

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tiere und Tierhaltung

Bei den 24 Versuchstieren handelte es sich um weibliche, ca. 3-jährige Merinomix-Schafe mit einem mittleren Gewicht von 68,9 kg. Vor dem Versuchsbeginn erfolgte die Einstellungsuntersuchung, die den einwandfreien Gesundheits- und Pflegezustand der Tiere gewährleistete. Dabei wurden das Allgemeinbefinden sowie der Atmungsapparat, das kardiovaskuläre System, die Schleimhäute und der Zustand von Gelenken und Klauen untersucht. Trächtige Tiere wurden vom Versuch ausgeschlossen. Die Unterbringung der Schafe erfolgte präoperativ in Ställen mit Stroheinstreu, Selbsttränken und täglicher Heufütterung. Ab dem zehnten postoperativen Tag erfolgte die Freilandhaltung auf der Weide.

3.1.2 Versuchsgruppen

Die Einteilung erfolgte in vier Gruppen zu je sechs Schafen. Vor der Operation wurden die Tiere mit unverwechselbaren Kunststoffohrmarken gekennzeichnet. Der Tierversuch wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (Genehmigungsnummer G 037/04) genehmigt.

Zusammensetzung der Versuchsgruppen:

1. Gruppe: OCT/ Osteochondraler Transfer von Knochen-Knorpel-Zylindern
Standzeit: 12 Wochen, n= 6
2. Gruppe: Spongiosacluster mit porciner Kollagenmembran und Fibrinkleber
Standzeit: 12 Wochen, n= 6
3. Gruppe: weiche Scaffolds (58%ige Steifigkeit)
Standzeit: 12 Wochen, n= 6
4. Gruppe: harte Scaffolds (84%ige Steifigkeit)
Standzeit: 12 Wochen, n= 6

Bei den Scaffolds bezieht sich die Steifigkeit auf den gesunden ovinen subchondralen Knochen.

3.2 Methoden

3.2.1 Präoperative Vorbereitung der Versuchstiere

Vor dem operativen Eingriff blieben die Tiere 12 Stunden nüchtern bei Trinkwassergabe ad libitum. Das Tier wurde fixiert und bekam einen Venenverweilkatheter in die Vena cephalica antebrachii. Über diesen wurde Blut in drei Serumröhrchen, ein Heparinplasmaröhrchen und ein EDTA-Röhrchen entnommen. Mit Thiopental-Natrium (Altanta Pharma Deutschland GmbH, Konstanz) wurde intravenös die Narkose eingeleitet. Das Tier wurde mit einem 9 mm Tubus intubiert und an die Beatmungsmaschine angeschlossen. Beatmet wurde mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch (Isofloran Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe). Um ein Aufgasen des Pansens zu verhindern, wurde eine Schlundsonde geschoben. Das Tier bekam eine Ohrmarke und wurde in Rückenlage gelagert. Für die Elektroden des EKG-Gerätes wurden an beiden Karpalgelenken und am rechten Tarsalgelenk zwei Euro große Stellen frei rasiert und die Klebeelektroden angebracht. Die linke Hintergliedmaße wurde freigeschoren und im Kniebereich zusätzlich mittels einer Enthaarungscreme entfernt. Abschließend wurde das Operationsfeld gründlich mit Wasser gereinigt und alle vier Klauen mit Mullbinden umwickelt.

3.2.2 Operation

Das Schaf erhielt im Operationssaal zunächst einen Antibiotikumtropf Augmentan 2,2g (SmithKline Beecham, München) und dann als Dauertropfinfusion eine 1-Liter-Vollelektrolytlösung (Delta Select GmbH, Deutschland). Bis auf die linke Hintergliedmaße wurde das Schaf komplett mit sterilen Abdecktüchern abgedeckt. Die linke Hintergliedmaße wurde mit einer Jodlösung (Braunol, B. Braun, Melsungen) desinfiziert. Das zu operierende Kniegelenk war während der Operation in maximaler Beugstellung. Über einen medialen Hautschnitt in einer Länge von ca. 6-8 cm erfolgte der operative Zugang zum Kniegelenk. Das Eröffnen des Gelenks geschah über einen medialen parapatellaren Zugang unter Durchtrennung der Faszie, der Gelenkkapsel und ca. 1 cm des Musculus quadriceps femoris. Die Patella konnte dadurch nach lateral luxiert werden. Ein erhebliches technisches Problem stellte die kontinuierliche Sichtbehinderung durch den Hoffaschen Fettkörper und die Ursprungssehne des Musculus extensor digitorum longus dar. Um die Kondylen darzustellen, wurde ein Teil des Fettkörpers mit dem Elektrokauter entfernt und die Ursprungssehne des

Musculus extensor digitorum longus mit einem Smiley-Haken manuell nach lateral verlagert. Zusätzlich wurde der Kauter zur Verödung der Gefäße verwendet, um eine bessere Sicht im Operationsfeld zu erzielen und Einblutungen in das Gelenk weitestgehend zu vermeiden. Zur Kontrolle diente bei allen vier Operationstechniken ein Leerdefekt, der randomisiert auf der linken oder rechten Femurkondyle des linken Knies gesetzt wurde.

Der Leerdefekt wurde unter Verwendung einer dünnwandigen Hohlfräse (Zimmer GmbH, Schweiz) mit millimetergenauem Längenmaß und einem Durchmesser von 7,45 mm im lasttragenden Bereich der Femurkondyle gesetzt. Dabei ergab sich ein Leerdefekt mit einem Durchmesser von 8,3 mm. Die Tiefe des subchondralen Defektes betrug 10 mm. Auf der gegenüberliegenden Kondyle wurde ein Defekt mit 7,3 mm Durchmesser und 10 mm Tiefe gebohrt. Wichtig war, dass die Oberflächen, auf denen der Defekt gesetzt wurde, eine ähnliche Konvexität besaßen. Die Knochen-Knorpelzylinder wurden mit einem Extraktor, der mit leichten Hammerschlägen bis zur Schlifftiefe vorgetrieben wurde, mit sanfter Drehung in der Längsachse an der Basis abgedreht. Anschließend erfolgte die Auffüllung des Defektes in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe der das Schaf angehörte (Abb. 4).

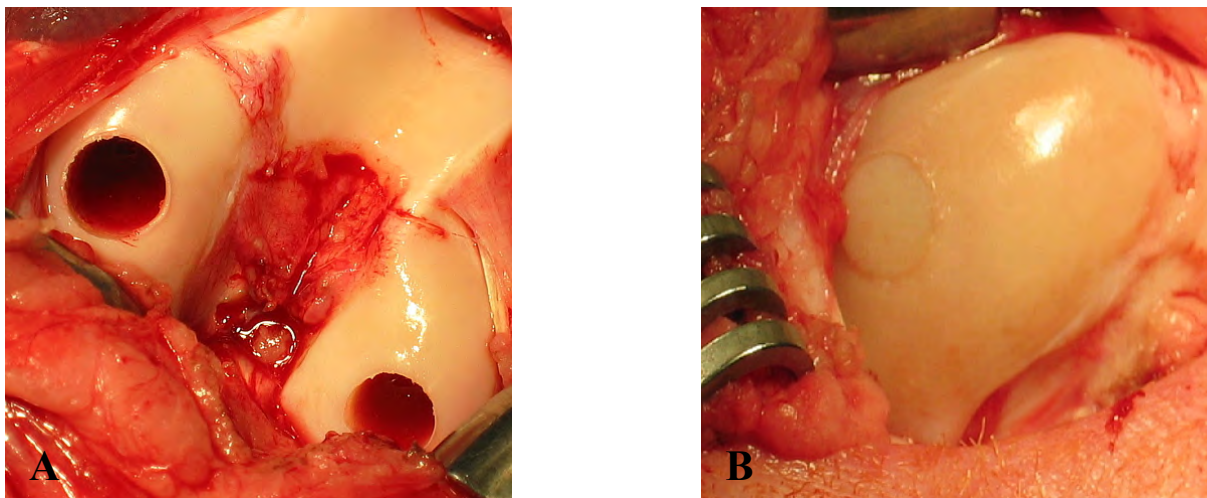


Abb. 4: SDS-Instrumentarium©, ZimmerGermany GmbH, Freiburg: Operationsbesteck mit Führungshülsen, Hohlfräsen und Extraktor

I. Operative Technik des Osteochondralen Transfers (OCT)

Für die Auffüllung des Defektes musste dessen Grund plan gehämmert werden. Anschließend wurde der Spenderzylinder mittels der Spenderführungshülse in den Empfängertunnel mit

leichten Schlägen eingebracht. Eine Feinanpassung des Niveaus des Spenderzylinders an die umgebende Knorpeloberfläche erfolgt durch leichte Impaktion mit einem Plastikstößel. Um eine Stufenbildung zu vermeiden bzw. zu minimieren, wurde die Oberflächenkontur und –krümmung von Spender- und Empfängerregion berücksichtigt. Ein zu tiefes Einsinken war durch vorherige genaue Tiefenbestimmung zu vermeiden. Die Fixierung der Spenderzylinder erfolgte mittels „Press-fit-Technik“, was bedeutet, dass der Durchmesser des Spenderzylinders größer als der des Empfängertunnels ist (Abb. 5).



*Abb. 5: OCT-Operationstechnik A: osteochondraler Defekt in lateraler und medialer Femurkondyle
B: Femurkondyle nach Auffüllen des Defektes mit autologem Knorpel-Knochen-Zylinder*

II. Operative Technik der Spongiosacluster mit porciner Kollagenmembran und Fibrinkleber

Für die Auffüllung des Defektes wurden der Spender- und der Empfängerzylinder mit einer Hohlmeißelzange nach Lürer unter Ausschluss des Knorpels zerkleinert. Der Defekt wurde bis zur subchondralen Lamelle mit den Spongiosaclustern verfüllt und mittels Stößel und Hammerschlägen im Empfängertunnel verdichtet (Abb. 6a). Um den Defekt vollständig zu verschließen, wurde eine Kollagenmembran, (Chondrogide Fa. Geistlich Biomaterials, Schweiz), die zuvor passgenau zugeschnitten wurde, mit sechs Einzelheften (PDS II (6-0) Ethicon GmbH, Deutschland) aufgenäht (Abb. 6c). Die „bilayer“ Struktur der Kollagenmembran setzt sich aus einer kompakten und einer porösen Schicht zusammen, wobei die Membran so aufgebracht wird, dass letztere dem Knochen zugewandt ist. Diese Membran besteht aus porcinem Kollagen I und Kollagen III und besitzt somit eine gute Biokompatibilität. Danach wurde die Kollagenmembran mit Fibrinkleber unterspritzt (Abb.

6b), um den Defekt vollständig zu verschließen, und die Einzelhelfte mit dem Fibrinkleber (Tissucol Duo S 0,5 ml Immuno, Baxter AG, Wien) an der Knorpeloberfläche adhäsirt.

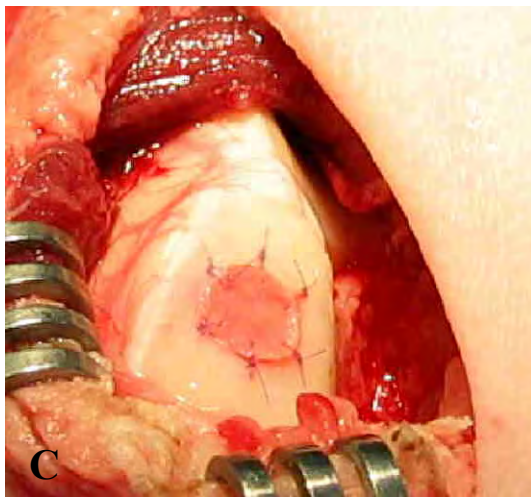
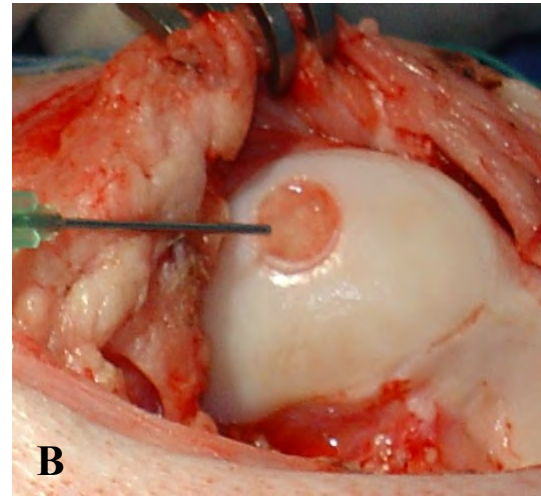
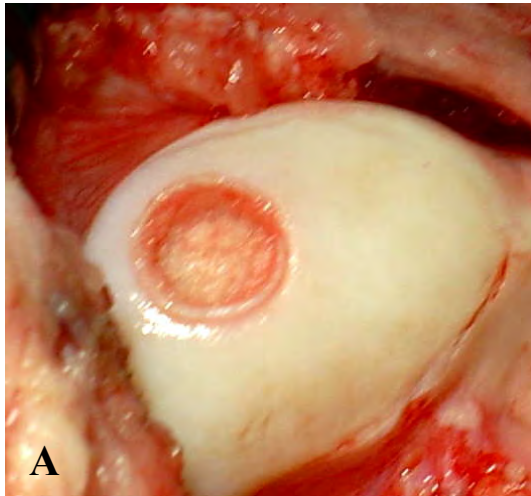


Abb. 6: Spongiosacluster-Operationstechnik

A: osteochondraler Defekt aufgefüllt mit Spongiosa bis zur subchondralen Lamelle

B: Auftragen des Fibrinklebers

C: Verschluss des Defektes mit Kollagenmembran

III. Operative Technik der Scaffolds

Diese Operationstechnik umfasst zwei Versuchsgruppen. Die weichen Scaffolds haben eine 58%ige Steifigkeit in Bezug auf den nativen Knochen und die harten Scaffolds eine 84%ige Steifigkeit. Der Grundkörper dieser Knochen-Ersatzzyylinder (OsteoBiologics, Inc., Texas) besteht aus Poly-D,L-laktid-glykolid (85:15 PLG). Polyglykolidfasern erhöhen zusätzlich die mechanischen Eigenschaften und Calciumsulfat steigert das Knochenwachstum. Bei diesem Operationsverfahren wurde, wie bei der OCT, der Grund des Defektes plan gehämmert. Das sterile, resorbierbare Bioimplantat wurde dem entnommenen Knorpel-Knochen-Zylinder in Bezug auf die Länge und der Oberflächenkonvexität mit Hilfe einer Luerzange angepasst. Der in die Spenderführungshülse eingebrachte Scaffold wurde bis zur subchondralen Lamelle in

den Empfängerdefekt eingetrieben (Abb. 7). Bei den Scaffolds sollte die Porengröße von der Oberfläche bis zum Knochen stetig abnehmen. Da der Scaffold einen Durchmesser von 7,6 mm hat, erfolgte analog zur Operationstechnik des OCT eine Fixierung mit der „Press-fit-Technik“.

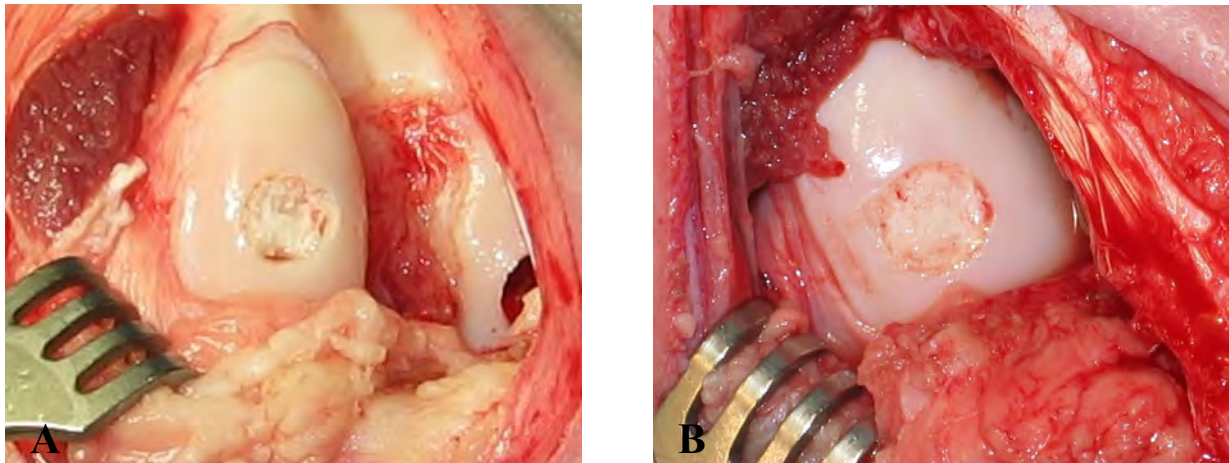


Abb. 7: Aufgefüllte osteochondrale Defekte bis zur subchondralen Lamelle; A: mit dem weichen Scaffold; B: mit dem harten Scaffold aufgefüllt

Bei allen vier Gruppen erfolgte nach Einsetzen des Implantats die Reposition der Patella und die gründliche Spülung des Gelenkes mit physiologischer Kochsalzlösung (Delta Select GmbH, Deutschland). Es folgte ein schichtweiser Wundverschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl, Ethicon GmbH, Deutschland). Die äußere Haut wurde mit nicht resorbierbaren (Prolene Ethicon GmbH, Deutschland) Einzelheften genäht und mit einem Pflaster (Fixomul stretch, BSN medical, Hamburg, Deutschland) abgedeckt. Zur Analgesie bekamen die Tiere an den Innenschenkel ein Fentanylpflaster (Durogesic SMAT Janssen-CILAG GmbH) geklebt, welches über drei Tage kontinuierlich eine Menge von 75 µg/h Fentanyl abgab.

3.2.3 Postoperatives Vorgehen

Postoperativ fand bei allen Schafen eine Röntgenkontrolle (Mobilette Plus, Siemens AG, München) in zwei Ebenen statt, um die Lage und die Tiefe der Defekte und eventuell das Niveau des Spenderzylinderknorpels zu dokumentieren. Danach wurden die Tiere zurück in den Stall verbracht. Täglich erfolgte eine visuelle Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere. Es wurde auf eine ungestörte Futteraufnahme und Anzeichen von Schmerzen geachtet. Regelmäßige Blutentnahmen dienten zur Kontrolle des Gesundheitszustandes der Tiere. Vom

Tag der Operation an konnten sich die Schafe frei bewegen. Nach vier Tagen wurde das Fentanylpflaster und nach zehn Tagen die Fäden entfernt. Danach erfolgte die Verbringung in die Freilandhaltung.

3.3 Tötung und Sektion der Tiere

Zwölf Wochen nach der Operation erfolgte die schmerzfreie Euthanasie der Schafe. Das fixierte Tier bekam einen Venenverweilkatheter gelegt. Anschließend wurden intravenös 2,5g Thiopental-Natrium (Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz) und in der daraus folgenden tiefen Narkose 100 ml 14,9%ige Kaliumchlorid-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) infundiert. Dieses führt zum Herzstillstand, welcher durch Auskultation festgestellt wurde. Beide Hintergliedmaßen wurden abgetrennt und die Haut entfernt. Es folgte die Freipräparation des distalen Os femoris von Muskeln, Kniegelenkscapsel, -bändern und Menisken, um die Kondylen frei zu legen.

3.4 Aufarbeitung der Präparate

3.4.1 Sägen

Zum Sägen der Knochenpräparate wurde ein wassergekühltes Makro-Trennschleifsystem (Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit einem 1 mm dicken Sägeband verwendet. Um den Oberschenkelknochen in der Einspannvorrichtung zu befestigen, wurde der Schaft im distalen Drittel mit Hilfe einer Handsäge durchtrennt. Der Leerdefekt und der gefüllte Defekt wurden senkrecht zum Sägeband ausgerichtet und dann in der Medianen, sowie medial und lateral des Defektes parallel zur Bohrrichtung durchgesägt. Es wurde darauf geachtet, dass mindestens 5 mm gesundes Gewebe neben den Defekten stehen bleibt, um auch diesen Bereich auswerten zu können. Beide Kondylen wurden in vier Scheiben zersägt. Danach folgten zwei Sägevorgänge kranial und kaudal des Defektes, jeweils im 90°-Winkel zu den sechs vorherigen Sägevorgängen. So entstanden vier etwa 4 mm dicke viertelkreisförmige Scheiben (Abb. 8), die in entsprechend beschriftete Uni-Kassetten (Tissue Tek, USA) eingelegt wurden.

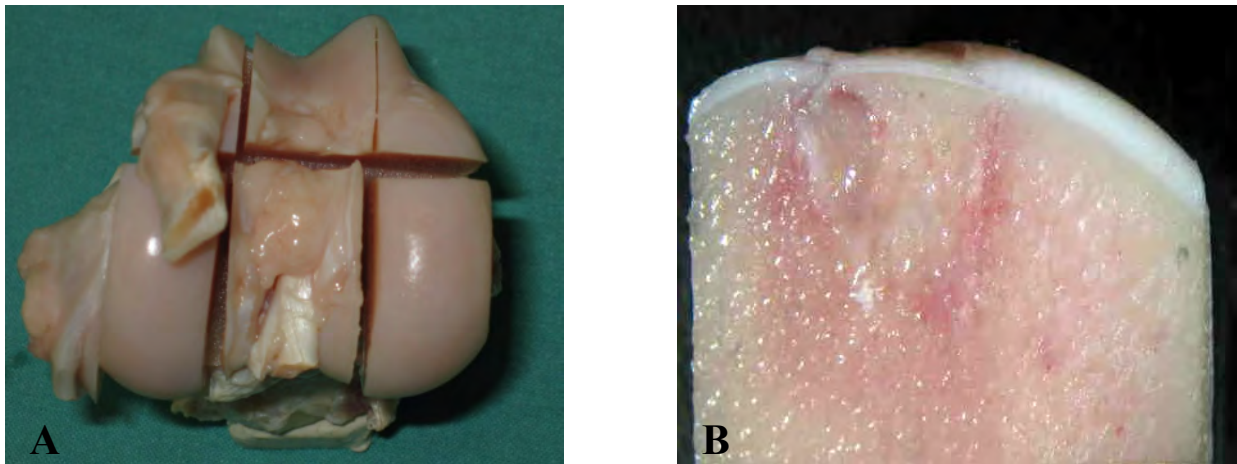


Abb. 8: *A: in Scheiben zersägter rechter, nativer Femurkondylus; B: Schnittfläche eines OCT-Defektes*

3.4.2 Fixation

Um einer Autolyse, und dem Befall mit Schimmel- und Fäulnisbakterien vorzubeugen, wurden die Präparate sofort nach dem Sägen für fünf Tage in einer Fixierlösung fixiert. Diese Lösung besteht aus 36%igem Formaldehyd, 100%igem Äthylalkohol, Barbitol- Natrium-Puffer (pH 7,4/ 0,1 molar) und Glukose. Zusätzlich unterstützte die Fixation die Strukturfestigkeit, die das Gewebe vor mechanischen Einflüssen während der histologischen Weiterbearbeitung schützen soll. Zur optimalen Infiltration der Präparate wurden diese auf den Schüttler (IKA Labortechnik HS501 Digital, Staufen) platziert, um sicherzustellen, dass sich die Fixierlösung gleichmäßig verteilt.

3.5 Behandlung der Präparate für die Immunhistochemie

3.5.1 Entkalken mit EDTA-Lösung

Nach dem Fixieren wurden die Knochenblöcke ca. dreißig Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, um das Fixiermedium aus dem Gewebe zu entfernen. Zur Entkalkung wurden die Präparate für zwei Monate in eine EDTA-Lösung (EDTA-Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) eingelegt und bei wöchentlichem Wechsel der Lösung im Brutschrank bei 37 °C entkalkt. Anschließend folgte wieder eine Spülung mit fließendem Leitungswasser. Zur Dehydrierung wurden die Proben für drei Tage in einen Entwässerungsautomaten (Hi-Tec Gewebeeinbettautomat „1500“ Typ DDm-P800, Busek)

mit aufsteigender (70%, 80%, 96%, 100%igem Alkohol) Alkoholreihe gegeben, anschließend zur Entfettung in Xylol.

3.5.2 Einbetten in Paraplast

Zur Erreichung einer geeigneten Schnitthärte wurden die Präparate mit flüssigem, 60°C heißen Paraplast (Tyco Healthcare, Mansfield, USA) durchtränkt. Paraplast ist eine Verbindung aus gereinigtem Paraffin und Plastikpolymeren mit geregelter Molekulargewicht. Die Präparate wurden zur Einbettung in Uni-Kassetten mit flüssigem Paraplast überführt und ausgerichtet. Die Schnittfläche des Präparats wurde auf dem Boden der Metallförmchen parallel zueinander angeordnet, damit sie sich nach Erstarren des Paraplasts möglichst nah an der Oberfläche des fertigen Blockes befindet. Die Aushärtung erfolgte auf einer Gefrierplatte (Leica, EG 1130, Nussloch, Deutschland) bei -7°C.

3.5.3 Anfertigen der Schnitte

Die gekühlten Paraplastblöcke wurden mit einem Rotations-Mikrotom (Leica RM 2035, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) mit Einmal-Mikrotommesser (Feather, Japan) in eine Dicke von 4 µm geschnitten. Diese Gewebeschnitte wurden im erwärmten Wasserbad geglättet. Hier schwimmen die Paraplastschnitte an der Wasseroberfläche und werden durch die Oberflächenspannung des Wassers plan „gezogen“. Die Schnitte werden auf einen Objektträger (Superior Marienfeld, Deutschland) aufgezogen und danach für drei Tage im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

3.5.4 Färben der Schnitte

(I) Die Safranin-Orange Färbung wurde für die Beurteilung der Präparate herangezogen. Diese Färbung stellt das Gewebe kontrastreich in verschiedenen Rottönen dar. Diese Färbung dient der Darstellung von Knorpelgewebe und deren Unterscheidung von Knochengewebe. Der Farbstoff dringt gut in die Knorpelgrundsubstanz ein und bindet an saure Gruppen, so dass der Knorpel sich intensiv rot darstellt, während der Knochen nur blass rot erscheint.

(II) Die tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) wird vor allem in den Osteoklasten gebildet. TRAP weist eine besondere Stabilität auf und wird selbst durch mehrtägige Formalinfixierung, durch konventionelle Paraffineinbettung und auch durch mehrtägige Entkalkung kaum inaktiviert. Die enzymhistochemische Färbung zum Nachweis der TRAP-

Aktivität erfolgt mit Hilfe der Azofarbstoff-Kupplungsmethode. Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden für zehn Minuten mit TRAP-Puffer inkubiert. Danach wurden die Präparate für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C in die TRAP-Färbelösung gestellt. Diese enthält das Substrat und Hilfsreagenzien. Als Substrat wird Naphthol AS-Mix Phosphat (Sigma, Steinheim, Deutschland) für den Nachweis verwendet. Das Substrat wird durch TRAP enzymatisch hydrolysiert. Das freigesetzte Naphthol AS-Mix Phosphat reagiert mit dem Fast Red Violett LB Salt (Sigma, Steinheim, Deutschland) in einer Kupplungsreaktion. Es entsteht ein wasserunlöslicher Azofarbstoff, der die Zellen, die das Enzym besitzen, weinrot färbt. Die Präparate wurden in Aqua dest. gespült, mit Methylgrün (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt und mit Glyceringelatine (Kaisers, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

3.5.5 Immunhistologisches Färben der Schnitte

Immunhistologische Verfahren erlauben es, mittels Antikörper-Antigen-Reaktionen einzelne Antigene hochspezifisch an ihrem jeweiligen Aufenthaltsort in Gewebeschnitten nachzuweisen.

Es wurden ABC-Elite-Kits (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) verwendet. Diese enthielten equines Normalserum, einen biotinylierten Sekundärantikörper, sowie den ABC-Komplex in Tropfflaschen.

Herstellung der Gebrauchslösung aus dem Kit:

- Normalserum (Elite ABC Kit PK 6200): 1 Tr. Normalserum auf 5 ml PBS
- Sekundärer Antikörper (Elite ABC Kit PK 6200): 2 Tr. Normalserum und biotinylierter AK auf 5 ml PBS
- AB-Komplex (AP Standard Kit AK 5000): 1 Tr. Reagenz A und B auf 5 ml PBS

Wenn im Folgenden von Normalserum, Primärantikörper, Sekundärantikörper und AB-Komplex gesprochen wird, handelt es sich um diese Ansätze.

Bezeichnung	Herkunft	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
Anti-Kollagen Typ I	Kaninchen	BioLogo, Kronshagen, Deutschland	1:400	Hyaluronidase
Anti-Kollagen Typ II	Kaninchen	BioLogo, Kronshagen, Deutschland	1:100	Hyaluronidase+Pepsin
Anti-alpha- smooth muscle actin	Maus	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark	1:100	Keine

Tab. 1: Verwendete Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen

Die Paraplastschnitte wurden zunächst mit Xylol (ca. 2x 10min) entparaffiniert und dann mit einer absteigenden Alkoholreihe (in 100%igem Alkohol 2x 2min, dann jeweils 2min in 96%, 80% und 70%igem Alkohol) rehydriert. Die Schnitte wurden auf ihren Objektträgern mit einem hydrophoben Spezialstift (PAP PEN, Birmingham, USA) umrandet, um ein Verlaufen der Reagenzien und somit das Austrocknen der Präparate zu verhindern. Es folgte eine Spülung (2x 5min) in PBS (Waldeck GmbH & Co Kg, Münster). Die Schnitte wurden abgeklopft und waagrecht in eine feuchte Kammer gegeben. Zur Erzielung einer guten Gewebezugänglichkeit wurden die Schnitte zum Nachweis von Kollagen I und II zunächst vier Stunden bei 37°C mit Hyaluronidase (Sigma, Steinheim, Deutschland) vorbehandelt. Danach erfolgte zusätzlich bei Kollagen II eine Pepsinvorbehandlung (Sigma, Steinheim, Deutschland) für 30 min. bei 37°C. Es folgte für die Kollagen I und II Präparate ein 10-minütiges Spülen mit Leitungswasser und dann für alle Präparate ein Spülen in PBS (2x 5min). Um unspezifische Bindungen zwischen hydrophoben Gewebsproteinen und dem Antikörper zu verhindern wurden diese Bindungsstellen durch Inkubation mit Normalserum für 20 min. bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Abtropfen des Serumüberstandes wurde sofort mit dem Auftragen geeigneter Primärantikörper (Tab. 1) zur immunhistochemischen Markierung begonnen. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei +4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach dem Abkippen des Primärantikörpers in PBS (2x

5min) gespült. Nach erneutem Abklopfen wurden die Präparate mit ca. 200 µl verdünnten Sekundäntikörper vollständig bedeckt und wieder für 30 min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Spülen in PBS (2x 5min). Jedem Schnitt wurde der AB-Komplex, der zum Nachweis verwendet wird, aufpipettiert und bei Raumtemperatur 50 min. inkubiert. Dieses Reagenz muss mindestens 30 min. vor der Anwendung hergestellt werden, damit der AB-Komplex reaktionsfähig wird. Nach dem letzten Spülschritt in PBS (2x 5min) erfolgte die Inkubation mit dem Chromogenpuffer (2x 5min). Unter mikroskopischer Kontrolle der Farbreaktion wurden die Proben mit dem Entwickler (Alkaline Phosphatase Substrate Kit 1, Burlingame, USA) inkubiert und die Reaktion mit Aqua dest. abgestoppt. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit verdünntem Hämatoxylin. Die Schnitte wurden solange mit Leitungswasser gespült, bis keine Farbschlieren mehr aufstiegen und dann mit Glyceringelatine (Kaisers, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Zur Bestimmung einer unspezifischen Hintergrundfärbung aufgrund unspezifischer Bindungsstellen wurden in jeder Versuchsreihe Negativkontrollen mit PBS statt mit Primäntikörper inkubiert bei sonst identischen Arbeitsschritten.

Die α -SMA Färbung wird wie die Kollagen I- und II-Färbung angefertigt, jedoch ohne Vorbehandlung.

3.6 Auswertung der Präparate

3.6.1 Scoren der Defekte

Der von Frenkel und Mitarbeiter (Frenkel S et al., 2005) entwickelte Score wurde übernommen und wird im Weiteren als Score A bezeichnet. Dies ist ein modifizierter Score von O'Driscoll zur Beurteilung des Regeneratgewebes, indem der prozentuale Anteil des hyalinen Knorpels und die Anfärbbarkeit der Gewebematrix mit Safranin-Orange dargestellt wird. In weiteren Schritten werden die strukturellen Eigenschaften, Degenerationszeichen des Regenerats und die Rekonstruktion des subchondralen Knochens begutachtet. Der Score B wurde als Ergänzung zum Score A im Rahmen dieses Projektes entwickelt, da der Score nach O'Driscoll weder die Auffüllung im Defektbereich noch die laterale und basale knöcherne Integration mit einschließt. Weitere Erweiterungen bestanden in der Beurteilung von Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen. Anhand der Safranin-Orange und Kollagen II gefärbten Präparate wurden beide Scores ausgewertet. Für jedes Kriterium wurden Punkte

vergeben. Die Punktezuordnungen sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Für eine endgültige Einschätzung werden die erzielten Punktwerte in den einzelnen Beurteilungskriterien addiert. Es ergibt sich ein mögliches Punktespektrum von 39 Punkten im Falle eines perfekten Regenerats bis 0 Punkte bei einer fehlgeschlagenen Reparatur mit schwerster Schädigung der angrenzenden Knorpelanteile.

Score A

Kategorie		Punkte	
1. Prozentualer Anteil hyalinen Knorpels	80% - 100%	8	
	60% - 80%	6	
	40% - 60%	4	
	20% - 40%	2	
	0 % - 20%	0	
2. Struktur	A. Oberflächenbeschaffenheit:	Glatt und intakt	2
		Fissuren	1
		Risse, Fibrillation	0
	B. Strukturelle Integrität:	Normal	2
		Leichte Risse, Zysten	1
		Kaum integriert	0
	C: Knorpeldicke:	100% des umliegenden Knorpels	2
		50% - 100% des normalen Knorpels oder dicker als normal	1
		0 – 50% normalen Knorpels	0
	D: Verbindung zum umliegenden Knorpel	Verbunden auf beiden Seiten	2
		Verbunden auf einer Seite, teilweise auf beiden Seiten	1
		Unverbunden	0
	3. Degenerative zelluläre Veränderungen	Normale Zellularität, keine Cluster	2
Leichte Hypozellularität, < 25% Chondrozytencluster		1	
Moderate Hypozellularität, Hyperzellularität, > 25% Cluster		0	
4. Degenerative Veränderungen im umliegenden Knorpel	Normale Zellularität, keine Cluster, normale Anfärbung	3	
	Normale Zellularität, wenig Cluster, moderate Anfärbung	2	
	Milde oder moderate Hypozellularität, leichte Anfärbung	1	
	Schwere Hypozellularität, viele Cluster, kaum Anfärbung	0	

5. Rekonstruktion der subchondralen Lamelle	Vollständige Rekonstruktion	2
	Mehr als 50% Rekonstruktion	1
	50% oder weniger Rekonstruktion	0
6. Verbindung zwischen regeneriertem Knorpel und neuem subchondralen Knochen	Vollständig und ununterbrochen	2
	< 100% aber mehr als > 50%	1
	< 50%	0
7. Safranin-Orange Färbung	Mehr als 80% homogene positive Färbung	2
	40% - 80% homogene positive Färbung	1
	Weniger als 40% homogene positive Färbung	0
Summe		27

Tab. 2: modifizierter Score nach O'Driscoll; Score zur Beurteilung der Knorpel-Knochendefekte und des angrenzenden Gewebes

Score B

Kategorie		Punkte
8. Auffüllung im Defektbereich	91% - 110%	4
	76% - 90%	3
	51% - 75%	2
	26% - 50%	1
	< 25%	0
9. Laterale knöcherner Integration	Verbunden auf beiden Seiten	2
	Verbunden auf einer Seite, teilweise auf beiden Seiten	1
	Unverbunden	0
10. Basale Integration	91% - 100%	3
	70% - 90%	2
	50% - 70%	1
	< 50%	0
11. Entzündungsreaktion	Keine	2
	Gering	1
	Stark	0
12. Fremdkörperreaktion	Nein	1
	Ja	0
Summe		12
Summe (Score A + Score B)		39

Tab. 3: Eigens entwickelter erweiterter Score; Score zur Beurteilung der Knorpel-Knochendefekte

3.6.2 Mikroskopische Auswertung der Gefäßdarstellung

Die Präparate wurden an einem konventionellen Mikroskop (Zeiss, Eiching, Deutschland) bei 100facher Vergrößerung untersucht. Die Auswertung erfolgte, indem der gesamte Defektbereich mäanderförmig in einer definierten Region of Interest (ROI) durchgemustert und die angefärbten Gefäße ausgezählt wurden. Die ROI des Leerdefektes entspricht einer Kantenlänge von 8,3 mm x 10 mm. Der gefüllte Defekt und die native Kondyle haben eine ROI mit einer Kantenlänge von 7,3 mm x 10 mm. Die obere Kante des ROI-Rechtecks wurde bis auf das Niveau der Gelenkknorpeloberfläche aufgezo- gen. In den angrenzenden Knochenmarksräumen wurden die Gefäße gesondert erfasst (Abb. 9). Die Schnitte wurden zwei Mal vom gleichen Untersucher ausgezählt. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden die Mittelwerte gebildet, welche dann in die Auswertung eingingen. Der Quotient wurde aus der Anzahl der ermittelten Gefäße und dem Bindegewebsanteil des Defektes gebildet, welches die Anzahl der Gefäße/10mm² Bindegewebe ergab. Die Gefäßzahlen aller Defekte konnten jetzt miteinander verglichen werden.

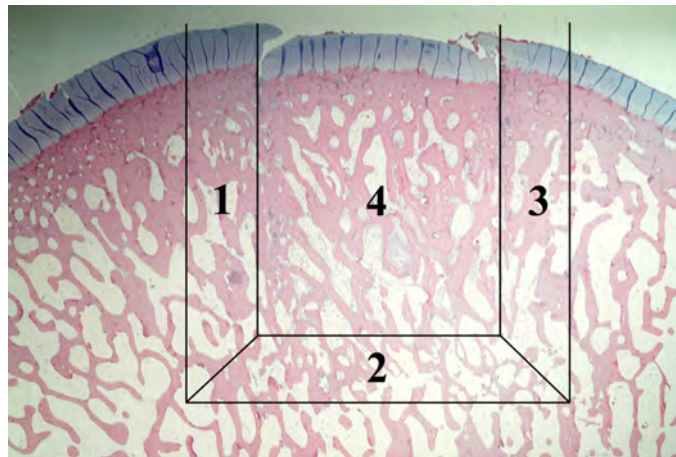


Abb. 9: Schematische Zeichnung der ROI; ROI 1:kranial; ROI 2:basal; ROI 3:kaudal; ROI 4:gebohrter Defekt

3.6.3 Mikroskopische Auswertung der Osteoklasten

Die histologische Auswertung der Osteoklasten erfolgte ebenfalls bei 100facher Vergrößerung in der oben beschriebenen ROI. Als Osteoklasten wurden TRAP-positive Zellen mit mindestens zwei Zellkernen und Knochenkontakt gewertet. Der gesamte Defektbereich wurde betrachtet und die angefärbten Osteoklasten im knöchernen Teil des Defektes ausgezählt. Auch hier wurde der im knöchernen Teil des Defektes angrenzende Bereich getrennt voneinander erfasst (Abb. 9).

3.6.4 Quantitative Auswertung

Durch eine computergestützte Auswertung besteht die Möglichkeit, die immunhistochemischen Knorpel-Knochen Schnitte zu analysieren und zu quantifizieren. Die Kollagen I und II gefärbten Präparate wurden vor der quantitativen Histomorphometrie digitalisiert. Dazu wurde eine hochauflösende Spiegelreflex Digitalkamera (Nikon D70, Tokyo, Japan) und eine Leuchtquelle (Leica MZ6, Nussloch, Deutschland) verwendet. Für die spätere Kalibrierung des digitalen Bildes wurde ein Lineal mit Millimeter-Skalierung neben das Präparat gelegt und mitfotografiert. In der semiautomatischen rechnergesteuerten Bildanalyse erfolgte die morphometrische Auswertung, bestehend aus PC mit Monitor und Morphometrie-Software (KS 400, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching). Für die spezielle Anwendung der Auswertung der immunhistochemischen Präparate wurde von Devakar Epari (Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin) ein Makroprogramm entwickelt. Dieses berechnet in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Gewebe die unterschiedlichen Flächen. Vor der Objektmessung wurden die Bildkontraste verstärkt, um eine Bildoptimierung zu erzielen. Mit Hilfe der im Bild befindlichen Skalierung und der manuellen Distanzeingabe wurden die Präparate durch das Programm auf eine einheitliche Maßeinheit angeglichen und kalibriert. Durch die Kalibrierung wurden alle Flächen vom Programm in mm^2 berechnet. Die Berechnung der Fläche von Kollagen I, Kollagen II und der unaufgefüllten Fläche erfolgte in der vorab definierten Region of Interest. Die obere Kante des ROI-Rechtecks wurde bis auf das Niveau der Gelenkknorpeloberfläche aufgezogen (Abb. 10). Mit dem Cursor wurde der nicht aufgefüllte Bereich umfahren und der dabei ermittelte Flächeninhalt abgespeichert (Abb. 11A). Die Scaffoldreste der Gruppen 3 und 4 wurden auf die gleiche Weise umfahren (Abb. 11C). Die farbmarkierten (Kollagen I bzw. II) Flächenanteile wurden teils automatisch, teils manuell markiert und gespeichert (Abb. 11B). Waren die Präparate nicht sehr kontrastreich, erfolgte die manuelle Markierung.

Folgende Parameter wurden für den gefüllten Defekt, den Leerdefekt und die native Kondyle bestimmt:

- Gesamtfläche des Defektes [mm^2]
- Nichtfüllung des Defektes in ROI A [mm^2]
- Nichtfüllung des Defektes in ROI B [mm^2]
- Fläche von Kollagen I in der ROI A des Defektes [mm^2]

- Fläche von Kollagen I in der ROI B des Defektes [mm^2]
- Fläche von Kollagen II in der ROI A des Defektes [mm^2]
- Fläche von Kollagen II in der ROI B des Defektes [mm^2]
- Fläche des synthetischen Scaffolds [mm^2]

Die gemessenen Flächen wurden auf die initial vom Programm gemessene Gesamtdefektfläche bezogen, um die einzelnen Defekte miteinander vergleichen zu können. Somit wurden die einzelnen Parameter auch in Prozent angegeben.

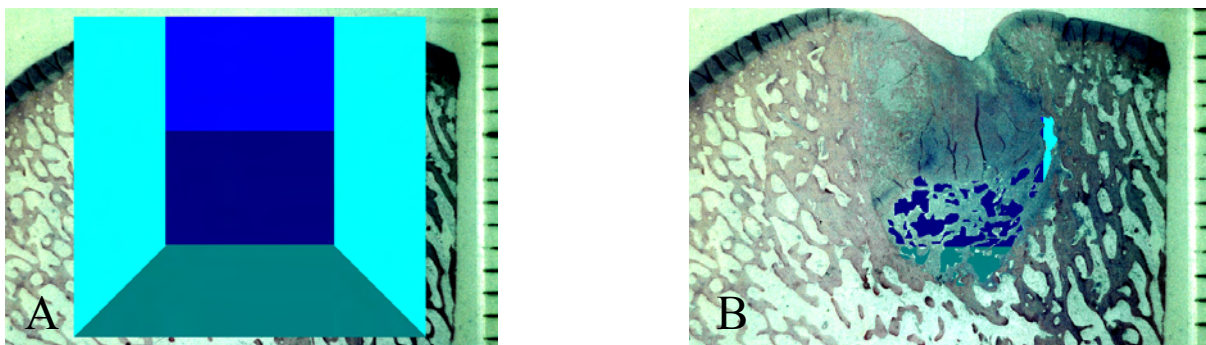


Abb. 10: A= Darstellung der Region of Interest in der Bildanalyse; B= Darstellung der Scaffoldreste in der jeweiligen ROI

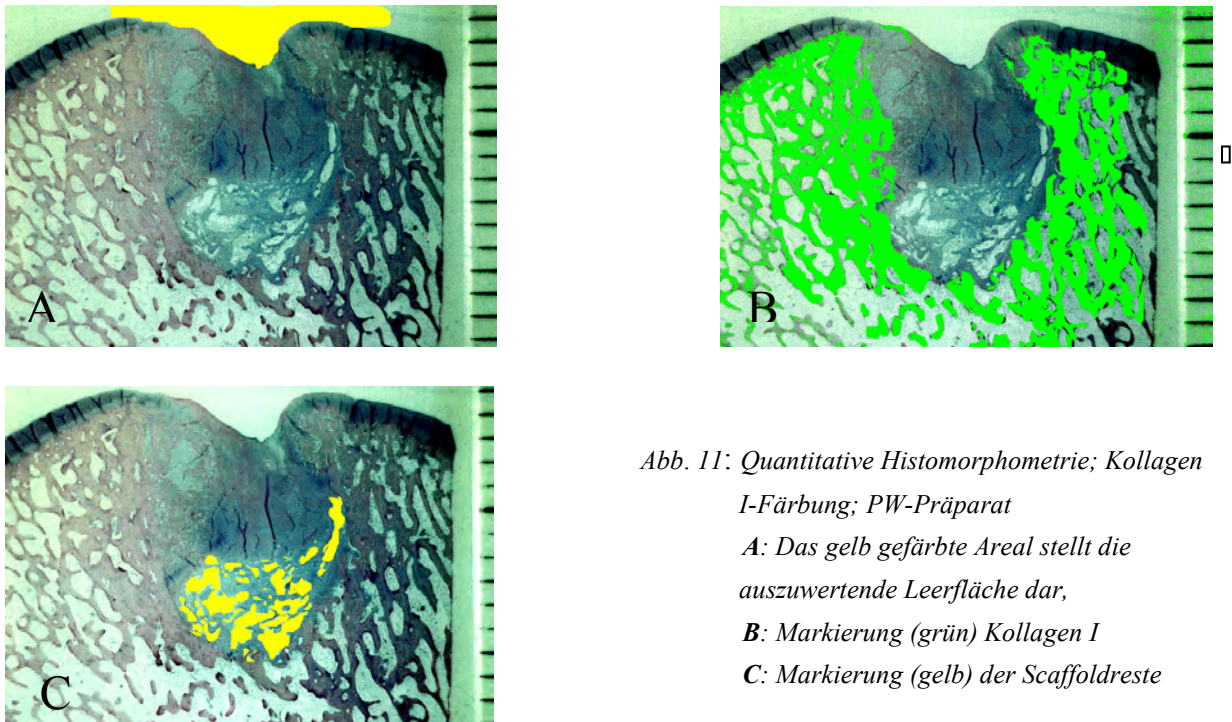


Abb. 11: Quantitative Histomorphometrie; Kollagen I-Färbung; PW-Präparat

A: Das gelb gefärbte Areal stellt die auszuwertende Leerfläche dar,

B: Markierung (grün) Kollagen I

C: Markierung (gelb) der Scaffoldreste

3.6.5 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS. Die histomorphometrischen Daten wurden zur grafischen Darstellung in das Datenverarbeitungsprogramm SPSS für Windows 12.0 (SPSS Deutschland GmbH, München) übertragen. Bei kleinen Stichproben ist es schwierig, eine allgemeingültige Aussage zu treffen und es kann nicht von einer Gaußschen Normalverteilung der Werte ausgegangen werden. Zur Auswertung wurde daher eine deskriptive Form der statistischen Analysen mit Berechnung der Minimum-, Maximumwerte und der Perzentile 25, 50 und 75 durchgeführt. Für nicht normalverteilte Stichproben kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Bei diesem nicht-parametrischen Test handelt es sich um eine Erweiterung von Mann und Whitney beim Vorliegen von mehr als zwei unabhängigen Stichproben (vier verschiedene Therapiemethoden). Bei diesem Test werden alle originalen Daten zusammengewürfelt, der Größe nach geordnet und dann in Ränge verwandelt. Die Rangreihenliste wird anschließend nach der Probenzugehörigkeit aufgeteilt und für jede Stichprobe die Rangsumme gebildet. Zum Vergleich verbundener Stichproben (Leerdefekt, Füllung und native Kondyle eines Schafes) bei mehr als zwei Vergleichswerten wurde der Friedman-Test eingesetzt. Die angegebenen p-Werte zeigen die signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Das Signifikanzniveau war mit $p < 0,05$ festgelegt. Wurde bei dem Kruskal-Wallis-Test eine Signifikanz beobachtet, wurde der Mann Whitney U-Test durchgeführt, um eindeutig zu bestimmen, zwischen welchen Gruppen der signifikante Unterschied bestand. Als Anschluss des Friedman-Testes wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt.