

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Bei den Versuchen wurden osteochondrale Implantate verwendet, die aus einer Knochen- und einer Knorpelphase bestanden, welche aus unterschiedlichen Bestandteilen hergestellt wurden. Die einzelnen Komponenten werden im Folgenden beschrieben.

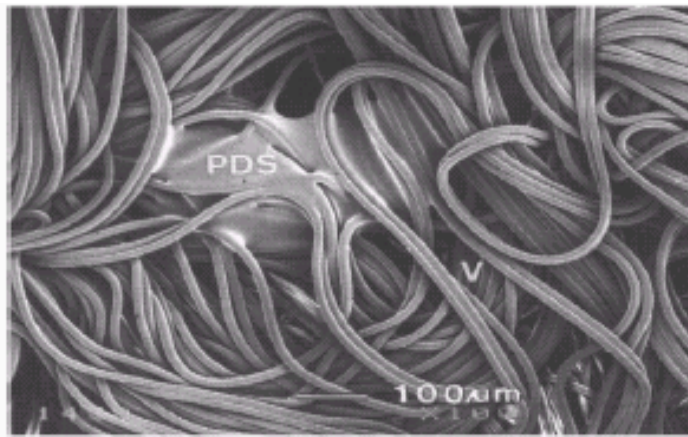
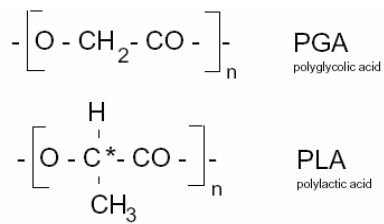
#### 2.1.1 Die Zementphase

Für die Herstellung der Knochenphase wurde Calciumphosphatzement verwendet. Unter den vielen Zementen unterschiedlicher Hersteller stellte sich nach einer Reihe von Vorversuchen Norian SRS als der am besten für unsere Versuche geeignete Calciumphosphatzement heraus. Es handelt sich hierbei um eine Mischung aus Monocalciumphosphatmonohydrat (MCPM),  $\alpha$ -Tricalciumphosphat ( $\alpha$ -TCP) und Calciumcarbonat, welche unter Titration mit wasserfreier Phosphorsäure und Natriumphosphatlösung eine Paste bilden. Diese Knochenzementpaste hat eine Verarbeitungszeit von ca. 5 min und härtet unter physiologischen Temperaturen und pH aus. Die initiale Kompressionsfestigkeit wird mit 10 MPa beschrieben, nach einer Kristallisationszeit von 12h ist die Umwandlung zu Hydroxyapatit zu 90 % vollzogen. Dadurch steigt die Kompressionsfestigkeit auf ca. 55 MPa und die Biegefestigkeit auf 2,1 MPa. In Tierversuchen<sup>25</sup> wurde gezeigt, dass dieses Knochenersatzmittel keine Entzündungs- oder Fremdkörperreaktionen hervorruft, und zum Teil in Knochen umgebaut werden kann. Auch der Einsatz beim Menschen wurde untersucht. Es liegen günstige Ergebnisse bei der Auffüllung spongiöser Defekte des distalen Radius<sup>99</sup>, des Tibiakopfes, der Trochanterregion<sup>32</sup> des Kalkaneus und des Wirbelkörpers vor.

#### 2.1.2 Die Knorpelphase

Die Knorpelphase der Implantate setzt sich aus der Knorpelzellsuspension und dem Polymervlies als Trägerstruktur zusammen. Auf die Knorpelsuspension und die Einbringung in das Polymervlies wird später noch genauer eingegangen. Bei den hier verwendeten Polymervliesen (Ethisorb<sup>®</sup>) handelt es sich um ungewebtes Material mit einem Gesamtdurchmesser von 5 mm und einer Höhe von 3 mm, welches aus

resorbierbaren polylactid und polyglycolid Säuren (PGLA) besteht. Zusätzlich ist ein geringer Anteil an Polydioxanon zur Fixierung der Fasern untereinander enthalten. Die Biokompatibilität dieser Vliese wurde in unserer Studiengruppe schon mehrfach untersucht<sup>104;111</sup>. Bei der Verwendung als Nahtmaterialien haben sich diese Bestandteile seit Jahren bewährt. Die Degradation des Ethisorbs<sup>®</sup> beginnt in vitro nach ca. 3 Wochen<sup>111</sup>. Die  $\alpha$ -Hydroxysäuren Glykolat und Laktat sind die Grundbausteine biokompatibler resorbierbarer Polymere (Abb 2).



**Abb. 2** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Polymervlieses, obenstehende Strukturformeln der Bestandteile.

### 2.1.3 Geräte

Autoklaveeinrichtung	Heraeus, Osterode
Bandsäge	Exakt GmbH , Norderstedt, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus, Osterode
Einmal-Spritzen	Braun Melsungen
Einmal-Kanülen	Braun Melsungen
Einmal-Spritzenvorsatzfilter	Schleicher und Schuell, Deutschland
Ethisorb <sup>®</sup> Vlies	Ethicon, Hamburg
Falcon Röhrchen (50 ml)	Falcon, Heidelberg
Gewebekulturflaschen	Nunc, Brand Products
Hämozytometer	Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg
Handschuhe	Mikrotouch, Johnson & Johnson, USA
Innenlochsäge	Modell 1600, Leitz, Wetzlar, Deutschland
Kühlbox	Electrolux RC 1600
Laminar-Flow-Bank	Antair BSK, Heraeus, Osterode
Magnetrührer Variomac	H+P Labortechniksystem, München
Mikroskop	Leitz Orthoplan und Typ DMIL
Nylonnetz (250 µm)	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Nahtmaterial (Seralon)	Ethicon, Hamburg
Norian SRS	Norian Corp., Cupertino, California, USA
Kunststoff Objektträger	Diaplust, Hamburg
Ultramikrotom	Ultracut E, Leica, Wien, Österreich

Perfusionskammern	Minucells and Minutissue GmbH, Bad Abbach
Peristaltikpumpe	Ismatec 52 IPN
Petrischalen	Cellstar, Labortechnik, Nürtingen
Pipettierhilfe	accu-jet, Brand, Wertheim
Präzisionswaage	Sartorius LA 2305, Deutschland
Poliergerät	Exakt GmbH , Norderstedt, Deutschland
Skalpelle	Bard Parker, Becton Dickson
Spannform	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Dr.Berger
Spinnerflaschen	Wheaton, USA
Sterile Spitzen	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	Falcon, Heidelberg
Sputter-Gerät	Modell SC 500, Emscope, USA
Vakuum Trockenschrank	Heraeus, Osterode
Wärmekammer	Heraeus, Osterode
24 Loch Platte	Falcon, Heidelberg
Zentrifuge	Beckman GS-6R-Centrifuge

#### 2.1.4 Reagenzien und Lösungen

Ascorbinsäure (fest)	Merck, Darmstadt
Braunol	B.Braun, Melsungen
Collagenase P	Boeringer, Mannheim
Collagenase II	Seromed Biochrom KG, Berlin
Ethanol 96 %	Merck, Darmstadt

Formvar	Monsanto, St. Louise, MO, USA
Fibringel	Tissucol Duo S1
FCS (fetales Kälberserum)	Seromed Biochrom KG, Berlin
Gewebekleber Tissucol Duo S	Immuno, Heidelberg
Giemsa Färbelösung	Merck, Darmstadt
HANK's Salt Solution	Seromed Biochrom KG, Berlin
Ham's F-12 Medium	Seromed Biochrom KG, Berlin
Hyaluronidase (fest)	Roth, Karlsruhe
Hepes (1 M)	Seromed Biochrom KG, Berlin
Instandbond	Instandbond Klebstoffe GmbH
Ketanest (50 mg/ml)	Parke-Davis, Berlin
L-Glutamin (200 mM)	Seromed Biochrom KG, Berlin
L-Prolin	Sigma Cellculture, St. Louis, USA
Leitsilber	GC Electronics, Rockford, Illinois, USA
Methylblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Nystatin (fest)	Seromed Biochrom KG, Berlin
NaCl (0,9 %)	Braun, Melsungen
PBS-Dulbecco (Phosphat Puffer)	Seromed Biochrom KG, Berlin
P/S (10000U/10000 µg/ml)	Seromed Biochrom KG, Berlin
Rompun (2 %)	Bayer, Leverkusen
Technovit	Kulzer & Co., Wehrheim, Deutschland
Trypsin/EDTA(10x) 0,5/0,2 % in 10x PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Seromed Biochrom KG, Berlin

Trypanblau (0,2 %)	Chroma-Gesellschaft, Schmid, Köngen
--------------------	-------------------------------------

### 2.1.5 Rohmedien

#### Ham's F-12 Medium (1x)

- w 10 mg/l Phenol rot
- w 1,176 g/l NaHCO<sub>3</sub>
- w/o L-Glutamine

#### HANK's Salt Solution (1x)

- w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>
- w Phenol rot

### 2.1.6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

#### Ham,s F12-Medium

- 5 % FCS (inaktiviert 56°C, 30 min)
- Prolin 70 mg/ml
- Glutamin (steril filtriert)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- Hepes

#### RPMI-Medium 1640 (1x)

- 10 % FCS (inaktiviert 56°C, 30 min)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- Nystatin (Spatelspitze)

### 2.1.7 Zusammensetzung des Fibrinklebers

1 Fertigspritze Kleberproteinlösung tiefgefroren 1 ml, enthält:

Humanplasmafraktion 80 - 120 mg

Mit Fibrinogen 70 - 110 mg

Blutgerinnungsfaktor XIII 10 - 50 E

Plasmafibronectin 2 - 9 mg

Plasminogen 0,02 - 0,08 mg

Aprotinin (bovin) 3000 KIE

Hilfsstoffe:

Natriumcitrat, Natriumchlorid, Glycin, Humanalbumin,

Heparin, Triton, Creatin, Wasser für Injektionszwecke

Eine Fertigspritze Thrombinlösung tiefgefroren 1 ml, enthält:

Thrombin (human) 500 I.E.

Calciumchlorid 2 H<sub>2</sub>O 5,88 mg Hilfsstoffe:

Natriumchlorid, Glycin, Wasser für Injektionszwecke

### **2.1.8 Enzymmix**

Für 1 kleine Spinnerflasche:

30 ml RPMI-Medium 10 % FCS P/S

1 mg/ml Collagenase P

0,1 mg/ml Hyaluronidase

0,1 mg/ml Collagenase II

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung von Knorpelzellen**

#### **2.2.1.1 Knorpelentnahme**

Für die Entfernung der Gliedmaßen an zwei weiblichen Chinchilla Kaninchen wurden sterile Osteotomiesets verwendet. Die Gliedmaßen wurden ohne Eröffnung der Gelenkhöhlen mit dem Schulterblatt bzw. mit dem Hüftknochen vom Torso entfernt. Als Narkosemittel erhielten die zuvor mit Hilfe einer Schermaschine (Aesculap) an den Gliedmaßen vollständig von Haaren befreiten Kaninchen eine intramuskuläre Gabe von Ketamin Rompun (im Verhältnis 2:1) in der Dosierung 5 ml pro Tier. Die so gewonnenen Gliedmaßen wurden mit sterilen und mit NaCl durchtränkten Tüchern in ein abgeschlossenes Gefäß verbracht und bis zur weiteren Verarbeitung durchgängig auf 6°C gekühlt.

#### **2.2.1.2 Isolierung primärer Chondrozyten aus Knorpelgewebe**

Die Gliedmaßen wurden hierzu unter einer Laminar Flow Bank unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette bis auf die Knochen und die unverletzte Gelenkhöhle freipräpariert. Die fertig präparierten Extremitäten wurden mit 70 % Ethanol gespült und die Gelenkhöhlen mit dem Skalpell eröffnet. Mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette wurde nun vorsichtig die Gelenkknorpelfläche an den konvexen Gelenkflächen von dem darunter liegenden Knochen entfernt. Das so gewonnene Knorpelgewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert und in vorgewärmtes RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin; Pen/Strep, 2 mM Glutamin) überführt. Die Knorpelstücke wurden mit 30 ml steril filtriertem Enzymmix (0,15 mg/ml DNase I, 2 mg/ml Kollagenase P (Boehringer, Nr. 1213857)), 2 mg/ml Kollagenase Typ CLS II (Seromed, Nr. C2-22), 0,1 mg/ml Hyaluronidase (Sigma, Nr. H4272) in RPMI 1640 (Pen/Strep, 2 mM Glutamin, 10 % FCS) versetzt und in eine Spinnerflasche überführt. Der enzymatische Verdau erfolgte unter rühren bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>; über einen Zeitraum von 13 h. Die resultierende Zellsuspension wurde durch ein ca. 4 x 4 cm großes Nylonnetz, das zuvor mit Alkohol 70 % desinfiziert worden ist, in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 25-30°C, 1800 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Niederschlag in HANK,s-Lösung resuspendiert und



zentrifugiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation klar erschien. Dann wurde das Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl bzw. Vitalität mit einer Neubauerzählkammer festgestellt.

### 2.2.1.3 Zellzählung im Hämozytometer

Zur Vitalitätsbestimmung diente die Trypanblaumethode, da vitale Zellen Trypanblau nicht aufnehmen, während der Farbstoff in geschädigte Zellen eindringen kann und deren Zellkern und Zytoplasma blau färbt. Es wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und in die Neubauer Kammer pipettiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden mit Hilfe der 40fachen Vergrößerung 4 x 16 kleine Quadrate (entspricht einem großen Quadrat) ausgezählt und daraus der Mittelwert für ein großes Quadrat bestimmt.

$$X \cdot 2 \cdot 5 \cdot 104 = \text{Zahl der gewonnenen Zellen}$$

Oben aufgeführt ist die Formel zur Ermittlung der Zellzahl, wobei X die durchschnittliche Anzahl gezählter Zellen in einem großen Quadrat ist. Die 2 ist der Verdünnungsfaktor, der durch die Zugabe von Trypanblau entstanden ist. Es wurde eine Fläche von 1 mm ausgezählt. Daraus ergibt sich ein Faktor von 104, um die Zellen auf einen ml beziehen zu können. Da die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen wurden, muss der Faktor fünf einbezogen werden, um die Gesamtzellzahl in einem Röhrchen zu erhalten. Diese Zellzählung ergab eine Zellzahl von durchschnittlich 37,9 Mio. vitalen Zellen nach dem enzymatischen Verdau.

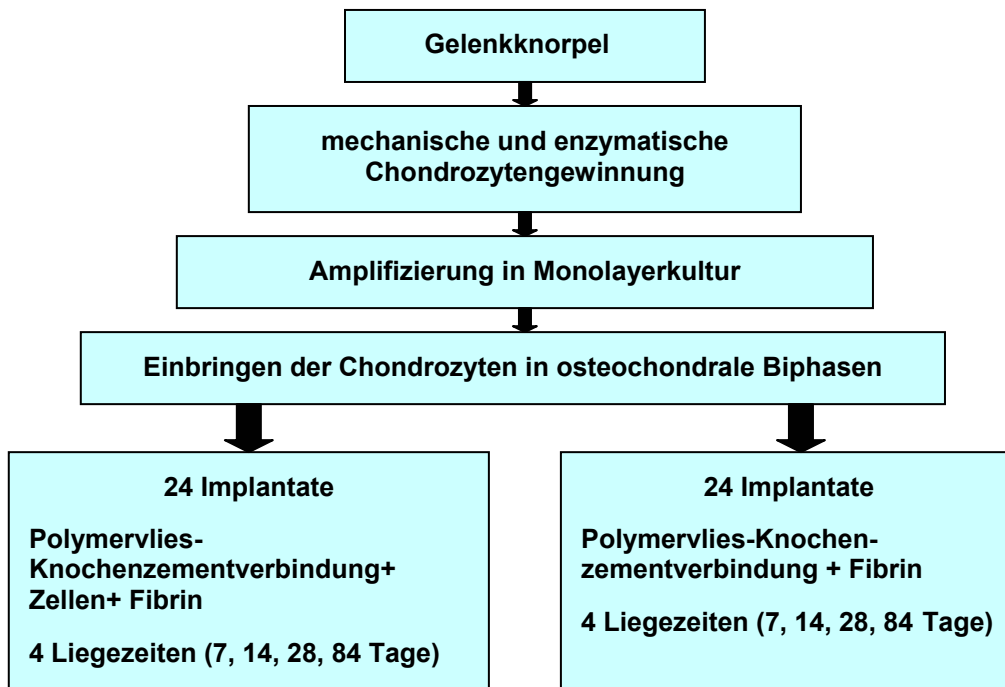


**Abb. 3** Chondrozyten nach mehreren Passagen in der Monolayerkultur (Vergrößerung 100x).

### 2.2.2 Zellkultur

Die isolierten Chondrozyten wurden in der Monolayerkultur verfielfältigt (Abb. 3). Hierzu wurde das Zentrifugat in RPMI 1640 (Pen/Strep, 2 mM Glutamin, 10 % FCS) resuspendiert, ca. 5 - 6 Mio. Zellen wurden pro große Kulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Die Chondrozyten wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, bei welchem unter sterilen Bedingungen das alte Medium gegen neues ausgetauscht wurde. Das Passagieren der Chondrozyten erfolgte bei konfluentem Bewuchs nach 5 - 6 Tagen. Hierzu wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS gespült. Dann wurde eine Trypsin/EDTA Lösung (1x) in die Kulturflasche gegeben und diese für 5 min im Brutschrank erwärmt. Um die Zellen vollständig zu lösen, wurden die Zellkulturflaschen leichten Erschütterungen ausgesetzt, welche den Ablösevorgang forcieren sollten. Die Trypsinierung der Zellen konnte anschließend mit einer entsprechenden Menge RPMI-Medium 10 % FCS P/S gestoppt werden und der Inhalt der Flasche mittels einer Pipette homogenisiert und in ein Röhrchen zur Zentrifugation überführt werden. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 1800 U/min und 25 - 30°C. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert und das Pellet in 5 ml RPMI Medium resuspendiert, um die genaue Zellzahl zu bestimmen. Die Zellen wurden entsprechend auf neue Kulturflaschen verteilt. Um das rasche Wachstum der Zellen zu verlangsamen wurden diese ab der 2. Passage mit einem Medium mit reduziertem 6 % FCS Gehalt ernährt. Alle Zellen wurden 3x passagiert, vor dem Einbringen in die Vlieskulturen.

### 2.2.3 Herstellung der Implantate

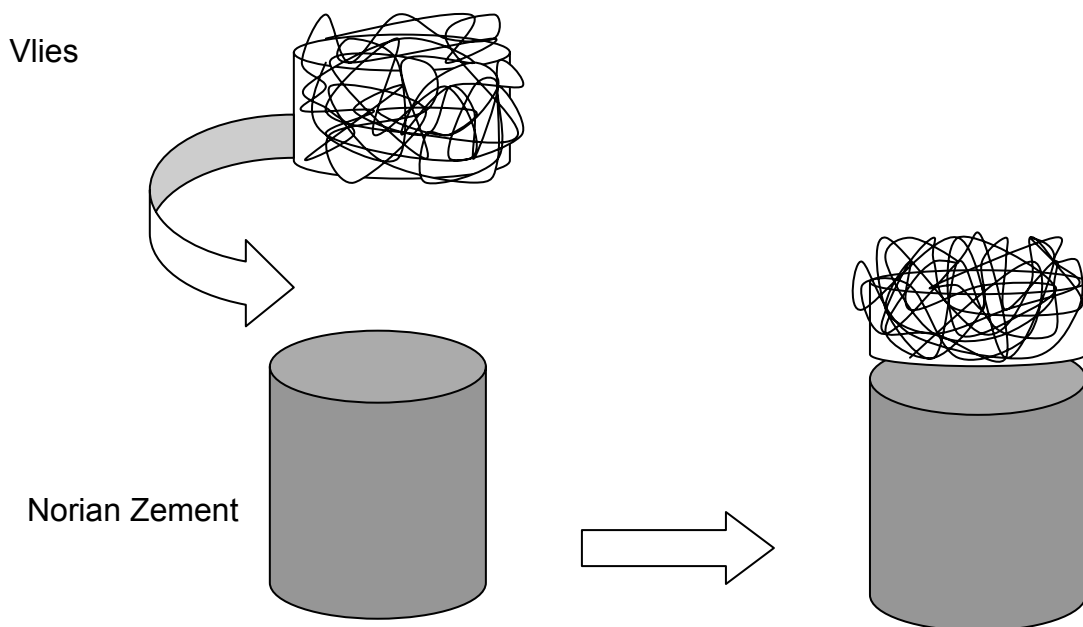


**Abb. 4** Schema zur In-vitro-Herstellung der Implantate

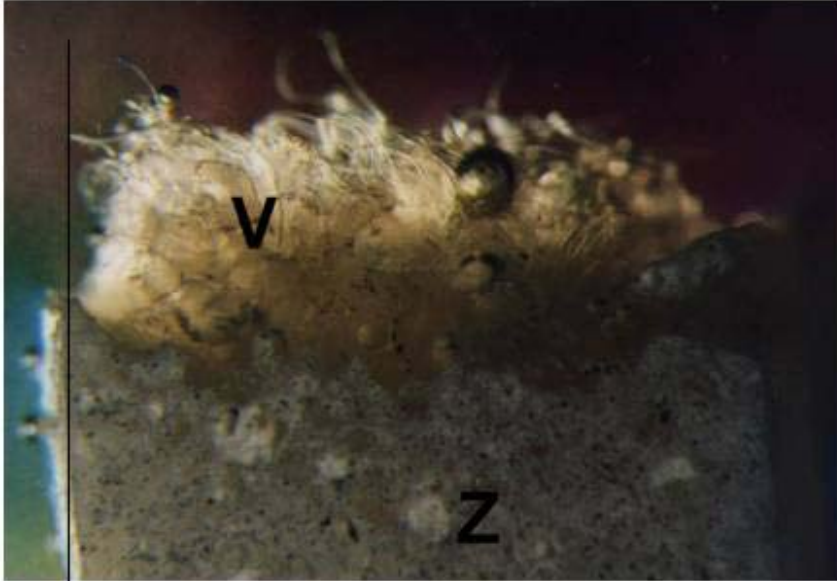
#### 2.2.3.2 Die zellfreien Implantate

Bei der Herstellung der Implantate (Abb. 4) wurden die vorgefertigten zellfreien Vliese mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 3 mm (Ethicon®) fest mit dem Kalziumphosphat Knochenzement Norian® SRS verbunden. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen das Norian von Hand angemischt. Dabei wurden die Pulver- und die Flüssigkeitskomponente zusammengegeben und mit einem Mörser mit ca. 2 Umdrehungen pro Sekunde insgesamt 2 Minuten lang durchmischt. Nach dem Mischen lag eine homogene pastenförmige Konsistenz vor. Die so entstandene Paste wurde nun mit einem Spatel in die aus Metall gefräste Spannform gegeben. Innerhalb eines Zeitfensters von 5 min, mit Beginn der Fertigstellung der Zementpaste, wurden die Vliese an der Oberfläche der Zementzylinder verankert (Abb. 5,6,7). Dabei wurden sie mit Hilfe eines Stempels leicht in den noch weichen Zementzylinder gepresst. Anschließend härteten die so hergestellten Implantate in ihrer Spannform in einem sterilen Transportbehälter für 10 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> aus.

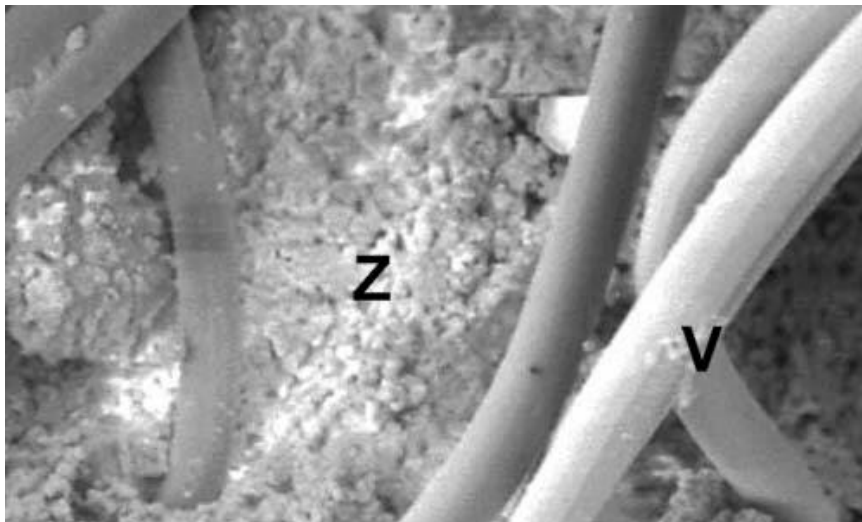
Nach dieser Aushärtungsphase wurden die Implantate steril in 24 Loch Platten mit jeweils 250  $\mu\text{l}$  Medium (RPMI, FCS 10 %, P/S) überführt und im Wärmeschrank bei 37°C, 5 %  $\text{CO}_2$  gelagert, nach dem Erreichen der endgültigen Druckfestigkeit nach 24 Stunden verblieben sie bis zur weiteren Verarbeitung steril im Wärmeschrank.



**Abb. 5** Herstellung der Polymervlies-Zementverbindung



**Abb. 6** Polymervlies-Zementverbindung, Schnitt durch zylinderförmiges Implantat mit Darstellung der Vliesstruktur (V) und des Zementanteils (Z).



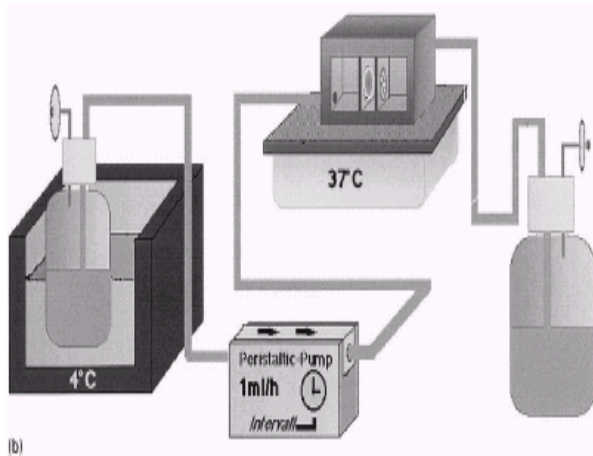
**Abb. 7** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Vlies-Zementverbindung (Durchmesser der Vliesfasern ca. 12  $\mu\text{m}$ ), Zementanteil (Z), Vliesfasern (V).

### **2.2.3.2 Beladen der Implantate mit Chondrozyten**

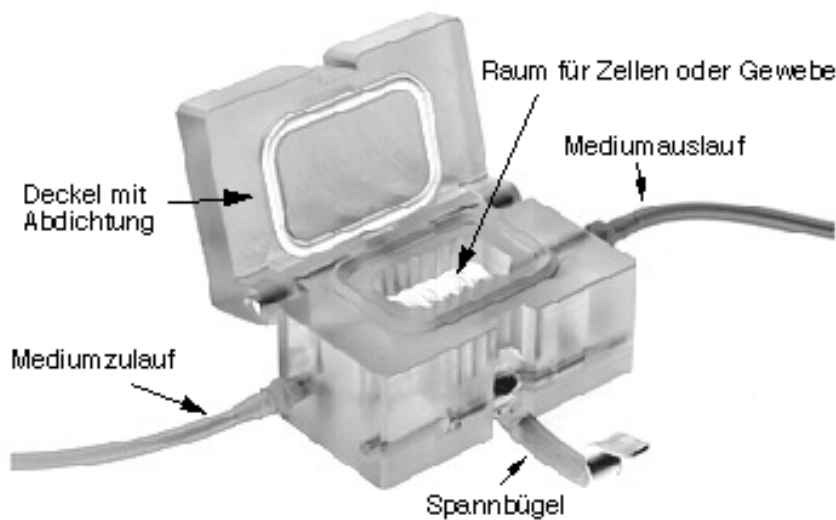
Da in diesem Versuch mit Zellen beladene Implantate Implantaten ohne Zellen gegenübergestellt werden sollten, wurden die aus der Zellkultur gewonnenen Zellen nach der 3. Passage unter sterilen Bedingungen auf die Hälfte der vorgefertigten Implantate ausgesät. Es wurde eine Zellkonzentration von 30 Mio. Zellen/ml verarbeitet. Bei den verwendeten Vliesen mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von ca. 3 mm ergibt sich ein Volumen von ca. 60  $\mu\text{l}$  für ein einzelnes Vlies. Daraus ergibt sich, dass 1,8 Mio. Zellen pro Implantat benötigt wurden. Diese 1,8 Mio. Zellen wurden mit Fibrinogen im Verhältnis 1:2 gemischt, d. h. pro Vlies (mit einer 100 prozentigen Reserve) eine Zellsuspension von 80  $\mu\text{l}$  und 40  $\mu\text{l}$  Fibrinogen. Das Thrombin wurde mit PBS 1:10 verdünnt, es wurden pro Implantat ca. 60  $\mu\text{l}$  Thrombinlösung benötigt. Die Zell-Fibrinogensuspension wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette auf den Vliesanteil der Implantate gegeben, bis das Vlies vollständig und ohne sichtbare Lufteinschlüsse mit Flüssigkeit vollgesogen war. Anschließend wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette tropfenweise Thrombinlösung auf das Vlies gegeben, bis es vollständig benetzt war. Um die Polymerisation des Fibrins zu gewährleisten, wurden die Implantate für 5 Minuten steril in den Wärmeschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) gegeben.

### **2.2.4 Vorkultivierung der fertigen Implantate**

Die mit Chondrozyten beladenen Implantate wurden zur Vorkultivierung steril in Zellkulturkammern (Minutissue) überführt (88). Es handelt sich bei diesen Zellkulturkammern um ein geschlossenes Perfusionskammersystem, welches mit Hams F12 Medium (FBS, P/S, Prolin, Ascorbin, HEPES) zur Ernährung der Zellen gefüllt war (Abb. 8,9).



**Abb. 8** Schematische Zeichnung eines Perfusionskammersystems



**Abb. 9** Zellkulturkammer (Minutissue)

Bestehend aus einer auf 4°C gekühlten Frischmediumflasche einer Peristaltikpumpe mit einer Durchlaufzeit von 1 ml/h der Perfusionskulturkammer, welche auf 37°C erwärmt wurde, und einer Auffangflasche für das verbrauchte Medium. Nach 14 Tagen Vorkultivierung in den Perfusionskammersystemen wurden die Perfusionskammern unter sterilen Bedingungen eröffnet. Die Implantate wurden einzeln in mit Hams F12 Medium (FBS, P/S, Prolin, Ascorbin, HEPES) gefüllte Falcon Röhrchen überführt, welche steril für den Transport verschlossen wurden. Die Implantate wurden in diesen Falconröhrchen steril in einer Wärmebox bei 37°C zum Operationssaal transportiert.

## **2.3 Tierexperimente**

### **2.3.1 Versuchstiere und Tierhaltung**

Als Versuchstiere wurden weibliche Chinchilla-Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 3511 g und 5150 g verwendet. Die Kaninchen wurden einzeln in Käfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten, mit einem 12 Stunden Tag- und Nacht-Rhythmus, bei einer Raumtemperatur von 17 - 19°C und bei 50 % Luftfeuchtigkeit. Die Ernährung erfolgte mit pelletiertem Trockenfutter Altromin Standard (Altromin Tier-Labor Service GmbH, Lage Lippe, Deutschland) und Wasser ad libitum. Insgesamt wurden 24 Kaninchen, 6 pro Liegezeit, untersucht. Der Tierversuch wurde 1999 durch die Behörde der Berliner Regierung unter Nummer G 0150/99 genehmigt.

### **2.3.2 Operationsverfahren**

#### **2.3.2.1 Implantation**

Die Versuchstiere wurden in eine Vollnarkose gelegt. Dazu wurde intramuskulär ein Gemisch aus Rompun® (Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Ketanest® (Parke-Davis, Berlin, Deutschland) injiziert. Rompun® wurde mit 15 mg/kg Körpergewicht, Ketanest® mit 75 mg/kg dosiert. Bepanthen®-Augensalbe (Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) wurde appliziert, um das Austrocknen der Augen zu verhindern. Nach Rasur der gesamten Hinterläufe wurde das übrige Fell durch Verbandsmull abgedeckt. Die Hautdesinfektion des OP-Feldes erfolgte mittels Braunoderm® (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Nach steriler Abdeckung des OP-Feldes mit Hilfe von Opraflex® Klebetüchern (Lohmann & Rauscher GmbH) erfolgte die Inzision der Haut medial des Kniegelenks, parallel zur Längsachse des Femurs. Die distale Epiphyse des Femurs wurde durch Luxation der Patella nach lateral freigelegt und das Implantatlager durch eine von ventral nach dorsal gerichtete Bohrung geschaffen. Für die Bohrung wurde ein diamantierter Hohlzylinderbohrer mit einem äußeren Durchmesser von 4 mm benutzt. Um die Traumatisierung des umliegenden Gewebes so gering wie möglich zu halten, wurde mit niedriger Drehzahl und unter Kühlung des Bohrloches mit physiologischer Kochsalzlösung gearbeitet. Der freigebohrte Knochenzylinder wurde aus dem Gelenk entfernt, und das so entstandene Implantatlager mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die vorbereiteten Implantate wurden nun steril in das Bohrloch eingeschoben, bis ein möglichst glatter



Abschluss zwischen den Knorpelflächen gegeben war. Nach dem Einsetzen des Implantates wurde die Wunde schichtweise mit Vicryl® (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) der Fadenstärke 3-0 verschlossen. Für die Hautnaht wurde Mersilene® (Ethicon GmbH) der Fadenstärke 3-0 verwandt. Postoperativ wurden die Wunden lokal antibiotisch mit Nebacetin® Puder behandelt (Yamanouchi Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die Tiere erhielten außerdem eine Infektionsprophylaxe durch eine intramuskuläre Injektion von 7 mg/kg Körpergewicht Gentamicin 80 (B.R.A.H.M.S. GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Die Versuchstiere erhielten eine einmalige Analgesie durch intramuskuläre Gabe von 330 mg/kg Körpergewicht Aubikal® (Atarost, Twistringen, Deutschland). Alle Versuchstiere wurden beidseitig operiert. Es wurde jeweils ein mit Zellen beladenes und ein zellfreies Implantat eingebracht. Demzufolge standen pro Liegezeit 6 Implantate mit Zellen und 6 ohne Zellen zur Verfügung. In jeder Implantatgruppe, also in der mit und in der ohne Zellen, sollten alle Implantate lichtmikroskopisch und jeweils zwei rasterelektronenmikroskopisch, transmissionselektronenmikroskopisch, immunhistologisch und mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung untersucht werden. Die Implantate wurden bei der Explantation entsprechend geteilt.

### **2.3.2.2 Explantation**

Die Versuchstiere wurden nach 7, 14, 28 und 84 Tagen in der oben beschriebenen Art und Weise narkotisiert. Die Versuchstiere, bei denen Teile der Implantate für die In-situ-Hybridisierung vorgesehen waren, wurden zunächst mit 100 ml 4 % Paraformaldehyd / PBS Lösung (PFA/PBS) über die Bauchorta perfundiert, um eine möglichst rasche Fixierung des Gewebes und einen Stopp der für die Untersuchung mit In-situ-Hybridisierung kritischen Ribonukleinsäure-Zersettern (RNasen) zu bewirken. Nach erfolgter Perfusion wurde das Kniegelenk in derselben Art und Weise wie bei der Implantation freigelegt. Die sich anschließende Sektion wurde mit einer mit physiologischer Kochsalzlösung gekühlten diamantierten Trennscheibe durchgeführt. Dazu wurden zunächst die dorsalen und lateralen Bereiche der Femurkondylen in der Umgebung des Implantates abgetragen, um eine spätere Diffusion der eingesetzten Fixiermittel zu erleichtern. Anschließend wurde das Femur proximal des Implantatbettes durchtrennt und der so gewonnene Block mit dem eingeschlossenen Implantat wurde nun mit Hilfe der Trennscheibe zu 1/3 und 2/3 geteilt, wobei die 2/3

des Implantates jedes Mal für die lichtmikroskopische Untersuchung und das verbleibende eine Drittel für die restlichen Untersuchungen herangezogen wurde. Bei allen Tieren trat der Tod unter Vollnarkose ein. Den Versuchstieren wurde in tiefer Narkose nach der Sektion T61<sup>®</sup> (Intervet GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) intrakardial gespritzt, was zum Tod durch Herzstillstand führte.

## **2.4 Präparation**

### **2.4.1 Immunohistologie und In-situ- Hybridisierung**

Auf die Aufarbeitung der Proben für die In-situ-Hybridisierung und die Immunhistologie soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

### **2.4.2 Lichtmikroskopie**

Die Proben für die Lichtmikroskopie wurden in Formaldehyd nach Lillie fixiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Daraufhin wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Äther-Chloroform entfettet. Schließlich wurden die Proben über vier weitere Stufen in Methylmetacrylat eingebettet. Nach mehrtägigem Aushärten des Kunststoffes in einem 38°C warmen Wasserbad wurden die gewonnenen Kunststoffblöcke mit Hilfe einer Handsäge und einer Handfeile getrimmt, diese kleineren Kunststoffblöcke wurden nun mit Technovit<sup>®</sup> (Kulzer & Co., Wehrheim, Deutschland) auf einem Metallteller montiert. Es wurde versucht, eine möglichst optimale Ausrichtung der Längsachse des Implantates zum Metallhalter und somit zur späteren Schnittführung zu erreichen. Der Objekthalter wurde in die zugehörigen Innenlochsäge (Leitz 1600, Wetzlar, Deutschland) eingespannt. Vor jedem Schnitt wurde ein Kunststoff-Objekträger (DIAPLUS) direkt mit Sekundenkleber (Instandbond GmbH, Berlin, Deutschland) auf den in die Innenlochsäge eingespannten Präparateblock geklebt. Mit der Innenlochsäge wurden von den Implantaten Schnitte von 50 µm Dicke angefertigt. Die so gewonnenen Schnitte wurden anschließend unter mikroskopischer Kontrolle auf einem halbautomatischen Poliergerät (Exakt GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit Naßschleifpapier, 2000er Körnung, poliert. Anschließend wurden pro Implantat ein Schnitt nach Giemsa und ein Schnitt nach von Kossa/Paragon gefärbt.

### 2.4.3 Elektronenmikroskopie

Bei den für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bzw. für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) vorgesehenen Femur-Dritteln wurde das Implantatbett mit einer diamantierten Trennscheibe eng umschnitten. Die Aufarbeitung der Präparate wurde nach Müller-Mai vorgenommen<sup>88</sup>. Die REM-Proben wurden in Glutaraldehyd fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Hexamethyldisilazane infiltriert. Im Anschluss wurden die Proben luftgetrocknet, im Exsikkator entgast und auf einem REM-Probenteller mit Leitsilber befestigt. 24 Stunden später wurden die Proben mit einem Sputter-Gerät (Modell SC 500, Emscope, USA) im Hochvakuum mit einer Goldschicht bedampft. Die TEM-Proben wurden in Glutaraldehyd und Osmiumsäure fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und über fünf Schritte mit Epon infiltriert. Danach wurden die Proben in Silikonformen eingebettet und anschließend im Exsikkator bei 70°C und 600-800 mbar für 1 bis 3 Tage polymerisiert. Im Anschluss daran wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Leica, Wien, Österreich) Schnitte mit einer Dicke von 80 nm hergestellt und auf mit Formvar<sup>®</sup> (Monsanto Chemical Company, St. Louise, MO USA) befilmten Kupfernetzen aufgebracht.

## **2.5 Auswertung**

### **2.5.1 Qualitative Auswertung**

Zur qualitativen Bewertung wurden die einzelnen Schnitte der Implantate anhand folgender Kriterien begutachtet. Es wurde überprüft, inwieweit ein Abschluss des Implantatgebietes gegenüber dem Gelenkraum gewährleistet ist. Anschließend wurde die Gewebe- und Materialantwort untersucht. Bei der Gewebeantwort galt es, den Einbau des Zementzylinders in den vorhandenen Knochen und die Reaktion auf die eingebrachten Chondrozyten zu untersuchen. Die Degradation des Zementes bzw. der Ersatz durch Knochengewebe und der Abbau der Vliesstrukturen standen bei der Materialantwort im Vordergrund.

### **2.5.2 Quantitative Auswertung**

#### **2.5.2.1 Messungen**

Zu jedem Implantat wurde ein Schnitt nach Giemsa und ein Schnitt nach von Kossa/Paragon gefärbt und anschließend vermessen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der jeweilige Schnitt möglichst mittig durch das Implantat führte. Die Implantate wurden in einer Übersichtsaufnahme in 40facher Vergrößerung fotografiert, welche zur Orientierung und zur Aufteilung der Implantate diente. Das Implantat wurde als idealisierter Zylinder definiert, welcher ventral mit der Vlies-Knorpelschicht abschließt und sowohl dorsal als auch distal bzw. proximal von umgebendem Knochengewebe begrenzt wird. Das so definierte Implantatbett wurde von ventral nach dorsal gedrittelt, wobei das ventrale Drittel die Vlieskomponente beinhaltet. Bei dem mittleren Drittel wurden zwei anliegende Bereiche definiert, in welchen der Knochenkontakt zum Implantat und das Volumen des neu gebildeten Knochens bestimmt wurden. Außerdem wurden der Umfang und der Durchmesser für jedes einzelne Implantat gemessen.

#### **2.5.2.2 Auswertung**

Es wurde zunächst mit Hilfe einer explorativen Datenanalyse die Verteilung der Messparameter bestimmt. Für die Messwerte der Flächen lag eine Normalverteilung vor, somit wurde mit Hilfe des T-Tests für verbundene Stichproben eine Überprüfung der Nullhypothese durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug  $p=0,05$ . Bei Unterschreitung des jeweiligen kritischen Wertes für  $p=0,05$  wurde die jeweilige

Nullhypothese abgelehnt. Geringe Überschreitungen wurden als Trend gewertet. Die Auswertung erfolgte mit dem Software Programm SPSS® 11.5 (SPSS INC. Chicago, USA).