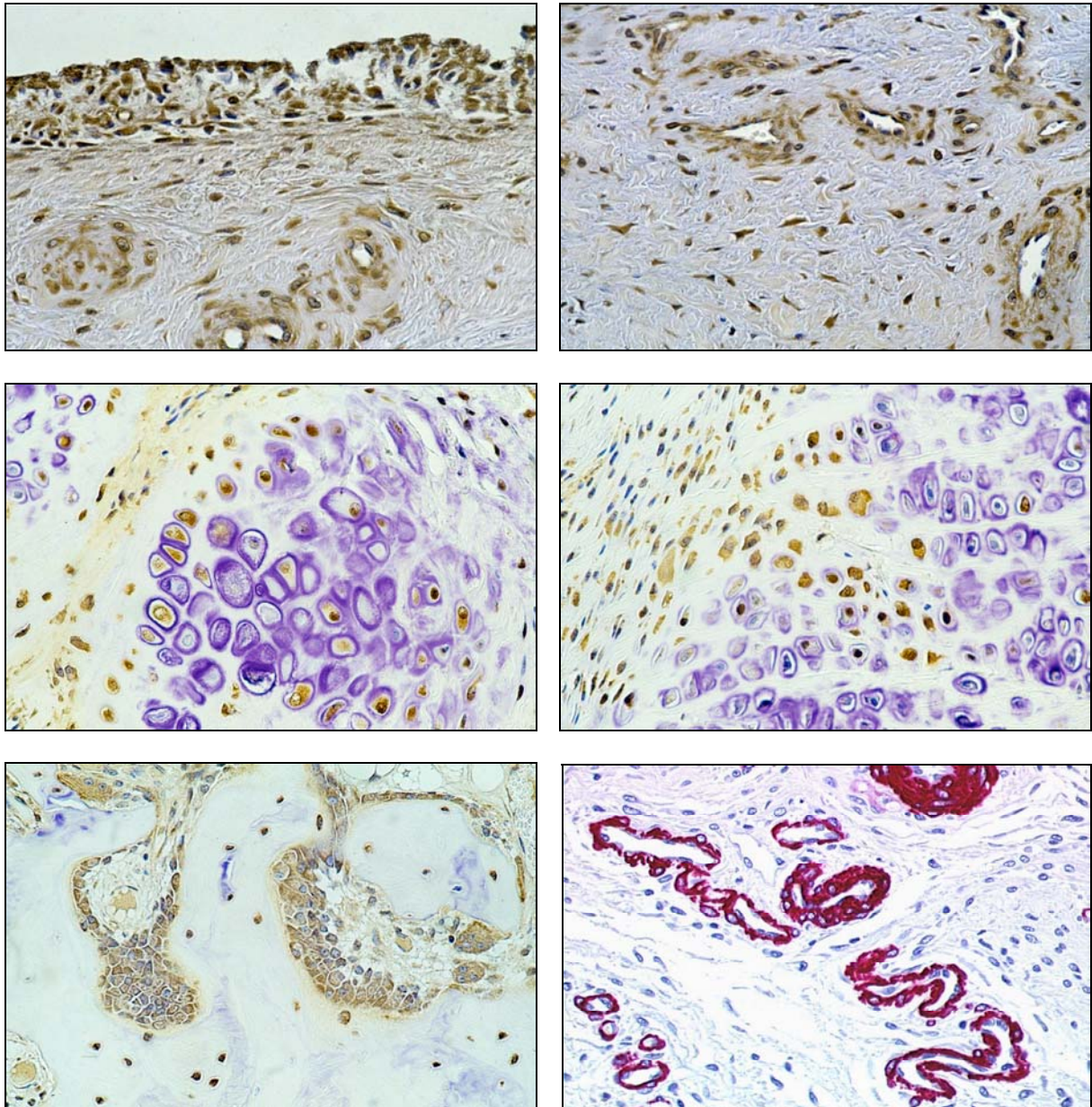


Abbildung 4.5-1: Exemplarische Darstellung aller verwendeten Antikörper, von links oben nach rechts unten: IGF-1, IGF-1Rezeptor, IGF-2, BMP-6, TGF- β , α -smooth muscle actin

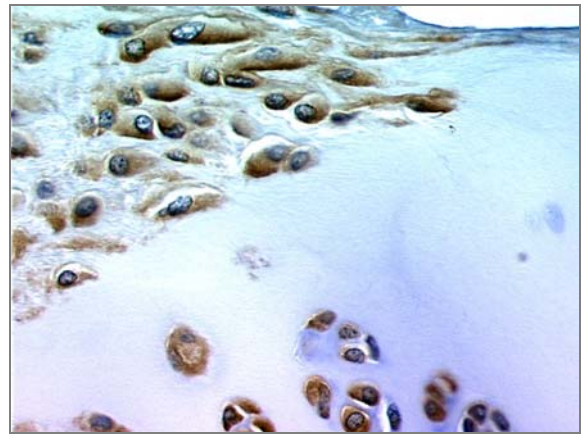


Abbildung 4.5-2: Synovialzellen an der gelenkseitigen Defektfläche in Gruppe I und II (links); Grenzzone zwischen intaktem Knorpel und Defektbereich (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung

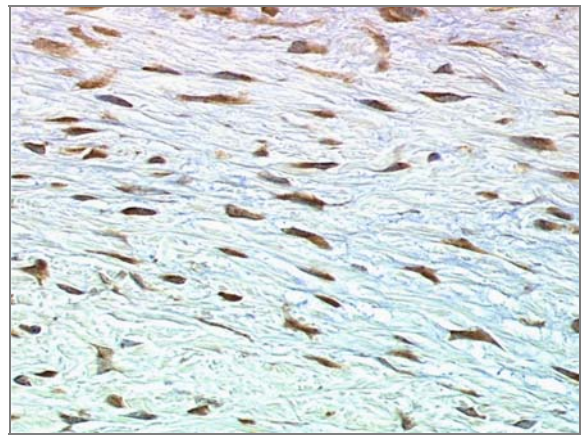
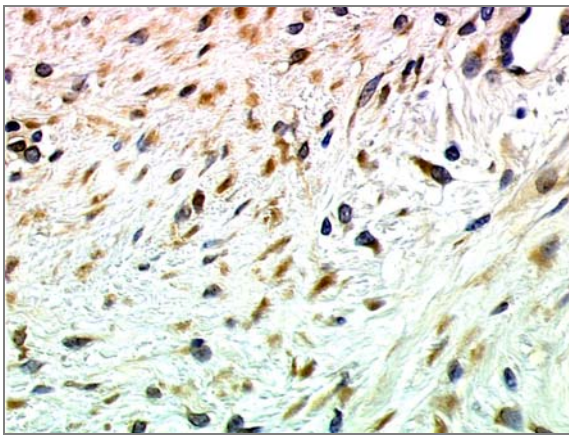


Abbildung 4.5-3: Lockeres Bindegewebe im Zentrum des Defekts mit darin enthaltenen Fibroblasten, überwiegend in Gruppe I zu finden (links), spindelförmige Fibroblasten, tangential ausgerichtete Struktur des Bindegewebes in der oberflächennahen Schicht, in Gruppe I und II (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung

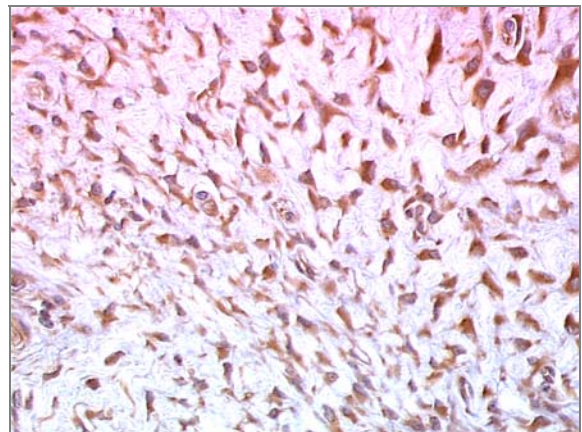
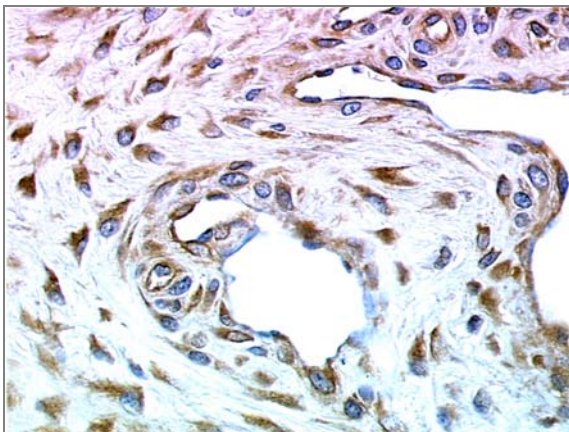


Abbildung 4.5-4: Größere Gefäße in Gruppe II (links); Polymorph sternförmige Fibroblasten (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung

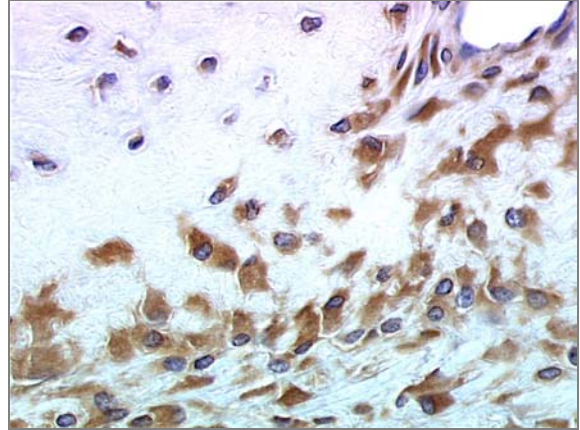
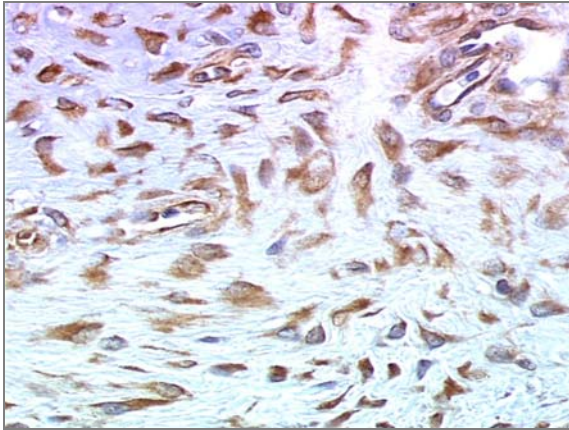


Abbildung 4.5-5: Prächondroblasten (links) und Präosteoblasten (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung

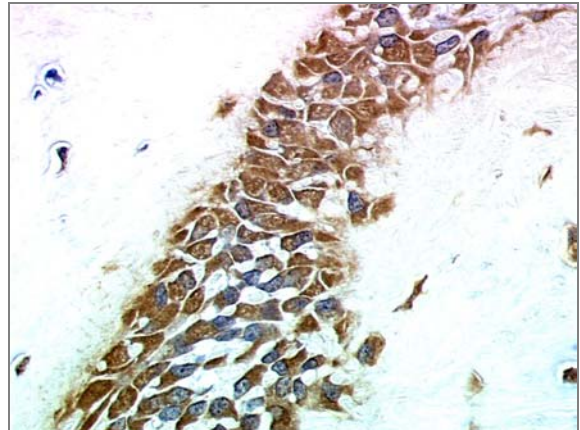
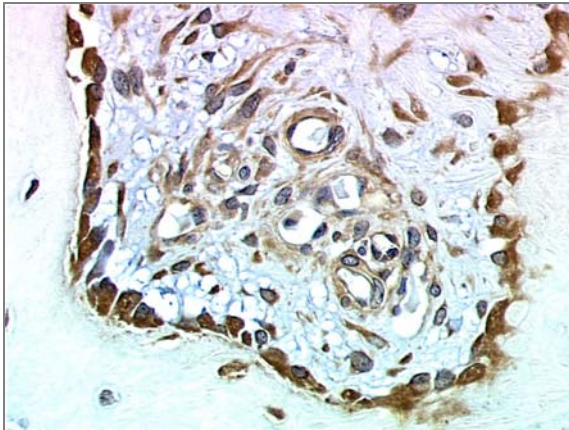


Abbildung 4.5-6: Osteoblasten (links) und Mesenchymzellen in einer Markraumlakune (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung

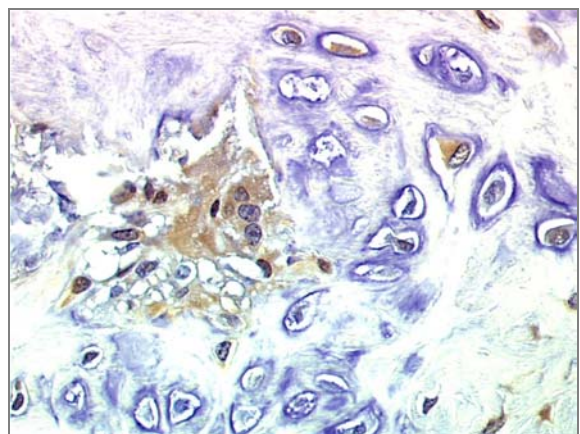
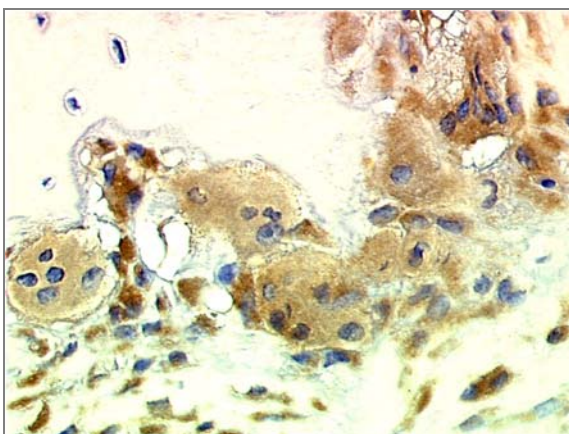


Abbildung 4.5-7: Osteoklasten (links) und Chondroklast (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung

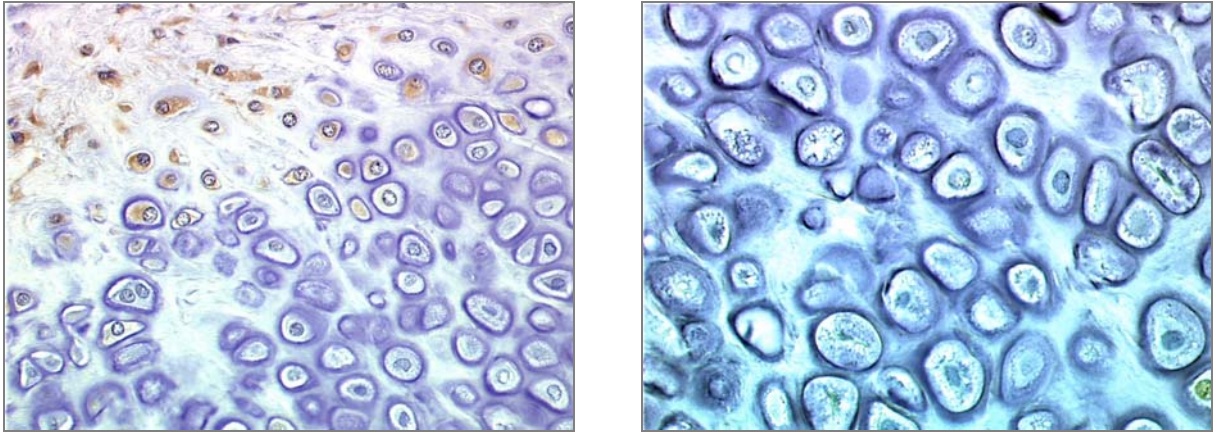


Abbildung 4.5-8: *Hyaliner Knorpel: Randzone einer hyalinen Knorpelinsel mit der Umwandlung von Prächondroblasten in Chondroblasten und Chondrozyten (links); Chondrozyten im Inneren einer hyalinen Knorpelinsel (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung*

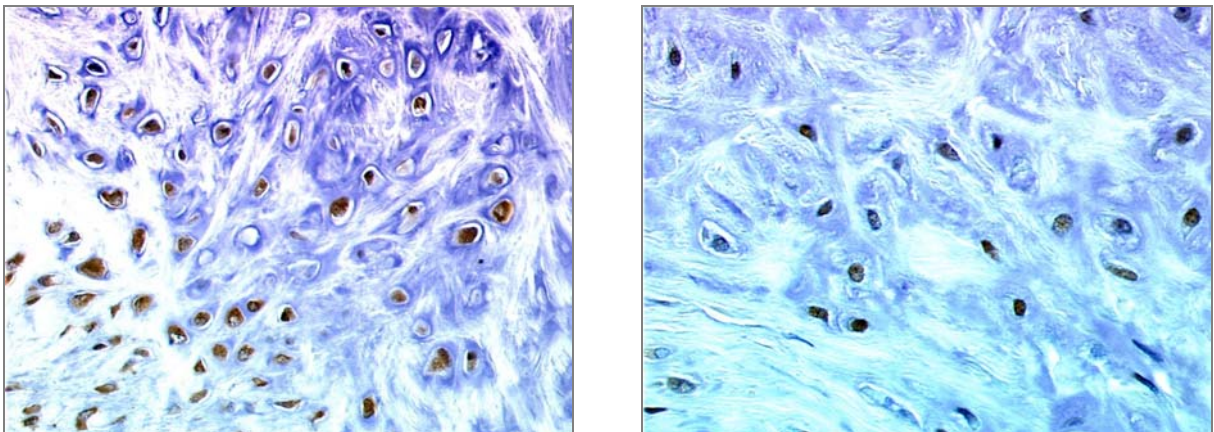


Abbildung 4.5-9: *Faserknorpel: Randzone mit Prächondroblasten und Chondroblasten (links); Positive Chondrozyten im Inneren des Faserknorpelareals (rechts); Darstellung mit anti-BMP-6, ca. 320-fache Vergrößerung*

Alle Fibroblasten, Chondro- oder Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteo- und Chondroklasten waren, unabhängig vom Zeitpunkt nach der Operation, mit allen Antikörpern positiv darstellbar. Osteozyten im Zentrum eines Knochenbälkchens waren in der Regel ungefärbt, d.h. negativ, wohingegen die randständig gelegenen in unmittelbarer Defektnähe vielfach positiv waren (*Abb. 4.5-6; S. 96*). Chondrozyten in neugebildeten Inseln aus hyalinartigem Knorpel waren, sobald sie einen deutlichen Hof aufwiesen, negativ (*Abb. 4.5-8*). In neugebildetem Faserknorpel befindliche Chondrozyten waren am Rand der Knorpelinsel positiv, im Inneren negativ (*Abb. 4.5-9*). Die Chondrozyten des anliegenden intakten Knorpels waren teilweise im direkt dem Defekt anliegenden Randbereich positiv (*Abb. 4.5-2, rechts; S. 95*). Bei einigen Präparaten war die gelenkseitige Tangentialschicht

des intakten Knorpels über die gesamte Präparatausdehnung, unabhängig von der Entfernung zum Defekt, ebenfalls positiv. Gefäße (*Tunica intima*, d.h. Endothel, *Tunica media*, resp. glatte Muskelzellen) waren sowohl im Regenerat als auch im Knochenmarksraum bei allen Antikörpern immer positiv.

Gruppe I:

4 Wochen nach dem Setzen des Defekts war der Defektbereich größtenteils mit Bindegewebe ausgefüllt. Dieses wies an der Defektoberfläche einen parallel zur Gelenkoberfläche ausgerichteten Verlauf auf. Zwischen den Fasern waren langgestreckte spindelförmige Fibroblasten erkennbar (*Abb. 4.5-3 und 4.5-4; S. 95*). Die zum Gelenk hin abschließende Schicht wurde fast immer von einer dünnen Lage rundlicher Zellen gebildet. Diese Schicht wurde aufgrund ihres Erscheinungsbilds als Synovialmembran klassifiziert, die enthaltenen Zellen entsprechend als Synovialzellen (*Abb. 4.5-2, links; S. 95*). Am seitlichen Defektgrund waren bereits Inseln aus neugebildetem hyalinem Knorpel entstanden. Diesen benachbart lagen große gezackte Chondroprogenitorzellen (*Abb. 4.5-8 und 4.5-9, links; S. 97*). Diese Knorpelinseln mit ihren großblasigen Chondrozyten erinnerten an Knorpel, wie er in der Wachstumsfuge zu finden ist. Den Übergang zwischen den spindelförmigen Fibroblasten und den Chondroprogenitorzellen bildeten sternförmige Fibroblasten, die in ihrem Erscheinungsbild beständig in das der Chondroprogenitorzellen übergingen (*Abb. 4.5-4, rechts; S. 95 und 4.5-5, links; S. 96*). Die Chondroprogenitorzellen wiederum wandelten sich zur Knorpelinsel hin in die rundlicheren Chondroblasten um, die als Chondrozyten identifiziert wurden, wenn ein deutlicher Hof zu erkennen war (*Abb. 4.5-8, links; S. 97*). Das Zentrum des Defektbereichs war zu diesem Zeitpunkt noch häufig mit lockerem, ungeordnetem Gewebe gefüllt, das kleine polymorphe Zellen und keine Gefäße enthielt. Die Gefäße befanden sich in großer Anzahl im strukturierten bindegewebigen Teil des Regenerats (*Abb. 4.5-4, rechts; S. 95 4.5-10; S. 101 und 4.5-11; S. 102*). Der dem Defektbereich direkt anliegende Knochen enthielt in seinen Markräumen zahlreiche Gefäße (*Abb. 4.5-12; S. 102*). Die an den Defektbereich angrenzenden eröffneten Markräume waren massiv mit Zellen gefüllt. Diese wiesen das Erscheinungsbild undifferenzierter Mesenchymzellen auf (*Abb. 4.5-6, rechts; S. 96*). An den Knochenbälkchen entlang waren große kubische Osteoblasten aufgereiht (*Abb. 4.5-6, links; S. 96*). Die Höhe der Osteoblasten nahm mit der Entfernung zum Defektbereich ab. Einzelne Osteoklasten waren im Bereich unter dem Defektareal erkennbar. Im mittleren Bereich des Defektgrunds war eine in die Tiefe reichende mit dem Defekt verbundene Kaverne auszumachen. Osteoklasten wiesen dieses Areal als

Resorptionszone aus (*Abb. 4.5-7, links; S. 96*). Am seitlichen Defektrand war wenig kompakter Geflechtknochen zu finden. An der knochenzugewandten Seite der Knorpelinseln war eine Umwandlung des großblasigen Knorpels in Säulenknorpel zu beobachten, in deren Folge die knorpelige Grundsubstanz verschwand und durch Geflechtknochen ersetzt wurde. Hier fand eine enchondrale Ossifikation statt, wie sie in der Wachstumsfuge zu beobachten ist (*Abb. 4.5-7, rechts; S. 96 und 4.5-8; S. 97*). Desweiteren waren direkt an Knochenbälkchen anliegende Zellen zu finden, die in Form und Größe Chondroprogenitorzellen entsprachen. Diese wurden als Osteoprogenitorzellen angesprochen, wenn keine knorpeligen Strukturen zwischen ihnen und dem Knochenbälkchen lagen (*Abb. 4.5-5, rechts; S. 96*).

Gruppe II:

6 Wochen nach Setzen des Defekts befand sich kein ungeordnetes Gewebe mehr im Zentrum desselben. An seine Stelle war unterschiedlich strukturiertes Bindegewebe getreten. Alle Defekte waren zu diesem Zeitpunkt deutlich geschichtet. Auf der Gelenkseite war weiterhin parallel zur Oberfläche ausgerichtete Bindegewebe mit darinliegenden spindelförmigen Fibrozyten zu finden. Den gelenkseitigen Abschluß bildete auch hier eine Synovialmembran. Zum subchondralen Knochen hin war über den vollen Defektquerschnitt der Übergang zu sternförmigen Fibroblasten, die in Chondroprogenitorzellen übergingen, zu beobachten. Diese wandelten sich auch hier über Chondroblasten zu Chondrozyten. An der dem Knochen angrenzenden Seite dieser Knorpelinseln waren rege Abbauvorgänge zu vermerken. Diese Knorpelinseln wie auch der angrenzende Geflechtknochen waren deutlich voluminöser als bei den Präparaten der Gruppe I (4 Wochen). In der Mitte des Defektgrundes befand sich noch eine deutliche Resorptionszone, wohingegen der Geflechtknochen, der sich am seitlichen Defektgrund befand, an seiner knochenseitigen Fläche schon in Lamellenknochen umgebaut wurde. Neben den bereits beschriebenen Knorpelinseln, die in ihrem Aussehen an Wachstumsfugen-Knorpel erinnerten, waren 6 Wochen nach der Operation auch zum Teil großflächige Areale an Faserknorpel zu erkennen. Der Übergang zu diesem verlief nahezu ansatzlos aus den angrenzenden bindegewebigen Arealen. Insgesamt war der Defektbereich mehr knöchern und knorpelig und weniger bindegewebig aufgefüllt.

Gruppe III:

12 Wochen nach der Operation waren bei allen sechs Tieren die Defekte mit Faserknorpel aufgefüllt. Vereinzelt schloß ein schmales bindegewebiges Band den Defektbereich gelenkseitig ab. Dieses bestand aus parallel zur Gelenkoberfläche ausgerichteten Fasern mit

darin enthaltenen spindelförmigen Fibroblasten. Die Knorpel-Knochengrenze war annähernd vollständig wiederhergestellt oder es waren am seitlichen Defektgrund großflächige knöcherne Areale auszumachen, die gelenkseitig aus Geflecht- und knochenseitig aus Lamellenknochen bestanden.

Zusammenfassend läßt sich anhand dieser Ergebnisse festhalten:

- die ausgewählten Wachstumsfaktoren werden während der Heilung eines osteochondralen Defekts gebildet
- die Produktion eines Wachstumsfaktors ist abhängig vom Zelltyp und nicht vom Zeitpunkt nach der Operation
- jede noch nicht voll ausdifferenzierte Zelle, die „aktiv“ ist, d.h. Grundsubstanz produziert, produziert auch Wachstumsfaktoren
- unterschiedliche Zelltypen produzieren identische Wachstumsfaktoren
- es war keine „Wachstumsfaktorenkaskade“ feststellbar
- alle „aktiven“ Zelltypen produzierten alle Wachstumsfaktoren nebeneinander zu unterschiedlichen Zeitpunkten

4.5.2 Gefäßdarstellung

Der endothelspezifische Antikörper anti-FVIII zeigte neben zum Teil sehr schwachen Gefäßsignalen eine sehr starke Hintergrundfärbung. Da sich dieses Problem nicht beheben ließ, war eine Auszählung der Gefäße bei der Darstellung mit diesem Antikörper unmöglich.

Der für die Gefäßdarstellung verwendete Antikörper gegen *α -smooth muscle actin* ist nicht in der Lage, neugebildete Gefäße zu erfassen, die nur aus Endothelzellen, die ein Lumen formen, bestehen, stellte aber alle größeren Gefäße zuverlässig bei geringer Hintergrundfärbung dar.

Die Gefäße sprossen aus den Knochenmarksräumen der unter dem Defekt liegenden Knochenplatte in den Defekt ein. So waren bei einigen der Präparate der Gruppe I (4 Wochen) die neugebildeten Gefäße noch auf dem Boden des Defektes nahe der Knochenplatte zu finden. Es schien eine zentrifugale Ausbreitungstendenz von der Mitte des Defektbodens aus zu bestehen. Die Gefäße bestanden zunächst nur aus Endothelzellen, die ein kleines, teils noch ungefülltes Lumen bildeten. Im weiteren Verlauf wurde auch der seitlich von Knochen begrenzte Bereich des Defekts mit Gefäßen gefüllt. Hier waren die Gefäße ebenfalls zunächst dicht an der Grenze zum intakten Knochen zu finden. In diesem Stadium beschrieben die neu einsprossenden Gefäße die untere und seitliche Kontur des Defekts in seinem knöchernen Anteil. Von dieser Basis aus drangen die Gefäße in die Defektmitte vor.

An der Grenze zum Knochen, an der schon neuer Knorpel oder Knochen gebildet wurde, verschwanden die Gefäße. Bei den Präparaten der Gruppe II (6 Wochen) waren keine Gefäße mehr am Grunde des Defekts vorhanden. Die Gefäße lagen in der Defektmitte oder bereits im oberen Drittel. (Abb. 4.5-10). Auch die Gefäßzahl nahm mit Fortschreiten des Heilungsverlaufs ab. Es waren weniger Gefäße zu finden, jedoch wiesen sie ein größeres Kaliber und einen deutlich sichtbaren Mantel an Muskelzellen auf. Je weiter der Differenzierungsgrad der Mesenchymzellen und Fibroblasten voranschritt, in die die Gefäße eingebettet waren, desto geringer wurde die Gefäßzahl. Mit der Ausbildung einer tangentialen Schicht von spindelzelligen Fibroblasten an der Defektoberfläche ging eine arkadenförmige Orientierung der darunterliegenden Bereiche einher. Diese Arkaden benutzten die Gefäße als Leitlinien, um die darüberliegende gefäßarme Zone zu versorgen. Die Gefäße wurden also durch die Umwandlung von Fibroblasten in Knorpel- oder Knochenvorläuferzellen am Grunde und an der seitlichen Knochenkante nach oben aus dem Defekt „gedrängt“. Bei den Präparaten der Gruppe III (12 Wochen), bei denen schon der gesamte Defektbereich mit neugebildetem Knorpel gefüllt war, waren keine Gefäße mehr im Defektbereich vorhanden. Lediglich in den der Knochen-Knorpelgrenze angrenzenden Markräumen schienen noch vermehrt Gefäße vorhanden zu sein.

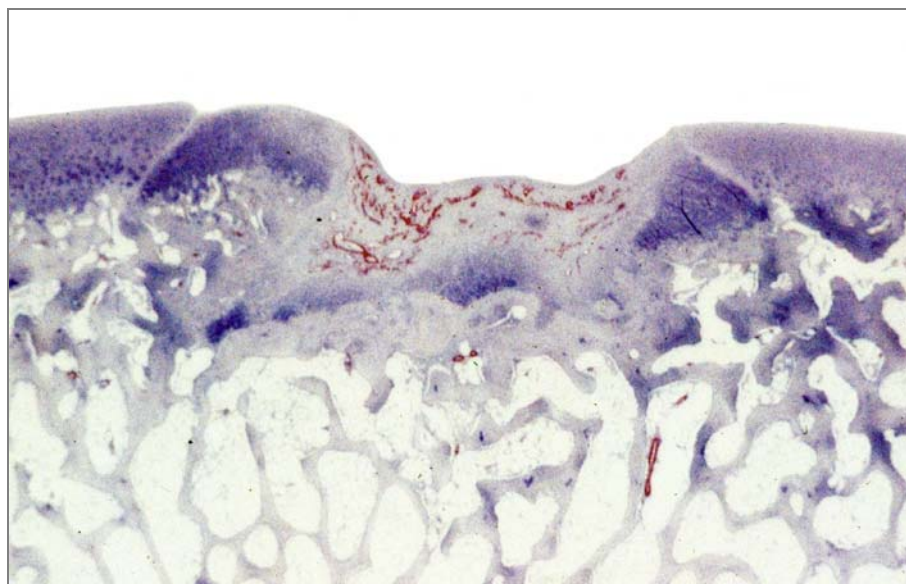


Abbildung 4.5-10: Gefäße im bindegewebigen Anteil des Regenerats in der Defektmitte. Keine Gefäße in den neugebildeten Knochen- und Knorpelarealen der Defektbasis bzw. den Defekträndern. (Placebotier Gruppe II (6 Wochen))

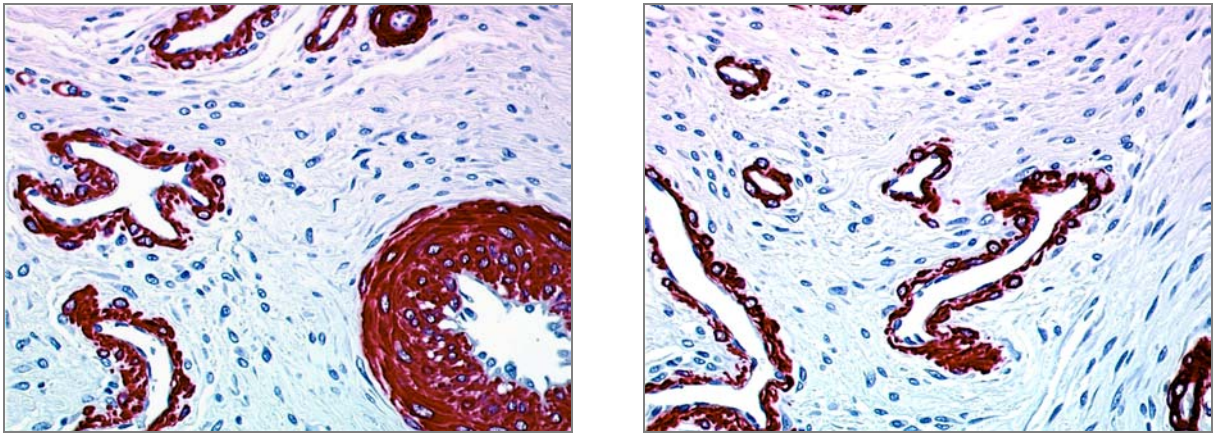


Abbildung 4.5-11: Gefäße im bindegewebigen Teil des Regenerats; Darstellung mit anti- α -smooth muscle actin und Neufuchsin, ca. 320-fache Vergrößerung

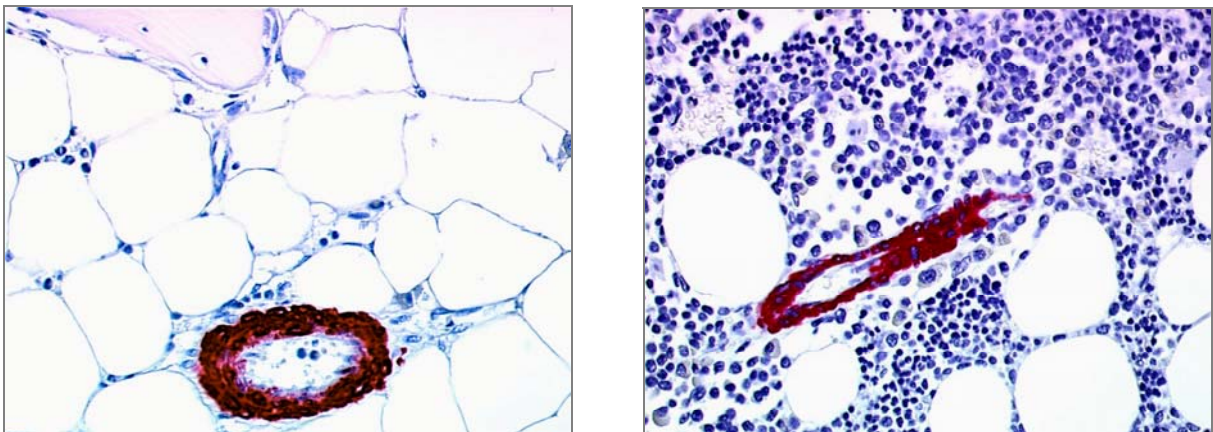


Abbildung 4.5-12: Gefäße in defektnahen Markraumbereichen; Darstellung mit anti- α -smooth muscle actin und Neufuchsin, ca. 320-fache Vergrößerung

Anzahl Gefäße		Gruppe I (4 Wochen)		Gruppe II (6 Wochen)		Gruppe III (12 Wochen)	
		Placebo	GH	Placebo	GH	Placebo	GH
		<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 11	<i>n</i> = 11	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3
absolut	Mittelwert	98.83	83.92	90.08	48.42	1.67	0.00
	Std.abw.	56.33	64.68	61.32	58.77	2.89	0.00
	Median	92.5	83	88	23.5	0	0
	1. / 3. Quartil	54 / 145	26 / 115.5	38 / 154.75	0 / 97.5	0 / 5	0 / 0
	Min / Max	18 / 203	5 / 238	0 / 175	0 / 172	0 / 5	0 / 0
pro [mm ²] Bindegewebe	Mittelwert	11.67	9.29	13.57	6.64	0.27	0.00
	Std.abw.	5.68	7.53	11.64	7.50	0.46	0.00
	Median	10.65	8.545	12.42	2.83	0	0
	1. / 3. Quartil	7.40 / 16.50	2.74 / 13.56	4.27 / 20.83	0 / 13.71	0 / 0.8	0 / 0
	Min / Max	3.5 / 21.73	0.44 / 26.98	0 / 39.41	0 / 20.95	0 / 0.8	0 / 0

Tabelle 4.5-1: Deskriptive statistische Auswertung der Gefäßzählung

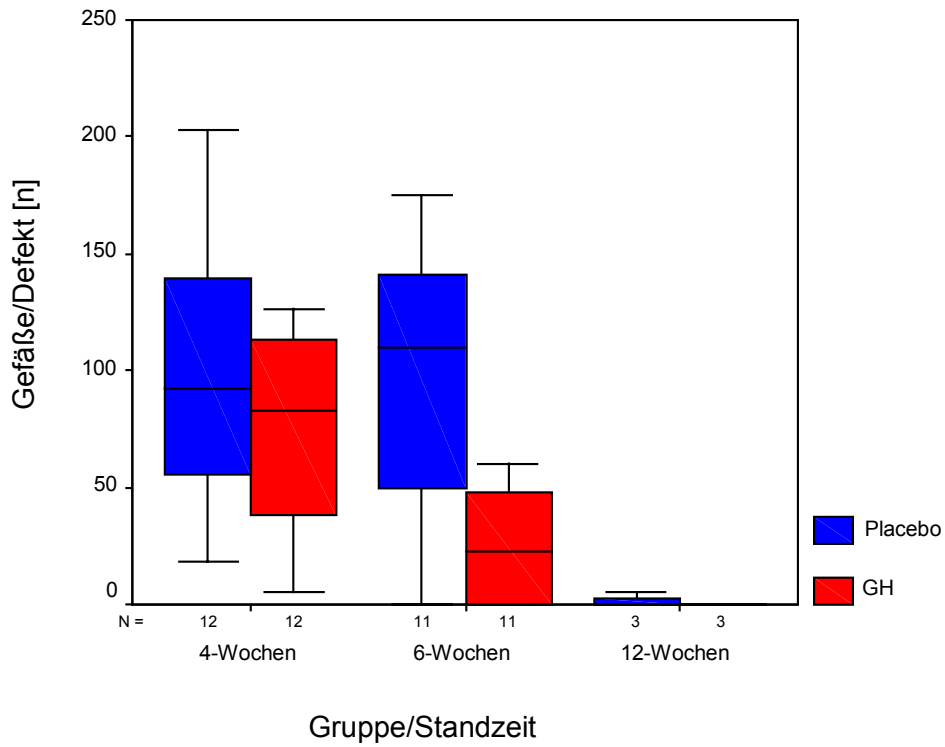


Abbildung 4.5-13: Anzahl der Gefäße pro Defekt, angeordnet nach der Behandlungsart

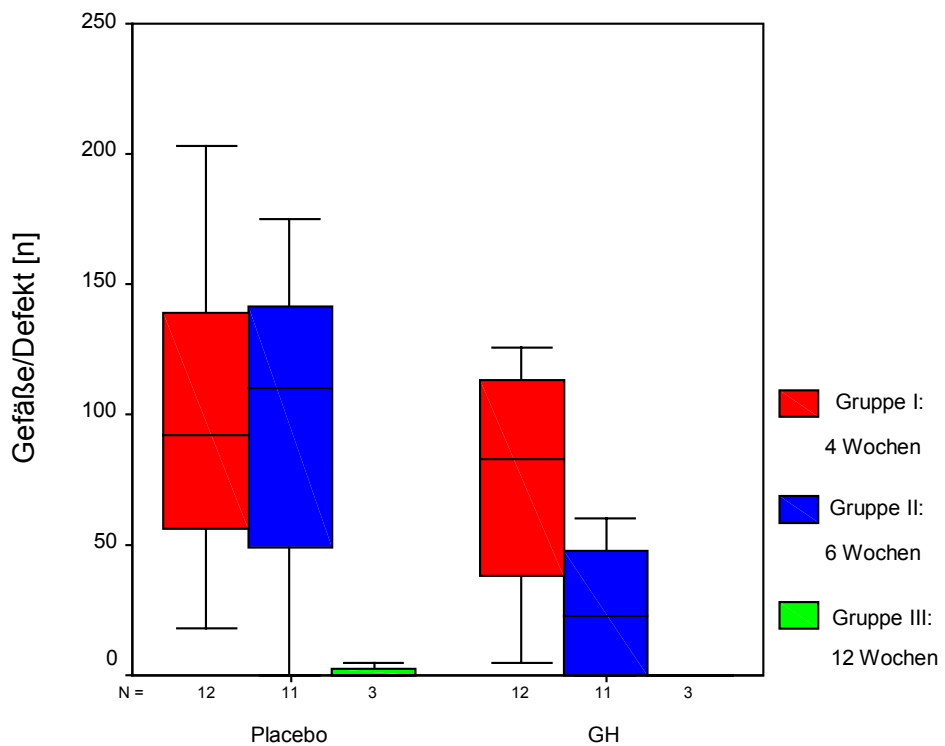


Abbildung 4.5-14: Anzahl der Gefäße pro Defekt, nach Zeiträumen geordnet,

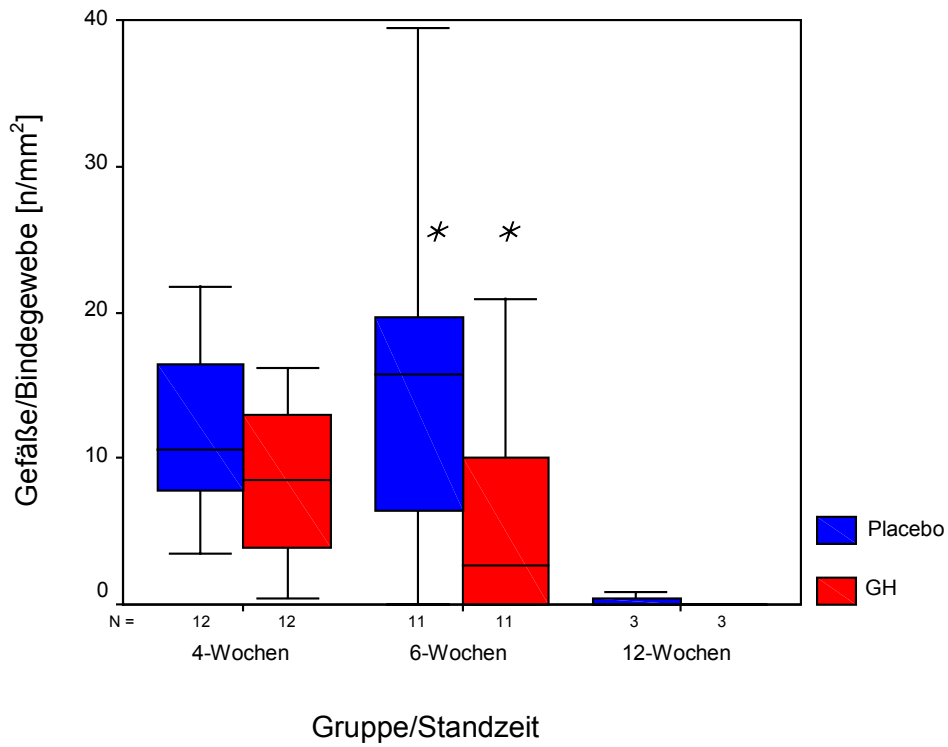


Abbildung 4.5-15: GefäÙe/[mm²] Bindegewebe, angeordnet nach der Behandlungsart
 $p^* = 0,034$

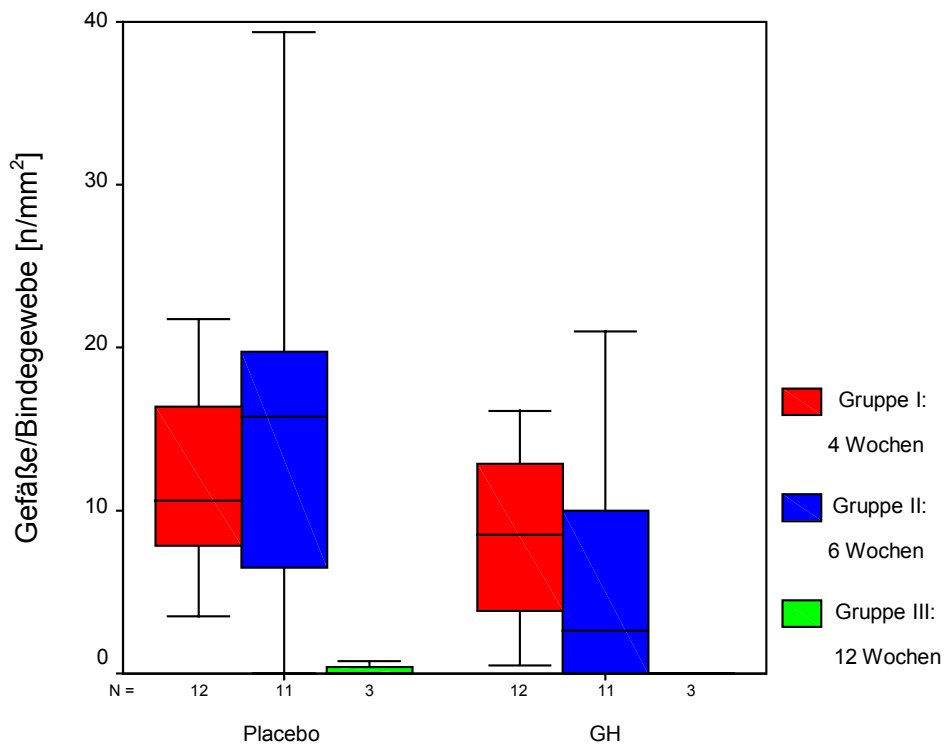


Abbildung 4.5-16: GefäÙe/[mm²] Bindegewebe, nach Zeiträumen geordnet,

Aufgrund der Tatsache, daß Gefäße lediglich im bindegewebigen Anteil des Regenerats zu finden waren, wurde die Anzahl der Gefäße pro Defekt in Bezug zur Bindegewebsfläche gesetzt. Sowohl die absolute Gefäßanzahl, als auch die Anzahl der Gefäße/mm² Bindegewebe war bei den mit Wachstumshormon und den mit Placebo versorgten Tieren der Gruppe I (4 Wochen) annähernd identisch. Die gesamte Gruppe I wiederum wies eine zu den mit Placebo behandelten Tiere der Gruppe II (6 Wochen) vergleichbare absolute Gefäßanzahl sowie Anzahl an Gefäßen/mm² Bindegewebe auf.

Die Defekte der mit Wachstumshormon behandelten Tiere der Gruppe II zeigten im Vergleich zu den Placebotieren dieser Gruppe eine deutlich reduzierte absolute Gefäßanzahl ($p=0,056$). Die Anzahl an Gefäßen/mm² Bindegewebe war bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren signifikant geringer ($p^* = 0,034$), (*Abb. 4.5-15; S. 104*).

Die mit Wachstumshormon behandelten Tiere hatten also 6 Wochen nach der Operation nicht nur weniger Gefäße pro Defekt aufzuweisen, sondern auch weniger Gefäße/mm² Bindegewebe, was eine drastische Verringerung der den Defektbereich versorgenden Gefäße darstellte. Demgegenüber bedeutete die vergleichbare absolute Gefäßanzahl und Anzahl an Gefäßen/mm² Bindegewebe der gesamten Gruppe I und der mit Placebo versorgten Gruppe auch eine vergleichbare Situation in der Gefäßversorgung des Defektbereichs. Die Defekte der Tiere der Gruppe III wiesen nach 12 Wochen kaum noch Gefäße und bindegewebigen Strukturen auf. Beide Parameter waren sowohl bei den mit Wachstumshormon behandelten als auch bei den Placebotieren im Vergleich zu denen der Gruppe I reduziert (*Abb. 4.5-14; S. 103 und 4.5-16; S. 104*). Die Placebotiere der Gruppe III ließen weniger Gefäße im Defektbereich erkennen als die Placebotiere der Gruppe II (*Tab. 4.5-1; S. 102*).

4.6 polychrome Sequenzmarkierung

Der Versuch, mit Hilfe der fluochromen Sequenzmarkierung die Ausdehnung zu ermitteln, die der Defekt zum Operationszeitpunkt hatte, mußte verworfen werden. Durch den massiven Knochenumbau waren die ersten beiden Marker (Tetrazyklin und Xylenol-Orange) nur noch in geringen Spuren nachweisbar. Ebenso ungeeignet war der Einsatz der Polarisationsmikroskopie. Hier konnte ebenfalls nur der neugebildete Geflechtknochen von Lamellenknochen unterschieden werden.