

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Tiere

Es wurden 24 weibliche Merinomix-Schafe im Alter von zweieinhalb Jahren mit einem durchschnittlichen Gewicht von 74 kg verwendet. Diese Zahl ist die Summe von sechs Tieren in zwei Versuchsgruppen zu je zwei Standzeiten. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere auf ihre Gesundheit und eventuelle Trächtigkeiten untersucht und gewogen.

#### 3.2. Unterbringung

Die Unterbringung der Tiere mit 24 Wochen Standzeit erfolgte in Gruppenhaltung in einem Stall mit Stroh- und Holzspäne-Einstreu, da sie im Rahmen einer anderen Studie wöchentlich einer Ganganalyse unterzogen wurden. In den Räumlichkeiten konnte durch Fenster der Tag-Nacht-Rhythmus von den Tieren wahrgenommen werden. Die Raumtemperatur und die Luftfeuchte entsprachen den geltenden Tierschutzbestimmungen. Das Gehege wurde alle drei Tage gesäubert. Die Schafe konnten sich frei bewegen. Wasser wurde ad libitum über Selbsttränken angeboten, und die Tiere wurden täglich mit Heu gefüttert. Die Unterbringung der Tiere mit einer Standzeit von drei Monaten erfolgte nach zweiwöchiger Beobachtungszeit im Stall in Freilandhaltung auf der Weide.

#### 3.3 Versuchsanordnung

Die Schafe wurden in Gruppen mit jeweils sechs Tieren eingeteilt. Für je zwölf Schafe wurde eine Standzeit von 12 bzw. 24 Wochen vorgesehen. Die Tiere wurden mit fortlaufenden Ohrmarken numeriert. Der Versuch fand mit Genehmigung der zuständigen Behörde<sup>4</sup> statt.

Es gab folgende Versuchsgruppen:

**Gruppe 1:** Zwölf Wochen Standzeit, Transfer von Knorpel-Knochen-Zylindern (Autologer, osteochondraler Transfer, OCT), n=6

**Gruppe 2:** Zwölf Wochen Standzeit, subchondrale Spongiosacluster mit Kollagenmembran und Fibrinkleber (SPC), n=6

**Gruppe 3:** 24 Wochen Standzeit, Transfer von Knorpel-Knochen-Zylindern (Autologer, osteochondraler Transfer, OCT), n=6

**Gruppe 4:** 24 Wochen Standzeit, subchondrale Spongiosacluster mit Kollagenmembran und Fibrinkleber (SPC), n=6

---

<sup>4</sup> Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) Berlin, Genehmigungsnummer 037/04

### 3.3.1 Operationsvorbereitung

Vor jeder Operation wurden die Tiere zwölf Stunden nüchtern gehalten. Wasser stand ihnen unbegrenzt zur Verfügung.

Zur Operationsvorbereitung wurde jedes Tier fixiert, um einen Venenverweilkatheter in die Vena cephalica antebrachii einzuführen, mit dem Blut für Heparinplasma, EDTA-Blut und Serum entnommen wurde. Die Narkose wurde mit Thiopental-Natrium<sup>5</sup> intravenös eingeleitet, und das Schaf wurde anschließend auf einer Trage in die Operationseinleitung gebracht.

In Brust-Bauch-Lage wurde mit einem Laryngoskop ein Tubus mit 9 mm Durchmesser mit Führungsstab in die Luftröhre des Schafes geschoben. Beatmet wurde dann mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch, dessen Isofluran-Anteil<sup>6</sup> 1,5 Vol% betrug. Das Verhältnis der Konzentration von Sauerstoff zu Lachgas lag bei 40 Vol% zu 60 Vol%. Das Beatmungsgerät<sup>7</sup> wurde entsprechend dem respiratorischen CO<sub>2</sub>-Wert auf 12-14 Atemzüge pro Minute eingestellt. Der CO<sub>2</sub>-Wert lag bei 39-40 mmHg, das Atemminutenvolumen bei ungefähr bei 8 l/min. Um eine Aufgasung zu verhindern, wurde eine Schlundsonde in den Pansen geschoben. In die Augen wurde eine Salbe<sup>8</sup> eingebracht, die ein Austrocknen der Kornea verhinderte. Anschließend wurde das Schaf in Rückenlage gebracht und die linke Hintergliedmaße rasiert, gereinigt und gewaschen. Alle vier Klauen wurden mit Mullbinden umwickelt. Die Elektroden des EKG-Gerätes wurden an beiden Vordergliedmaßen und an der rechten Hintergliedmaße angebracht. Das EKG diente der Kontrolle von Herzfrequenz und Herzrhythmus. Die Messung des respiratorischen CO<sub>2</sub>-Werts und die Sauerstoffsättigung erfolgten über eine Sonde am Ohr. Über den Venenverweilkatheter und einen Dreiwegehahn wurden im Operationssaal einmalig als Single-Shot-Infusion ein Antibiotikum<sup>9</sup> und langsam über die gesamte Zeit der Operation 500ml einer Vollelektrolytlösung<sup>10</sup> infundiert.

### 3.3.2. Operation

Jedes Tier wurde im Operationssaal mit sterilen Tüchern abgedeckt. Die linke Gliedmaße wurde komplett mit Polyvidonlösung<sup>11</sup> desinfiziert.

Der Zugang zum Kniegelenk erfolgte in maximaler Beugung medial etwa von Höhe der Patella bis zum Tibiaplateau. Die Schnittlänge von etwa sechs Zentimetern ermöglichte eine

---

<sup>5</sup> Trapanal®, ALTANA Pharma Deutschland GmbH, 78467 Konstanz, Deutschland

<sup>6</sup> Isofluran Curamed®, Rhodia Organic Fin Ltd., PO Box 46, BSYF, GB

<sup>7</sup> Sulla 800V, Capnolog, Ventillog, Isofluran Vapor 19.3, Drägerwerk AG, 23542 Lübeck, Deutschland

<sup>8</sup> Panthenol-Augensalbe, Jena pharm®, 07445 Jena, Deutschland

<sup>9</sup> Augmentan 2,2g, SmithKline Beecham, GlaxoWellcome, 80700 München, Deutschland

<sup>10</sup> Elektrolyt-Infusionslösung 153, Berlin Chemie AG, 12489 Berlin, Deutschland

<sup>11</sup> Braunol®, B.Braun, 34209 Melsungen, Deutschland

Luxation der Patella nach lateral. Mit einem Elektro-Kauter<sup>12</sup> wurde der im Kniegelenk vorhandene Fettkörper lateral gelöst und nach medial verlagert. Auf diese Weise war der mediale Kondylus sichtbar. Um den lateralen Kondylus darstellen zu können, musste die Sehne des Musculus extensor digitorum longus mit Wundhaken aus dem Operationsfeld gehalten werden. Auf diese Weise konnte das Gelenk dargestellt werden.

Bei beiden Operationstechniken wurde zunächst ein Leerdefekt randomisiert auf der lateralen oder medialen Femurkondyle in den lasttragenden Bereich des linken Knies gesetzt. Dies geschah unter reichlicher Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung unter Einsatz einer luftbetriebenen Bohrpistole und einer Hohlfräse<sup>13</sup>. Dadurch entstand ein Leerdefekt mit einem Durchmesser von 8,3 mm und einer Tiefe von 10 mm. Der entnommene Zylinder hatte einen Durchmesser von 7,45 mm. Dieser diente bei der Operation des osteochondralen Transfers als autologe Defektfüllung der Gegenseite. Auf der anderen Kondyle wurde ein Defekt gleicher Tiefe mit einem Durchmesser von 7,3 mm gesetzt. Je nach Versuchsgruppe wurde dieser Defekt entweder mit dem Knorpel-Knochen-Zylinder aus dem Leerdefekt oder mit autologen Spongiosaclustern versorgt. Entfernt wurden die Knorpel-Knochen-Zylinder mit einem Extraktor (Abb. 4, C), der nach dem Fräsen auf die Bohrtiefe vorgeschoben wurde. Durch eine vorsichtige Drehbewegung wurde der Zylinder gelöst und anschließend entnommen.



**Abbildung 4:** Operationsbesteck zum Erzeugen der osteochondralen Defekte

- A: Extraktoraufsatz zur Entnahme der Knorpel-Knochen-Zylinder
- B: Führungshülsen zur Extraktion
- C: Extraktoren zur Entnahme der Knorpel-Knochen-Zylinder
- D: Fräsenaufnahme und Bohranschluss Ø 7,45 mm
- E: Fräsenaufnahme und Bohranschluss Ø 6,4 mm

<sup>12</sup> Erbe Elektromedizin, 72072 Tübingen, Deutschland

<sup>13</sup> Zimmer GmbH, CH 8404 Winterthur, Schweiz

### 1. Autologer, osteochondraler Transfer:

Im lastentragenden Bereich des medialen bzw. lateralen Kondylus des linken Knies wurde ein Knorpelknochendefekt gesetzt. Der Knorpel-Knochen-Zylinder wurde mit einem sogenannten Extraktor (Abb. 4A) entfernt (Abb. 5A). Aus dem ipsilateralen Kondylus wurde ein Knorpel-Knochen-Zylinder von 7,45 mm Durchmesser entnommen und mittels einer Führungshülse (Abb. 4B) in den kleineren Defekt eingebracht (Abb. 5B). Da der größere Zylinder dabei in den kleineren Defekt gepresst wurde, wird von „press-fit“ Technik gesprochen. Der Knorpel-Knochen-Zylinder wurde so orientiert, dass nach dem Einsetzen die Knorpelkonvexität der beiden Gelenkflächen von dem Transplantat und dem umgebenden Knorpel übereinstimmte. Die Spenderseite wurde nicht aufgefüllt, sie diente als Kontrolldefekt.

### 2. Autologe Spongiosacluster:

Bei dieser Operationstechnik wurde wie oben beschrieben der kleinere Defekt gefräst. Auf der anderen Kondyle wurde ein Leerdefekt gesetzt. Von beiden entnommenen Knorpel-Knochen-Zylindern wurde der Knorpel entfernt und die verbleibenden Knochenzylinder mit einer Hohlmeißelzange nach Lüer zerkleinert. Mit dem gewonnenen, autologen und zerkleinerten Knochenmaterial wurde der kleine Defekt bis zur Knorpelgrenze aufgefüllt (Abb. 5C) und nachfolgend nach klinischer Vorgabe mittels eines Teflonstabes verdichtet. Der mit den Spongiosaclustern gefüllte Defekt wurde mit einer Kollagenmembran<sup>14</sup> abgedeckt, die mit Einzelheften<sup>15</sup> am Knorpel festgenäht wurde (Abb. 5D). Die Membran verhinderte das Austreten der Spongiosacluster in den Gelenkspalt. Danach wurde die Kollagenmembran mit Fibrinkleber<sup>16</sup> unterspritzt und die Knopfhefte damit abgedichtet.

Bei beiden Operationstechniken wurde das Gelenk nach Beendigung der Arbeiten am Knorpel mit ausreichend physiologischer Kochsalzlösung<sup>17</sup> gespült und anschließend die Gelenkkapsel mit Einzelheften<sup>18</sup> verschlossen. Darauf folgend wurde der Muskel<sup>19</sup> (Musculus extensor digitorum longus) adaptiert und die Unterhaut und Haut<sup>20</sup> verschlossen. Die Operationswunde wurde zum Schluss mit einem etwa 10 cm langen Pflaster<sup>21</sup> abgedeckt.

---

<sup>14</sup> Geistlich Biomaterials, 6110 Wulhausen, Schweiz

<sup>15</sup> PDS II® 6-0, Ethicon GmbH, 22851 Norderstedt, Deutschland

<sup>16</sup> Tissucol Duo S 0,5 ml Immuno, Baxter AG, 1221 Wien, Österreich

<sup>17</sup> Delta Select 0,9% Spüllösung, 72793 Pfullingen, Deutschland

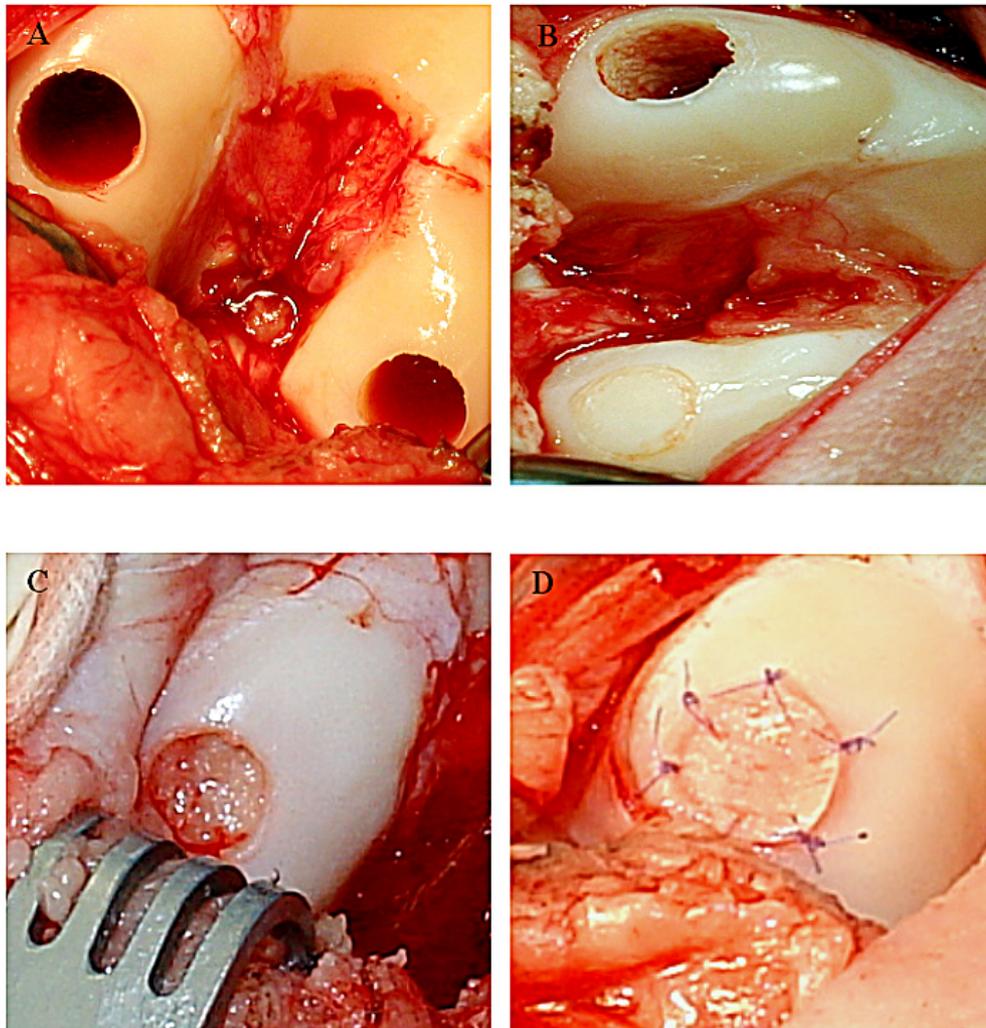
<sup>18</sup> Vicryl®, Ethicon GmbH, 22851 Norderstedt, Deutschland

<sup>19</sup> Vicryl®, Ethicon GmbH, 22851 Norderstedt, Deutschland

<sup>20</sup> Prolene®, Ethicon GmbH, 22851 Norderstedt, Deutschland

<sup>21</sup> Fixomull® Strech, BSN Medical GmbH & Co KG, 22771 Hamburg, Deutschland

Nach dem Eingriff wurde die operierte Gliedmaße in 2 Ebenen (lateromedial und kraniokaudal) geröntgt<sup>22</sup>, um den Sitz des Implantats zu kontrollieren.



**Abbildung 5:** A: Eröffnetes Kniegelenk mit den unterschiedlich großen Bohrkanälen auf je einer Kondyle; links: Leerdefekt, rechts: der zu füllende Defekt;  
 B: Autologer, osteochondraler Transfer nach Einsetzen des Zylinders (laterale Kondyle unten im Bild);  
 C: Knorpel-Knochendefekt nach Einsetzen der Spongiosacluster (laterale Kondyle);  
 D: Spongiosacluster mit aufgenähter Kollagenmembran und Fibrinkleber (laterale Kondyle).

<sup>22</sup> Mobilett Plus®, Siemens AG, 80333 München, Deutschland

### 3.3.3 Postoperative Versorgung

Jedes Tier bekam ein Fentanylpflaster<sup>23</sup> zur postoperativen Analgesie, welches auf eine unbehaarte Hautstelle aufgeklebt wurde. Das Pflaster gab transdermal kontinuierlich 75µg Fentanyl pro Stunde ab und wurde nach drei Tagen entfernt.

Die Schafe wurden sofort nach der Operation in ihre gewohnte Umgebung gebracht. Die Tiere mit einer Standzeit von 12 Wochen wurden nach der Entfernung der Fäden am zehnten Tag nach der Operation in die Freilandhaltung gebracht.

Postoperativ wurden die Schafe täglich auf ungestörtes Allgemeinbefinden überprüft. Die Tiere mit 24 Wochen Standzeit wurden wöchentlich, die Schafe mit 12 Wochen Standzeit in Freilandhaltung wurden im Abstand von vier Wochen gewogen, um den Gesundheitszustand zu kontrollieren.

### 3.3.5 Euthanasie

Mit Ende der Standzeit von drei bzw. sechs Monaten wurden die Tiere eingeschläfert. Jedes Schaf erhielt einen Venenzugang in die Vena cephalica antebrachii. Es wurden 2,5 g Thiopental-Natrium und in der daraus folgenden tiefen Narkose 100ml einer Kaliumchloridlösung<sup>24</sup> appliziert. Der Tod wurde durch Auskultation des Herzens sichergestellt.

## 3.4 Gewinnung und Aufbereitung der Präparate

### 3.4.1 Sägen

Nach der Tötung des Tieres erfolgte die Entnahme beider Femurknochen. Die Knochen wurden von Muskelgewebe befreit und die Defekte fotografisch dokumentiert.

Als Säge wurde ein Trennschleifsystem<sup>25</sup> mit einem 1mm dicken Sägeblatt verwendet. Zuerst wurde der Femurschaft mit einer Handsäge manuell durchtrennt. Danach wurde der Knochen so in eine Zwinge eingespannt, dass lateral und medial der beiden Defekte entlang der Bohrrichtung und die Defekte genau in der Mitte durchgesägt werden konnten. Dann wurde der Knochen um 90° gedreht, um im rechten Winkel zu diesen Schnitten durch den Knochen sägen zu können. Auf diese Weise entstanden 4mm starke Scheiben mit dem halbierten Leerdefekt bzw. dem halbierten aufgefüllten Defekt (Abb. 6).

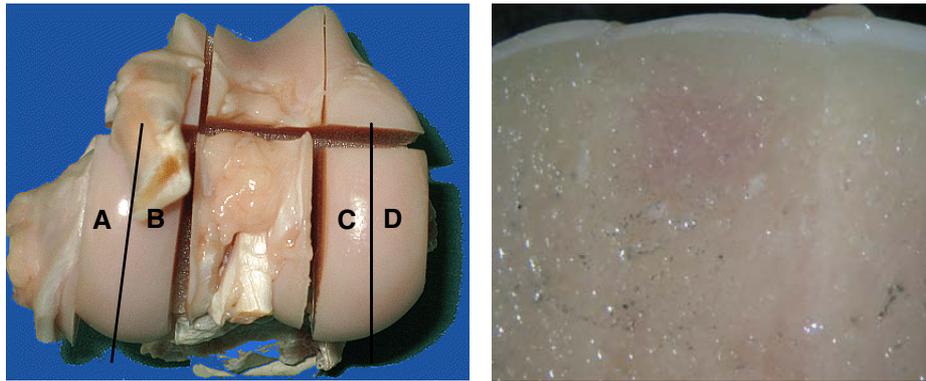
Die geschnittenen Blöcke wurden in Uni-Kassetten<sup>26</sup> eingelegt und beschriftet.

<sup>23</sup> Durogesic 75µg/h, JANSSEN-CILAG GmbH, 41457 Neuss, Deutschland

<sup>24</sup> 1M Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61346 Bad Homburg, Deutschland

<sup>25</sup> Makro-Trennschleifensystem, Exakt Apparatebau GmbH & CO.KG, 22851 Norderstedt, Deutschland

<sup>26</sup> Tissue III Tec<sup>®</sup>, Sacura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, Niederlande



**Abbildung 6:** Linkes Bild: Ein entnommenes, in Scheiben geschnittenes, gesundes Kniegelenk nach dem Sägen; links: lateraler Kondylus; Rechts: medialer Kondylus jeweils in ca. 4mm dicke Scheiben geschnitten; Rechtes Bild: Eine nach dem Sägen entstandene, ca. 4mm dicke Scheibe mit dem noch zu erkennenden Defektbereich

- A: Laterale Scheibe des lateralen Kondylus
- B: Mediale Scheibe des lateralen Kondylus
- C: Laterale Scheibe des medialen Kondylus
- D: Mediale Scheibe des medialen Kondylus

### 3.4.2 Fixation

Nach dem Sägen wurden die Präparate für fünf Tage in eine Fixierlösung<sup>27</sup> eingelegt. Dieses verhinderte die Autolyse und beugte Schimmel- und Fäulnisbakterien vor. Zudem bewirkte die Fixierung eine Strukturverfestigung, die das Gewebe vor mechanischen Einflüssen bei der Bearbeitung schützen soll (Boehnisch T, 2003). Um sicherzustellen, dass die Fixierlösung gleichmäßig in die Präparatblöcke eindrang, wurden die Gläser auf einen Schüttler<sup>28</sup> gestellt.

### 3.4.3 Behandlung der Präparate für die Immunhistochemie

Nach fünf Tagen wurden die Präparate aus der Fixierlösung genommen und 30 Minuten unter Leitungswasser gespült, um die Fixierlösung zu entfernen. Anschließend wurden sie für zwei Monate in EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-Lösung<sup>29</sup> bei halbwochentlichem Lösungswechsel im Brutschrank bei 37°C entkalkt.

Nach diesen zwei Monaten wurden die Knochenblöcke wieder 30 Minuten unter Leitungswasser gespült und mit Hilfe eines Entwässerungsautomaten<sup>30</sup> in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Damit den Präparaten der Alkohol wieder entzogen werden konnte, wurden sie aus dem Alkohol 2,5 Stunden in Xylol überführt. Nach dieser Behandlung wurden die Knochenblöcke in 60°C heißes, flüssiges Paraffin<sup>31</sup> eingebettet.

<sup>27</sup> Formaldehyd 36%, Äthylalkohol 100%, Barbitol- Natrium-Puffer pH 7,4/ 0,1 molar und Glukose

<sup>28</sup> IKA Labortechnik HS 501 digital; IKA Werke GmbH & Co.Kg, 79219 Staufen, Deutschland

<sup>29</sup> EDTA-Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, 12099 Berlin, Deutschland

<sup>30</sup> Leica TP 1020, Leica Instruments GmbH, 61226 Nußloch, Deutschland

<sup>31</sup> Paraplast Plus® Tissue Embedding Medium, Sherwood Medical CO., St.Louis, MO, USA

### 3.4.4 Schneiden der Präparate

An einem Weichschnitt-Mikrotom<sup>32</sup> wurden die Präparatblöcke in 4µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger<sup>33</sup> aufgezogen. Dann wurden die Objektträger für drei Tage im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

### 3.4.5 Färben der Präparate

Das Anfärben der Präparate erfolgte durch die ABC-alkalische Phosphatase-Technik unter Verwendung eines ABC-Elite-Kits von Vector<sup>34</sup>. In diesem Kit ist equines Normalserum (Blockierungsserum vom Pferd), ein biotinylierter Sekundärantikörper, sowie ein ABC-Komplex (hochgereinigtes Avidin und biotinylierte Meerrettichperoxidase) in Tropfflaschen enthalten, die folgendermaßen angesetzt wurden:

- 2 Tropfen Normalserum auf 5ml Puffer
- 1 Tropfen Normalserum und 1 Tropfen Sekundärantikörper auf 5 ml Puffer
- 2 Tropfen Reagenz A ((Strept)Avidin) und 2 Tropfen Reagenz B (biotinmarkiertes Enzym) auf 5 ml Puffer, um den ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Complex) zu erhalten

Wenn nachfolgend von Normalserum, Sekundärantikörper und ABC-Komplex gesprochen wird, handelt es sich um die Ansätze in dieser Form.

Übersicht der verwendeten Antikörper:

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
Anti-Kollagen I, Rind <sup>35</sup>	Kaninchen, polyklonal	1:400
Anti-Kollagen II, Rind <sup>36</sup>	Kaninchen, polyklonal	1:100
Anti-α-smooth-muscle-actin <sup>37</sup>	Maus, monoklonal	1:100

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise gilt für alle Antikörper. Alle Schnitte für einen Antikörper wurden mit einem Reagentienansatz behandelt, um gleiche Bedingungen und damit die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

#### Alkalische Phosphatase

Der Puffer, der zum Spülen verwendet wurde, wurde im Verhältnis 1:9 aus Phosphatpufferkonzentrat<sup>38</sup> und Aqua dest. angesetzt. Dieser Puffer hat einen pH-Wert von

<sup>32</sup> Leica RM 2035, Leica Instruments GmbH, 61226 Nußloch, Deutschland

<sup>33</sup> Superior Marienfeld, 97922 Lauda-Königshofen, Deutschland

<sup>34</sup> Vectastain Elite ABC Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH; 97877 Wertheim, Deutschland

<sup>35</sup> Biologo, Dr. Hartmut Schultheiss e.K., 24119 Kronshagen, Deutschland

<sup>36</sup> Biologo, Dr. Hartmut Schultheiss e.K., 24119 Kronshagen, Deutschland

<sup>37</sup> Dako Cytomation Denmark A/S, 2600 Glostrup, Denmark

7,2 und soll eine elektrostatische Aufladung der Proteine während der immunhistochemischen Reaktion verhindern. Als erstes wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und danach zwei mal fünf Minuten mit Phosphatpuffer gespült. Bevor die Präparate mit Normalserum beschichtet werden konnten, musste für die Kollagen I und Kollagen II-Antikörper eine Vorbehandlung erfolgen, da durch die Fixierung der Präparate mit Formalin Quervernetzungen entstanden sind, die die Gewebsantigene maskieren und deren Nachweis durch den Primärantikörper verhindern. Für beide Färbungen mussten die Präparate vier Stunden bei 37°C mit Hyaluronidase<sup>39</sup> inkubieren. Nachdem die Schnitte zwei Mal in Phosphatpuffer gespült wurden, wurden die Präparate für die Kollagen II-Färbung wiederholt 30 Minuten mit Pepsin<sup>40</sup> bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült, um die Enzyme zu entfernen. Anschließend war die Vorgehensweise für alle Schnitte gleich.

Die Schnitte wurden waagrecht in eine feuchte Kammer gelegt, mit Normalserum beschichtet und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Normalserum soll die unspezifischen Bindungen an Gewebsproteinen blockieren und stammt immer aus derselben Tierspezies wie der Sekundärantikörper. Nach dem Abklopfen des Normalserums wurde der Primärantikörper in der oben beschriebenen Verdünnung auf die Präparate aufpipettiert. Die Kammer mit den Präparaten wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten in Phosphatpuffer gespült und anschließend mit dem Sekundärantikörper beschichtet. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert und kann dadurch von dem Avidin des ABC-Komplexes gebunden werden. Die Präparate wurden eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und dann erneut zweimal fünf Minuten in Phosphatpuffer gespült. Die Präparate wurden zurück in die Kammer gelegt, mit dem ABC-Komplex für 50 Minuten beschichtet und wieder in Puffer gespült. Darauf folgend wurden die Präparate zweimal drei Minuten mit Chromogenpuffer<sup>41</sup> bedeckt, dessen pH-Wert 8,2 betrug. Das Chromogen<sup>42</sup> wurde entsprechend der Anleitung vorbereitet. Jeder Schnitt wurde mit dem Chromogen beschichtet, wobei die Entwicklungszeit von dem jeweiligen Antikörper abhing. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült und mit Mayers Hämalaun<sup>43</sup> gegengefärbt. Nachdem die Schnitte mit Leitungswasser gespült waren, erfolgte das Eindecken mit Gelatine<sup>44</sup>.

---

<sup>38</sup> 3L 175 Phosphatpufferkonzentrat, Chroma-Gesellschaft, 73257 Köngen/N., Deutschland

<sup>39</sup> Hyaluronidase, 8 mg/50ml PBS, pH6,7, Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland

<sup>40</sup> Pepsin 1:60,000, Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland

<sup>41</sup> Chromogenpuffer (3,96g Sigma HCLT 3253,0,54g Sigma T 1503, 2,63 Merck 6404 NaCl, aufgefüllt mit dest. Wasser auf 300 ml)

<sup>42</sup> Alkaline Phosphatase Kit 1, SK-5100, Vektor Laboratories, Inc. Burlingame, CA94010, USA

<sup>43</sup> 1.09249.0500, Merck KgaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

### Osteoklastenfärbung

Es wurde zusätzlich zu den Färbungen mit Antikörpern zur Darstellung der Osteoklasten eine TRAP-Färbung (Tartrat-resistente acid Phosphatase) durchgeführt. Diese Tartrat-resistente saure Phosphatase katalysiert die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäure-Ester unter sauren Bedingungen und kann auch bis zu einem Wert von pH 8 aktiv sein. Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zehn Minuten mit dem TRAP-Puffer behandelt (3,28 g Natriumacetat<sup>45</sup>, 46,01 g Natriumtartrat-Dihydrat<sup>46</sup> auf 1 L a.d. / pH 5,0). Dann wurden die Schnitte mindestens zwei Stunden mit der Trap-Färbelösung (40 mg Naphtol AS-Mix Phosphat<sup>47</sup>, 4000 µl N-N-Dimethylformamid<sup>48</sup>, 240 mg Fast Red Violett LB Salt<sup>49</sup>, 2 ml Triton X<sup>50</sup>, 200ml Trap-Puffer) bei 37°C inkubiert. Als Substrat für den Nachweis wurde das Naphtol AS-Mix Phosphat verwendet, welches durch TRAP enzymatisch hydrolysiert wurde. Das freigesetzte Naphtol AS-Mix Phosphat reagierte in einer Kupplungsreaktion mit dem Fast Red Violett LB Salt. Dadurch entstand ein wasserunlöslicher Azofarbstoff, der die Zellen rot anfärbte, die dieses Enzym besitzen. Nach zwei Stunden wurde kontrolliert, ob sich die Zellen positiv darstellten. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt, die Schnitte mit Methylgrün<sup>51</sup> gegengefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckt.

### Safranin-Orange

Zur Darstellung der Proteoglykankonzentration im Knorpelbereich wurde eine Safranin-Orange Färbung angefertigt. Die Präparate wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in destilliertes Wasser überführt. Die Schnitte wurden acht Minuten in die Färbelösung<sup>52</sup> gestellt und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol gebracht. Eingedeckt wurden die Präparate mit Vitroclud<sup>53</sup>. Bei dieser Färbung ist der Azin-Farbstoff positiv geladen und der Knorpel wird intensiv rot angefärbt, während der Knochen sich nur blass rot darstellt.

---

<sup>44</sup> Kaisers Glyceringelatine, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

<sup>45</sup> Natriumacetat, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

<sup>46</sup> Natriumtartrat-Dihydrat, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

<sup>47</sup> Naphtol AS-Mix Phosphat, Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland

<sup>48</sup> N-N-Dimethylformamid, Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland

<sup>49</sup> Fast Red Violett LB Salt, Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland

<sup>50</sup> Triton X, Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland

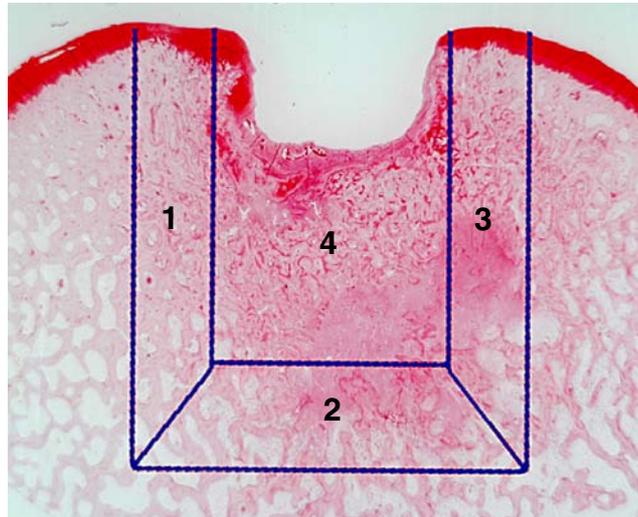
<sup>51</sup> Methylgrün, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

<sup>52</sup> Safranin O, Merck. KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

<sup>53</sup> Vitroclud, R. Langenbrink, 79312 Emmendingen, Deutschland

### 3.5 Auswertung

Für die Auswertung der TRAP-Färbung und der Immunhistochemie wurden zwei *Regions of Interest* (ROI) mit jeweils 4 Bereichen festgelegt (Abb. 7), die einmal der Größe des behandelten Defektes (7,3x10 mm) und einmal der Größe des Leerdefektes (8,3x10 mm) plus fünf Millimeter in jede Richtung entsprach. Durch Festlegung dieser ROI sollen die Vorgänge im Defektbereich und im umliegenden Gewebe erfasst werden.



**Abbildung 7: Region of Interest**

- ROI 1: kranial des Defektbereiches
- ROI 2: basal des Defektbereiches
- ROI 3: caudal des Defektbereiches
- ROI 4: Defektbereich

#### 3.5.1 Statistische Auswertung

Alle im Folgenden erhobenen Ergebnisse wurden zunächst mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Exel<sup>54</sup> dokumentiert und anschließend mit dem Statistikprogramm SPSS<sup>55</sup> ausgewertet. Die statistische Auswertung der Gruppen untereinander erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Daten, die der drei Kondylen untereinander durch den Friedmann-Test und der Vergleich von dem gefüllten Defekt und dem Leerdefekt durch den Wilcoxon-Test, da zwei abhängige Parameter miteinander verglichen wurden.

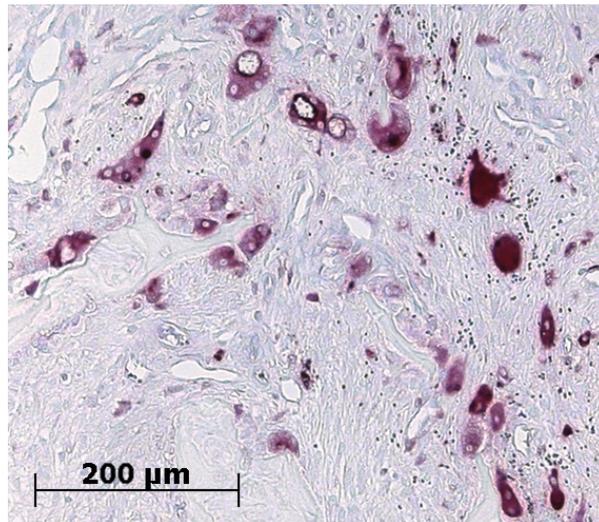
#### 3.5.2 Auswertung der Histologie

Mikroskopische Darstellung der Osteoklasten

<sup>54</sup> Microsoft Exel 2000, Microsoft Corporation, USA

<sup>55</sup> SPSS12,0, SPSS Inc., Chicago, IL 60606 USA

Um die Anzahl der Osteoklasten darstellen zu können, wurden speziell angefertigte Plastikplättchen mit der eingefrästen ROI angefertigt, die auf den Schnitt aufgelegt wurden. Auf diesen Plättchen ist die oben erwähnte *Region of Interest* eingefräst, die die Größe des behandelten Defektes bzw. die Größe des Leerdefektes zuzüglich fünf Millimeter in jede Richtung besitzt. Dieses Plättchen wurde an die obere Knorpelgrenze angelegt (Abb. 7) und die Osteoklasten in den einzelnen Regionen wurden ausgezählt. Es wurden nur die Osteoklasten ausgezählt, die direkt am Knochengewebe lagen, da nur diese aktiv an der Knochenresorption beteiligt sind. Positiv gefärbte Zellen in anderen Geweben blieben unbeachtet.



**Abbildung 8:** TRAP-positive Osteoklasten (rot) im subchondralen Knochen

### 3.5.3 Auswertung der Immunhistochemie

#### Mikroskopische Darstellung der Gefäße

Um die Darstellung der Gefäße erfassen zu können, wurden die oben erwähnten Plättchen benutzt. Diese Plättchen wurden an die obere Knorpelgrenze angelegt und die Anzahl der kleinen und großen Gefäße in den einzelnen Regionen ausgezählt. Die Gefäße in dem angrenzenden, gesunden Knochen außerhalb der ROIs blieben unberücksichtigt.



**Abbildung 9:** Positiv rot angefärbte Gefäßanschnitte im Bindegewebe im Defektbereich, Färbung  $\alpha$ SMA

### Bildanalyse

Die Präparate wurden mit einer Spiegelreflex-Digital-Kamera<sup>56</sup> fotografiert und gespeichert. Die Auswertung in der Bildanalyse erfolgte mit einem Computer mit spezieller Bildanalysesoftware<sup>57</sup>. Die Auswertung erfolgte mit jeweils einem Makro für die aufgefüllten Defekte und den nativen Knorpel und einem Makro für die Leerdefekte. Die Makros wurden speziell für diese Präparate entwickelt, um die einzelnen Flächen berechnen zu können.

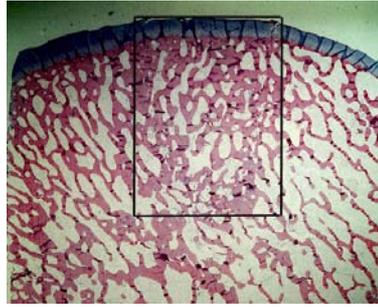
Es wurden jeweils zwei Präparate von einem Defekt verwendet, die entsprechend mit Kollagen I und mit Kollagen II gefärbt waren.

Die Messung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Festlegung der *Region of Interest* am Präparat. Ein Rechteck mit den Kantenlängen 8,3mm x 10mm für die Leerdefekte und 7,3mm x 10mm für die aufgefüllten Defekte und den nativen Knorpel, wurde auf den Defektbereich gelegt. Die oberen Kanten wurden an die Knorpeloberfläche angelegt. Die Größe dieser ROI entspricht dem operativ gesetzten Defekt (Abb. 10).

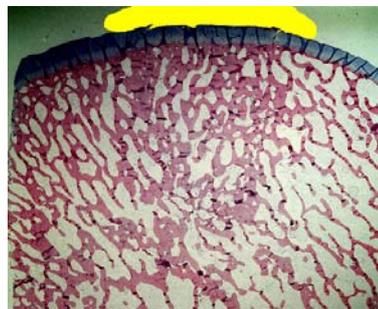
<sup>56</sup> Nikon D70 digitalcamera, Nikon Corporation, Tokyo 100-8331, Japan

<sup>57</sup> Zeiss KS 400, Karl Zeiss AG, 73447 Oberkochen, Deutschland



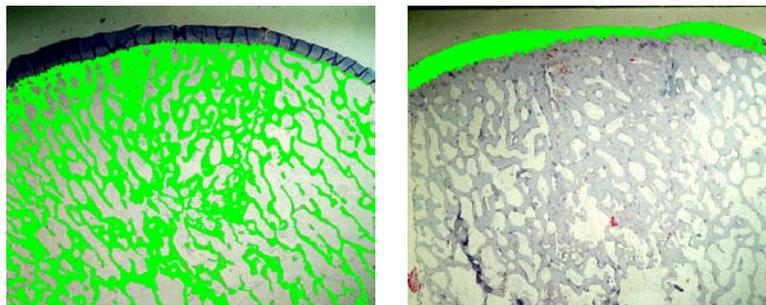
**Abbildung 10:** Aufgelegte ROI auf dem Defektbereich

- Der nichtgefüllte Defektanteil innerhalb der *Region of Interest* wurde manuell markiert, und so aus allen folgenden Berechnungen entfernt, damit diese nur an dem tatsächlich aufgefüllten Gewebe vorgenommen werden konnten (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Leerfläche über dem Defektbereich gelb markiert

- Für die positiv gefärbten Anteile in den Präparaten wurde eine Kollagenmaske für Kollagen I und Kollagen II erstellt, um die Fläche berechnen zu können (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Kollagenmaske; *links:* Kollagen I; *rechts:* Kollagen II

- Berechnung der Flächen von Kollagen I und Kollagen II

Bestimmung der Parameter:

- Gesamtfläche des Defektes [ $\text{mm}^2$ ]
- Anteil der positiv gefärbten Fläche von Kollagen I [ $\text{mm}^2$ ]
- Anteil der positiv gefärbten Fläche von Kollagen II [ $\text{mm}^2$ ]
- Anteil des nichtgefüllten Defektes [ $\text{mm}^2$ ]

Um die einzelnen Flächen aufgrund der unterschiedlichen Größen der Defekte miteinander vergleichen zu können, wurden die absoluten Gewebeflächen auf die Gesamtdefektfläche bezogen und in Prozent ausgedrückt.

#### Scoren der Defekte

Die Auswertung erfolgte durch eine modifizierte, semiquantitative Auswertung (Score). Score A ergab als Gesamtpunktzahl 27 Punkte, während bei Score B 12 Punkte erreicht werden konnten.

Anhand dieser Scores wurden die mit Safranin-Orange gefärbten Präparate und die Kollagen II gefärbten Präparate der Immunhistochemie bewertet.

**Score A****Kategorie****Punkte**

<i>1. Prozentualer Anteil hyalinen Knorpels</i>	80% - 100%	8
	60% - 80%	6
	40% - 60%	4
	20% - 40%	2
<i>2. Struktur</i>		
<i>A. Oberflächenbeschaffenheit:</i>	Glatt und intakt	2
	Fissuren	1
	Risse, Fibrillation	0
<i>B. Strukturelle Integrität:</i>	Normal	2
	Leichte Risse, Zysten	1
	kaum integriert	0
<i>C: Knorpeldicke:</i>	100% des umliegenden Knorpels	2
	50% - 100% des normalen Knorpels oder dicker als normal	1
	0 - 50% normalen Knorpels	0
<i>D: Verbindung zum umliegenden Knorpel</i>	verbunden auf beiden Seiten	2
	verbunden auf einer Seite, teilweise auf beiden Seiten	1
	Unverbunden	0
<i>3. Degenerative zelluläre Veränderungen</i>	Normale Zellularität, keine Cluster	2
	Leichte Hypozellularität, <25% Chondrozytencluster	1
	moderate Hypozellularität, Hyperzellularität, >25% Cluster	0
<i>4. Degenerative Veränderungen im umliegenden Knorpel</i>	Normale Zellularität, keine Cluster, normale Anfärbung	3
	Normale Zellularität, wenig Cluster, moderate Anfärbung	2
	milde oder moderate Hypozellularität, leichte Anfärbung	1
	schwere Hypozellularität, viel Cluster, kaum Anfärbung	0
<i>5. Rekonstruktion des subchondralen Knochens</i>	vollständige Rekonstruktion	2
	mehr als 50% Rekonstruktion	1
	50% oder weniger Rekonstruktion	0
<i>6. Verbindung zwischen regenerierten Knorpel und neuem subchondralen Knochen</i>	vollständig und ununterbrochen	2
	<100% aber mehr als >50%	1
	<50%	0
<i>7. Safranin-O-Färbung</i>	mehr als 80% homogene positive Färbung	2
	40% - 80% homogene positive Färbung	1
	weniger als 40% homogene positive Färbung	0
	<b>Σ 27</b>	

**Score B**

<i>8. Auffüllung im Defektbereich</i>	91% - 110%	4
	76% - 90%	3
	51% - 75%	2
	26% - 50%	1
	<25%	0
<i>9. Laterale knöcherner Integration</i>	verbunden auf beiden Seiten	2
	verbunden auf einer Seite, teilweise auf beiden Seiten	1
	Unverbunden	0
<i>10. Basale Integration</i>	91% - 100%	3
	70% - 90%	2
	50% - 70%	1
	<50%	0
<i>11. Entzündungsreaktion</i>	Keine	2
	Gering	1
	Stark	0
<i>12. Fremdkörperreaktion</i>	Nein	1
	Ja	0
		<b>Σ 12</b>