

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Als Implantatmaterial wurden Granulate der Firma US-Biomaterials, Alachua, Florida, USA verwandt. Folgende Versuchschargen wurden untersucht: RD-011:29 enthielt Partikel aus Bioglass®45s5, RD-011:28 enthielt Partikel aus Bioglass®52s und RD-011:27 enthielt Partikel aus Bioglass®55s. Es handelt sich um drei unterschiedliche Glas-Kompositionen, deren genaue chemische Zusammensetzung im Anhang aufgeführt ist (Tabelle 2.1.1). Im wesentlichen unterscheiden sie sich bezüglich ihres Gehalts an SiO<sub>2</sub>, nach welchem sie auch benannt sind. Bioglass®45s5 enthält 45 %, Bioglass®52s 52 % und Bioglass®55s 55 %. Nähere Hinweise zum genauen Herstellungsprozess sind bereits beschrieben worden, und der Verweis hierauf soll genügen [8]. Kurz zusammengefasst wurde Rohglas der entsprechenden Kompositionen in Kugelmøhlen zerkleinert und entstehendes Granulat so gesiebt, dass die uns zur Verfügung stehenden Partikel im langen Durchmesser eine Größenordnung zwischen 90 µm und 710 µm aufwiesen. Eigene Messungen an 162 Partikeln gemäß der American Society for Testing and Materials [16] ergaben im Mittel einen langen Durchmesser von 507 µm mit einer Standardabweichung von 180 µm. Das Verhältnis von langem zu kurzem Durchmesser (aspect ratio) betrug im Mittel 1,7. Die Partikel sind granulärer Art, in ihrer Struktur irregulär gewinkelt. Vor der Implantation wurden die Materialien für 30 Minuten bei 150°C hitzesterilisiert.

### **2.2 Versuchstiere und Tierhaltung**

Als Versuchstiere wurden weibliche Chinchilla-Kaninchen mit einem präoperativen Gewicht zwischen 3243 g und 5150 g verwandt. Die Kaninchen wurden zu zweit in Käfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten, i.e. mit einem 12 Stunden Tag- und Nachtrhythmus, bei einer Raumtemperatur von 17-19°C und bei 50 % Luftfeuchtigkeit. Die Ernährung erfolgte mit pelletiertem Trockenfutter Altromin® Standard (Altromin Tier-Labor Service GmbH, LageLippe, Deutschland) und Wasser ad libitum. Insgesamt wurden 54 Kaninchen, 6 pro Material und Liegezeit, untersucht. Der Tierversuch wurde 1997 durch die Behörde der Berliner Regierung mit der Genehmigungs-Nummer G 0275/97 genehmigt.

## **2.3 Operationsverfahren**

### **2.3.1 Implantation:**

Die Versuchstiere erhielten vor dem Eingriff eine Vollnarkose. Dazu wurde intramuskulär ein Cocktail aus Rompun<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Ketanest<sup>®</sup> (Parke-Davis, Berlin, Deutschland) verabreicht. Rompun<sup>®</sup> wurde mit 15 mg/kg Körpergewicht, Ketanest<sup>®</sup> mit 65mg/kg dosiert. Die Tiere erhielten desweiteren eine Infektionsprophylaxe durch eine intramuskuläre Injektion von 7 mg/kg Körpergewicht Gentamicin 80<sup>®</sup> (B.R.A.H.M.S. GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Bepanthen<sup>®</sup>-Augensalbe (Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) verhinderte ein Austrocknen der Augen. Nach Rasur des OP-Feldes wurde das übrige Fell durch Verbandsmull abgedeckt. Die Hautdesinfektion des OP-Feldes erfolgte mittels Braunoderm<sup>®</sup> (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Nach steriler Abdeckung des OP-Feldes 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 zugänglich gemacht, und das zukünftige Implantatlager durch eine von ventral nach dorsal gerichtete Bohrung geschaffen (Abb. 2.3.1). Für den Bohrvorgang wurde ein diamantierter Hohlzylinderbohrer mit einem äußeren Durchmesser von 4 mm benutzt. Um die Traumatisierung des Gewebes möglichst gering zu halten, wurde mit niedriger Drehzahl und unter Kühlung des Bohrloches mit physiologischer Kochsalzlösung gearbeitet. Von dem zu implantierenden Material wurden 100 mg in den entstandenen Defekt eingefüllt. Zur Bestimmung der Menge wurde eine selbst hergestellte Messkapsel benutzt, die bis zu dem entsprechenden Teilstrich mit Granulat gefüllt wurde (Abb. 2.3.2). Der durch den Bohrvorgang entstandene Bohrkern wurde bis auf die subchondrale Kortikalis gekürzt, so dass ein Knochendeckel mit Knorpelüberzug für den anschließenden Verschluss des Implantatbettes gegenüber dem Gelenk gewonnen war. Nach Verschluss des Bohrloches (Abb. 2.3.3) wurde die Wunde schichtweise mit Vicryl<sup>®</sup> (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) der Fadenstärke 3-0 verschlossen. Für die Hautnaht wurde Mersilene<sup>®</sup> (Ethikon GmbH) der Fadenstärke 3-0 verwandt. Postoperativ wurden die Wunden lokal antibiotisch mit Nebacetin<sup>®</sup>-Puder behandelt (Yamanouchi Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland) und die Versuchstiere durch eine einmalige intramuskuläre Gabe von 330 mg/kg Körpergewicht Aubikal<sup>®</sup> analgesiert (Atarost, Twistingen, Deutschland).

Alle Kaninchen wurden beidseitig operiert. Pro Versuchsgruppe wurde bei einem Kaninchen zur Kontrolle ein Bohrloch unaufgefüllt belassen. Letztlich standen so pro Material und Liegezeit 11 Proben und eine Kontrolle zur Verfügung. Von jedem Tier wurde nach Explantation eine Probe lichtmikroskopisch untersucht (n=6). Die kontralaterale Seite wurde in einem Fall elektronenmikroskopisch untersucht (n=1), in drei Fällen der Untersuchung mittels In-Situ-Hybridisierung (n=3) zugeführt und in einem Fall in physiologischer Kochsalzlösung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (n=1). Die Kontrolle wurde ebenfalls zur Untersuchung mittels In-Situ-Hybridisierung (ISH) aufgearbeitet.

### **2.3.2 Explantation:**

Nach 7, 28 und 84 Tagen wurden die Versuchstiere wie oben beschrieben narkotisiert. Die Tiere mit Proben, die für die ISH 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 ISH kritischen Ribonukleinsäure-Zeretzern (RNasen) zu bewirken.

Nach erfolgter Perfusion wurde das Kniegelenk in oben beschriebener Weise freigelegt. Die seitlichen Kortikalisschichten der Femurkondylen wurden abgetragen, um eine spätere Diffusion der verwandten Fixiermittel zu erleichtern. Anschließend wurde das Femur proximal des Implantatbettes durchtrennt und die Probe somit asserviert. Bei allen Tieren trat der Tod unter Vollnarkose ein. Versuchstiere, die keiner Perfusion unterzogen wurden, wurden nach Explantation in einer CO<sub>2</sub>-Box getötet.

## **2.4 Aufarbeitung der Proben**

Auf die Aufarbeitung der Proben für die ISH, das Leerloch und die Stickstoffprobe soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

### **2.4.1 Lichtmikroskopie:**

Die Proben für die Lichtmikroskopie wurden in Formaldehyd fixiert, durch Immersion in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Äther-Chloroform entfettet. Schließlich

wurden die Proben über vier weitere Stufen in Methylmetacrylat eingebettet (Tab.2.4.1). Nach mehrtägigem Aushärten des Kunststoffes in einem 38°C warmen Wasserbad wurden die gewonnenen Kunststoffblöcke mit Technovit® (Kutzer & Co., Wehrheim, Deutschland) auf einem Metallhalter montiert. Es wurde dabei versucht, eine möglichst optimale Ausrichtung der Längsachse des Implantatbettes zum Metallhalter, und somit zur späteren Schnittführung zu erreichen. Der Objekthalter wurde in der zugehörigen Innenlochsäge (Modell 1600, Leitz, Wetzlar, Deutschland) so montiert, dass die Schnittfolge möglichst durch das Zentrum des Bohrloches erfolgte. Ziel dieser Justierungen war es, sagittale Schnitte im Zentrum des ehemaligen Implantatgebietes zu erhalten. Von jedem Block wurde eine Schnittfolge von 5 Schnitten angefertigt, je 50 µm dick, die auf Kunststoffobjektträgern (Eigenherstellung) mit Instantbond® (Instantbond, Berlin, Deutschland) montiert wurden. Die gewonnenen Schnitte wurden anschließend unter mikroskopischer Kontrolle auf einem halbautomatischen Poliergerät (Exakt GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit Naßschleifpapier 2000er Körnung poliert. Anschließend wurden je 2 Schnitte nach Giemsa (Tab. 2.4.3) und je 2 Schnitte nach von Kossa/Paragon gefärbt [17]. Die von Kossa/Paragon Färbung wurde entsprechend den von Gross und Strunz entwickelten Modifikationen [18] angewandt (Tab. 2.4.2).

#### **2.4.2 Elektronenmikroskopie:**

Das Implantatbett der für die Elektronenmikroskopie (EM) bestimmten Femora wurde zunächst mit einer diamantierten Trennscheibe eng umschnitten. Die distale Hälfte des verbliebenen Blockes (Abb. 2.4.1) wurde dann geviertelt und randomisiert der Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zugeführt. Die REM-Proben wurden in Glutaraldehyd fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, und schließlich mit Hexamethyldisilazane infiltriert (Tab. 2.4.4). Im Anschluss wurden die Proben luftgetrocknet, entgast, und schließlich auf einem REM-Probenteller mit Leitsilber montiert. Frühestens nach 24 Stunden wurden die Proben mit einem Sputter-Gerät (Modell SC 500, Emscope, USA) im Hochvakuum mit einer Goldschicht bedampft. Neben den aufgearbeiteten Proben wurden zum Vergleich auch nicht implantierte, sterilisierte Partikel für die REM-Untersuchung vorbereitet.

Die TEM-Proben wurden in Glutaraldehyd und Osmiumsäure fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und über fünf Schritte mit Epon infiltriert (Tab. 2.4.5). Danach wurden die Proben in Silikonformen eingebettet und anschließend in einem Exsikkator bei 70°C und 600-800 mbar für 1 bis 3 Tage polymerisiert. Anschließend wurden mit einem Ultramikrotom [Modell Ultracut E, Reichert-Jung (jetzt: 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.

Eine Übersicht und Anleitung für alle verwandten Reagenzien findet sich in Tabelle 2.4.6.

## **2.5 Auswertung**

### **2.5.1 Qualitative Auswertung:**

Zur qualitativen Bewertung wurden die einzelnen Schnitte und Proben 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, der Typisierung und der jeweiligen topographischen Zuordnung Rechnung zu tragen. Das Färbeverhalten und die morphologischen Veränderungen standen bei der Materialantwort im Vordergrund. Besonderes Interesse galt der Kontaktzone zwischen Implantat und Gewebe, dem Interface.

### **2.5.2 Quantitative Auswertung:**

Aus jeder Schnittfolge der LM-Präparate wurde ein Schnitt ausgesucht und vermessen. Dabei wurde jeweils der Schnitt zur Auswertung herangezogen, der möglichst mittig durch das Implantatbett führte. Pro Material und Liegezeit wurden somit 6 Schnitte histomorphometrisch vermessen.

Von jedem Schnitt wurde eine Übersichtsfotographie in 40-facher Vergrößerung angefertigt, die als Orientierung im Schnitt und zur eindeutigen Identifizierung der einzelnen Partikel

diente. Definiert wurde das Implantatbett als ein idealisierter Zylinder, ventral an den Knochendeckel angrenzend und dorsal den letzten Partikel umfassend (Abb. 2.5.1). Die proximalen und distalen Begrenzungen wurden Anhand des Übergangs zwischen Knochendeckel und Bohrlochrand bestimmt. Das so definierte Implantatbett wurde gedrittelt, das mittlere Drittel als Vermessungszone definiert, und morphometrisch untersucht. Die Vermessungszone wurde dann in die Schichten 1 bis 5, sowie die Anliegerschichten A und B unterteilt (Abb. 2.5.1-2). Ausgehend von der photographischen Vergrößerung und dem bekannten maximalen Durchmesser des Implantatbettes (4 mm) wurden die Schichten vom Rand des Implantatgebietes ausgehend jeweils mit  $1/9$  (9 Schichten) des in der Vergrößerung entsprechenden Durchmessers abgetragen.

In den Schichten 1 bis 5 wurden die Veränderungen von Material und Gewebe im Implantatgebiet untersucht, in den Anliegerschichten A und B die Veränderungen der hier gemessenen Knochenfläche. Die vollständige Auflistung der vermessenen Parameter kann Tabelle 2.5.1 entnommen werden.

Nach Einzeichnung der Vermessungszone und der einzelnen Schichten in der Übersichtsfotographie wurden die einzelnen Partikel identifiziert und nummeriert. Partikel zwischen zwei Schichten wurden derjenigen Schicht zugeordnet, in der sich der größere Anteil der Partikelfläche befand. Aus jeder Schicht wurden per Zufall 5 Partikel zur Vermessung ausgesucht. Da im sagittalen Schnitt (Abb. 2.5.1) die Schichten 1 bis 4 zweimal vorkamen, wurden für die Schichten 1 bis 4 jeweils 10 Partikel, für die Schicht 5 jeweils 5 Partikel vermessen. Für die Knochenfläche der Schichten A und B wurden jeweils 2 Werte erhoben. Darüber hinaus gibt es schichtenunabhängige Parameter (maximale Knocheneindringtiefe und die Partikelgesamtanzahl), welche pro vermessenem Schnitt nur einmal erhoben wurden. Je nach Parameter standen also pro Versuchstier ein, zwei, fünf, oder zehn Rohwerte zur weiteren Auswertung zur Verfügung.

Die Messungen wurden mit der modifizierten Software Morph<sup>®</sup> (Systec, Berlin, Deutschland) durchgeführt [19]. Als Hardware-Umgebung diente ein herkömmlicher PC. Ein Matrox<sup>®</sup>Grafik Board (Rauscher GmbH, München, Deutschland) stellte die Verbindung her zu

einer gewöhnlichen Video-Kamera, über die die zu vermessenden Bildausschnitte eingespielt wurden.

Neben der oben beschriebenen computergestützten Morphometrie wurden in einer weiteren Untersuchung mehrkernige Riesenzellen (MNGC) im jeweils vermessenen Schnitt gezählt. Hier wurde das gesamte Implantatbett in die Auszählung mit einbezogen, so dass dem biologischen Reaktionsgefälle sowohl in ventro-dorsaler Achse als auch in proximal-distaler Achse Rechnung getragen werden konnte. Das Bohrloch wurde in die bereits erwähnten Schichten 1 bis 5 und darüber hinaus in ventro-dorsaler Ausrichtung in die Schichten A bis F unterteilt (Abb. 2.5.3). Die Zuordnung und Auszählung der MNGC erfolgte unter Zuhilfenahme eines Deckgläschens mit Rasteraufdruck (Eigenherstellung).

### **2.5.3 Statistische Auswertung:**

Als statistische Einheit wurde ein Versuchstier definiert. Standen bei einem Parameter mehr als ein Rohwert pro Versuchstier zur Verfügung (s.o.), so wurde zunächst aus den Rohwerten der Median gebildet.

*Nullhypothese:* Die nach Material und Liegezeit geordneten Gruppen unterscheiden sich nicht bezüglich der untersuchten Parameter.

*Alternativhypothese:* Die nach Material und Liegezeit geordneten Gruppen unterscheiden sich bezüglich der untersuchten Parameter.

*Signifikanzniveau:*  $\alpha = 0,05$ .

*Testwahl:* Da es sich um kleine Stichproben handelt, die bezüglich der meisten Parameter nicht normalverteilt zu sein scheinen, bieten sich verteilungsfreie Tests an. Zum Vergleich von mehreren unabhängigen Variablen wurde zunächst global mit dem H-Test von Kruskal & Wallis getestet. Bei signifikanten Unterschieden wurde dann mittels des U-Tests von Mann-Whitney weiter untersucht, zwischen welchen Paaren dieser Unterschied besteht.

Bei abhängigen Variablen wurde analog verfahren. Hier wurde zunächst global mit der Rangvarianzanalyse von Friedmann getestet, einzelne Paare bei Bedarf mit dem Vorzeichenrangtest von Wilcoxon.

*Testanwendung und Bewertung:* Die Auswertung erfolgte mit dem Software Programm SPSS® 8.0 (SPSS inc., Chicago, USA). Bei Unterschreitung des jeweiligen kritischen Wertes für  $\alpha = 0,05$  wurde die jeweilige Nullhypothese abgelehnt. Ferner wurden Unterschreitungen des jeweiligen kritischen Wertes für ein  $\alpha < 0,10$  als Trend gewertet.