

hahn, 1994) entspricht dies näherungsweise einer Hyaluronsäure-Konzentration von 0,1 mg/ml in unseren 5% Synovialflüssigkeit-Assays.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Geräte**

- Sicherheitswerkbank HeraSafe Typ HS 15 (Heraeus Instruments)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator HeraCell (Heraeus Instruments)
- Wasserbad Typ 1013 (Gesellschaft für Labortechnik (GFL))
- Mikroskop CK 40 F 200 mit Kamera SC 35 Typ 12 (Olympus Optical)
- Mikroskop (Olympus CK40) mit Digitalkamera (Camedia 2020Z)
- Neubauer-Zählkammer (Merck)
- Pipettierhilfe (Brand)
- Vortexgerät VF2 (IKA-Labortechnik)
- Zentrifuge 5416 mit Ausschwingrotor Typ 16A4-44 (Eppendorf)
- Mikrotom (Leica)

#### **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

- 0,2 mm gebrauchsfertige Filtereinheit (Schleicher und Schuell)
- 1, 5, 10 und 25 ml serologische Pipetten aus Polystyren (Becton Dickinson Labware)
- Silikonpipetten (Becton Dickinson Labware)
- 16 G, 18 G, 20 G Kanülen (Braun Melsungen)
- 5, 10 und 20 ml Spritzen (Braun Melsungen)
- 2 ml Kryo-Gefäße (Greiner Labortechnik)
- 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- Petrischalen (Greiner Labortechnik)
- 25 und 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Nalge Nunc International)

- 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Becton Dickinson Labware)
- 15 und 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nalge Nunc International)
- 48er Wellplatten (Becton Dickinson Labware)
- Tissue-Tek-Einbettsschalen (Miles)
- OCT (Sakura)

### **2.1.3 Lösungen und Reagenzien**

- PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) (Biochrom)
- Percoll (ρ = 1,077 g/ml) (Biochrom)
- Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (Biochrom)
- Fötale Kälberserum GIBCO BRL (Life Technologies)
- HEPES-Puffer (Biochrom)
- L-Glutamin (Biochrom)
- Penicillin-Streptomycin (Biochrom)
- Trypsin/EDTA-Lösung (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) (Biochrom)
- IST+1 (10 mg/ml bovines Insulin, 5 mg/ml Transferrin, 5 µg/l Selenit, 4,7 µg/ml Linolsäure, 0,5mg/ml BSA (Sigma)
- L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma)
- L-Prolin (Sigma)
- Natriumpyruvat (Sigma)
- Dexamethason (Sigma)
- Dimethylsulfoxid (Sigma)
- 0,4 % Trypanblau (Sigma)
- Transforming-Growth-Factor-β1 (R&D Systems)
- Hylartil Hyaluronsäure (Pharmacia & Upjohn)
- Ostenil Hyaluronsäure (Chemedica)
- Ethisorb Tamponade Steril (Ethicon)

#### **2.1.4 Materialien und Reagenzien für die Färbungen**

- Feuchtkammer
- AEC-Substrat (DAKO)
- Aceton, Methanol, Ethanol absolut p.A. (JT Baker)
- Aquatex (Merck)
- Bovines Serum Albumin (BSA) (Jackson Immuno Research)
- Hämatoxylin nach Mayer (Sigma)
- Peroxidase-Inhibitor (enthält H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Natriumazid) (DAKO)
- Polymer-Konjugat (DAKO)
- Ziegen-Normalserum (DAKO)
- Monoklonale Antikörper: Kollagen Typ I und II (1:100 in 2% BSA/Tris) (DAKO) (Rabbit Anti-Human und Anti-Bovine)
- Alcianblau 8GS (Roth)
- Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Sigma)

#### **2.1.5 Software**

- Adobe Photoshop 4.0®

### **2.2 Gewinnung equiner Knochenmarks-Aspirate**

Die Knochenmarks-Aspirate wurden aseptisch aus der Tibia von zwei 18 Monate alten Pferden (Haflinger) gewonnen. Die Knochenmarkspunktionen wurden am Forschungszentrum für Medizin- und Biotechnologie in Bad Langensalza von einem Veterinär vorgenommen. Dazu wurden die Pferde mit 0,08 mg/kg KG Romifidin-Hydrochlorid sediert. Die Punktionsstellen wurden rasiert, aseptisch vorbereitet und mit 20 ml 2% Mepivacaine-Hydrochlorid infiltriert. Es wurden jeweils 5 ml Knochenmark mittels Knochenmarkspunktionsnadeln in 20 ml Spritzen aspiriert. Die Spritzen enthielten jeweils 25000 Units Heparin-Natrium.

Für die Versuche mit hochdichten 3D-Kulturen wurde Knochenmarks-Aspirat des einen Pferdes, für die Versuche mit Vlies-Kulturen Knochenmarks-Aspirat des anderen Pferdes verwendet.

### **2.3 Isolierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) aus equinen Knochenmarks-Punktaten**

Die zur Gewinnung equiner MSC gewählte Isolierungsmethode stellt eine Modifikation der Methode dar, die von Haynesworth zur Gewinnung humaner MSC aus Knochenmarksbiopsien und Knochenmarkspunktaten entwickelt wurde (Haynesworth et al. 1992b). Der wesentliche Isolations-schritt ist ein Percollgradient definierter Dichte, der es ermöglicht die Thrombozytenfraktion geringerer Dichte, die auch die MSC enthält, von den meisten anderen Blutzellen abzutrennen.

Folgendes Protokoll wurde zur Isolierung equiner MSC angewendet:

- maximal 3 ml Knochenmarkspunktat mit 20 ml PBS mischen.
- Zentrifugation: 310 g, 15 Minuten, Raumtemperatur.
- Überstand mit Fettschicht bis auf 5 ml verwerfen.
- Pellet in 10 ml PBS resuspendieren.
- Zentrifugation: 310 g, 10 Minuten, Raumtemperatur.
- Pellet in 20 ml Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) (mit 10 % FBS, 10 ml HEPES, 4 mM/Liter L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) resuspendieren.
- mit je max. 5 ml Suspension verwirbelungsfrei einen 20 ml Percoll-Dichtegradienten (1,077 g/ml) überschichten.
- Zentrifugation: 1100 g, 30 Minuten, Raumtemperatur, ohne Bremse.
- obere, hellrote Schicht und angrenzende Zwischenphase in ein Zentrifugenröhrchen überführen, untere Schichten verwerfen.
- mind. 3-faches Volumen PBS.
- Zentrifugation: 310 g, 5 Minuten, Raumtemperatur.
- Pellet in 5 ml DMEM resuspendieren.
- Zellzahlbestimmung: mit Trypanblau, 4% Essigsäure, in einer Neubauer-Zählkammer.
- $2 \cdot 10^5$  -  $7 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in eine Zellkulturflasche geben.
- Brutschrank: 37,0 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

- Zugabe von DMEM mit oben genannten Zusätzen nach 3 Tagen.
- erster Mediumwechsel nach 5 Tagen mit DMEM mit oben genannten Zusätzen.

## **2.4 Kultivierung der MSC**

### **2.4.1 Kulturbedingungen**

Die adhärent wachsenden Zellen aus der Isolation werden in Kulturflaschen mit einer Oberfläche von 25, 75 oder 175 cm<sup>2</sup> und DMEM, supplementiert mit 10% FBS, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 20 mmol/l HEPES-Puffer, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 3 Tagen wird Medium zugegeben, ohne das vorhandene Medium zu verwerfen, um den potentiell adhären Zellen mehr Zeit zu geben am Kulturflaschenboden anzuhafte. Am fünften Tag erfolgt der erste komplette Mediumwechsel, bei dem der Großteil nicht adhären Zellen entfernt wird. Die folgenden Wechsel der Nährmedien erfolgen alle 2-3 Tage. Die Zellen wachsen nach der Anhaftung einzelner Zellen in Kolonien. Sobald die Kulturflasche zu 90% konfluent ist, sollten die Zellen mit Trypsin von der Kulturoberfläche abgelöst und mit einer Zelldichte von 3000 bis 6000 Zellen pro cm<sup>2</sup> neu ausgesät werden, um eine spontane Zelldifferenzierung aufgrund zu hoher Zelldichte zu vermeiden.

### **2.4.2 Passagieren der Zellen**

Die Zellen werden passagiert, bevor die vollständige Konfluenz erreicht wird. Bei 100 % Konfluenz des Zellrasens kann das Wachstum durch Kontaktinhibition beeinträchtigt werden. Die Zellen wachsen darüber hinaus in Multilayer und es kann zur spontanen osteogenen Differenzierung kommen. Die Zellen werden von der Kulturoberfläche abgelöst und auf eine größere Oberfläche verteilt. Nachdem das Kulturmedium abgesaugt und die Zellschicht mit warmem PBS gespült wurde, werden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung überspült. Nach 3 bis 5 Minuten im Brutschrank löst sich die Zellschicht vom Boden der Kulturflasche ab. Um die Wirkung des Trypsins zu inhibieren und die bei zu langer Einwirkung des Enzyms auftretende Zellschädigung zu vermeiden, wird zur Zellsuspension mindestens die doppelte Menge serumhaltiges Kulturmedium gegeben und die Zellsuspension homogenisiert, bevor sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 310 g 5 Min. abzentrifugiert und in Medium resuspendiert wird. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl in ein Kulturgefäß ausgesät.

### **2.4.3 Einfrieren und Auftauen der MSC**

Zur Lagerung der Zellen über mehrere Monate werden sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Sollen sie über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, können sie in flüssigem Stickstoff tief gefroren werden. Die einzufrierenden Kulturen werden trypsinisiert und das Trypsin mit Hilfe von serumhaltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wird in Zentrifugenröhrchen überführt, für 6 Min. bei 310 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Im Einfriermedium (80% FBS/ 20% Medium) wird resuspendiert und je 0,5 ml der Zellsuspension in ein Kryo-Röhrchen (bis zu  $2 \cdot 10^6$  Zellen/Kryoröhrchen) überführt. Vom Einfriermedium (80% FBS/ 20% DMSO), welches das Gefrierschutzmittel enthält, werden je 0,5 ml zu jeder Kryo-Probe gegeben und diese schnell bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Zellen werden bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und dann zügig mit 9 ml Kulturmedium versetzt. Um die Bestandteile des Einfriermediums von den Zellen zu trennen wird 6 Min. bei 310g zentrifugiert und das Pellet anschließend in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl und die Vitalität werden bestimmt und die Zellen in der gewünschten Zellzahl in ein Kulturgefäß ausgesät.

### **2.4.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität**

Zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurde ein Hämocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer sowie Trypanblau verwendet. Der Farbstoff kann die Membran lebender Zellen nicht passieren, aber das Cytoplasma toter Zellen wird blau angefärbt, auch wenn die Zellen intakt erscheinen. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann die Gesamtzellzahl ermittelt und gleichzeitig die Zellen auf ihre Vitalität überprüft werden. Die Zellsuspension und 0,4% Trypanblau-Lösung werden zu gleichen Teilen (20  $\mu\text{l}$ ) gemischt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Zellzählung sollte rasch erfolgen, da Trypanblau zytotoxisch auf die Zellen wirkt.

## Berechnung

1. Gesamtzellzahl =  $n * Vf * V * 10^4$
2. Lebendzellzahl =  $m * Vf * V * 10^4$
3. Vitalität [%] =  $\text{Lebendzellzahl} / \text{Gesamtzellzahl} * 100 \text{ [\%]} = m / n * 100 \text{ [\%]}$

*n: Anzahl der Zellen in einem ausgezählten Quadrat oder durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat, wenn mehrere Felder ausgezählt werden*

*m: Anzahl der lebenden Zellen in einem Quadrat oder durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat.*

*Vf: Verdünnungsfaktor*

*V: Volumen der Zellsuspension*

*10<sup>4</sup>: Kammerfaktor*

## 2.5 Chondrogene Medien

### 2.5.1 Definiertes Basismedium

Die Kultivierung erfolgte nach einem Standardprotokoll zur chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (Pittenger et al., 1999). Zunächst wurde ein serumfreies Medium bereitet, das sich folgendermaßen zusammensetzte:

- DMEM-Medium
- + 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin
- + 20 mM HEPES-Puffer
- + ITS+1 (10 mg/ml bovines Insulin, 5 mg/ml Transferrin, 5 µg/l Selenit, 4,7 µg/ml Linol-säure, 0,5mg/ml BSA)

Vor jedem Mediumwechsel wurden diesem serumfreien Medium noch folgende Supplemente zugeführt:

- + 100 nM Dexamethason
- + 1 mM Natriumpyruvat
- + 0,17 mM Ascorbinsäure-2-phosphat
- + 0,35 mM Prolin

Zu diesem definierten Basismedium wurden dem Versuchsaufbau entsprechend die verschiedenen Differenzierungsfaktoren TGF- $\beta$ 1, Hyaluronsäure (Hylartil oder Ostenil) oder Synovialflüssigkeit gegeben.

### **2.5.2 Hyaluronsäuren**

In unserer Studie evaluierten wir das chondrogene Potential zwei unterschiedlicher Hyaluronsäuren, die für *in vivo* Applikationen zugelassen sind: Ostenil® mit einem Molekulargewicht von  $3 \cdot 10^6$  Da, zugelassen für Anwendungen am Menschen und Hylartil® mit einem Molekulargewicht von  $2 \cdot 10^6$  Da, zugelassen für Anwendungen am Pferd. Die Hyaluronsäuren sind aufgrund ihrer hohen Viskosität schwer zu handhaben. Zum Pipettieren wurden silikonisierte Tips verwendet, denen 5 mm der Spitze mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten wurden. Beim Pipettieren musste man sehr langsam und behutsam vorgehen, um keine zu großen Mengenabweichungen zu bekommen. Die Hyaluronsäuren wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### **2.5.3 Autologe Synovialflüssigkeit**

Die Synovialflüssigkeit von gelenkgesunden Pferden wurde nach der Entnahme zentrifugiert (700 g, 20 Min.), um anschließend vom Zellpellet, welches hauptsächlich aus Erythrocyten bestand, getrennt zu werden. Sie wurden dann im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die hohe Viskosität der Synovialflüssigkeit erforderte die gleiche Handhabung, wie bei der Hyaluronsäure.

## **2.6 Ansetzen der hochdichten 3D-Kulturen**

- Nach folgendem Protokoll wurde beim Ansetzen der hochdichten 3D-Kulturen verfahren:
- Das definierte Basismedium vorbereiten und dem Versuchsaufbau entsprechend mit den verschiedenen Differenzierungsfaktoren versehen. Dann kommt es während der restlichen Arbeitsschritte zum Aufwärmen in den Inkubator.
- Die Zellen in der Kulturflasche trypsinieren (siehe Passagieren) und zentrifugieren (500 g, 5 Min.).
- Den Überstand bis auf ca. 1 ml verwerfen und dann mit serumfreien DMEM (2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 20 mM Hepes) auf 20 ml auffüllen, resuspendieren und wieder zentrifugieren (500 g, 5 Min.). Diesen Vorgang wiederholen.

- Den Überstand wieder bis auf ca. 1 ml verwerfen und mit serumfreien DMEM (2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20 mM HEPES) auf 20 ml auffüllen und resuspendieren.
- Die Zellen zählen.
- Pro Ansatz  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen in Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen einsetzen.
- Die Ansätze zentrifugieren (500 g, 5 Min.) und die Überstände vorsichtig verwerfen.
- Dem Versuchsaufbau entsprechend die Pellets nun mit den inzwischen aufgewärmten Differenzierungsmedien in je 500 µl resuspendieren.
- Zellsuspensionen dann für 8 Std. in den Inkubator stellen.
- Zentrifugation (500 g, 10 Min.).
- Nach 24 Std. bilden sich stabile Zellpellets und es erfolgt der erste Mediumwechsel.
- Nach zwei Tagen die Pellets in 48er Wellplatten umsetzen.
- Jeder weitere Medienwechsel wird nach 48 bis 72 Std. vorgenommen. Anhaftende Pellets werden durch Aufwirbeln des Mediums mit Hilfe der Pipette oder durch Anschnipsen vom Boden oder Rand des Reaktionsgefäßes gelöst.
- Das Ansetzen der Medien erfolgt immer einige Stunden vor dem eigentlichen Medienwechsel. Alle Mediengefäße werden 1 Min. "gevortext". Diese Maßnahmen sollen dafür sorgen, dass sich die viskösen Zusätze (Hyaluronsäure, Synovialflüssigkeit) gleichmäßig verteilen.

## 2.7 Versuchsanordnung der hochdichten 3D-Kulturen

Tab. 3: Versuchsanordnung der hochdichten 3D-Kulturen.

| Proben (Pellets)        | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=2 | n=2 | n=2 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| definiertes Basismedium | X   | X   | X   | X   | X   | X   | X   | X   | X   |
| 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 | -   | X   | -   | -   | X   | X   | -   | -   | -   |
| 0,1 mg/ml Hylartil      | -   | -   | X   | -   | X   | -   | -   | -   | -   |
| 0,1 mg/ml Ostenil       | -   | -   | -   | X   | -   | X   | -   | -   | -   |
| 5% Synovialflüssigkeit  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | X   | -   | -   |
| 10% Synovialflüssigkeit | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | X   | -   |
| 50% Synovialflüssigkeit | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | X   |

## 2.8 Ansetzen von 3D-Vlies-Kulturen

Die Ethisorb® Vliese bestehen aus einem resorbierbaren Verbundwerkstoff aus Polyglactin 910 (VICRYL®) und Poly-p-dioxanon (PDS®). Beide Ausgangsstoffe werden durch einen thermoplastischen Prozess ohne Zusatz von Fremd- oder Hilfsstoffen miteinander verbunden und es entsteht ein vliesartiges Material, dessen Porengröße das Einwachsen von Zellen und körpereigenem Gewebe erlaubt. Die Vliese können vollständig vom Organismus resorbiert werden.

Nach folgendem Protokoll wurde beim Ansetzen der Vlies-Kulturen verfahren:

- Vliese mit steriler Schere in zwei Teile schneiden.
- Die Aufbereitung der Zellen erfolgt analog der hochdichten 3D-Kulturen.
- Pro Ansatz  $4,5 \cdot 10^6$  Zellen in Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen einsetzen.
- Die Ansätze zentrifugieren (500 g, 5 Min.) und die Überstände verwerfen.
- Dem Versuchsaufbau entsprechend werden die Pellets nun mit den inzwischen aufgewärmten Differenzierungsmedien in je 190 ml resuspendiert.
- Aus jedem Ansatz nun je  $63,3 \mu\text{l}$  Zellsuspension als Tropfen auf eine sterile Petrischale pipetieren. Jeder Tropfen enthält  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen.

- Jedem Tropfen nun 25 µl Klebproteinlösung (18 - 28 mg/ml humanes Fibrinogen, 5 - 25 E in 0,5 ml Blutgerinnungsfaktor XIII, 0,5 - 2,3 mg/ml Plasmafibronectin, 1500 KIE in 0,5 ml bovines Aprotinin) injizieren.
- Jeden Tropfen dann mit je einem Vliesstück vollständig aufwischen.
- Anschließend jedes Vliesstück mit 5 µl 1:10 verdünntem Thrombin (humanes Thrombin 250 I.E in 0,5 ml, 1,45 mg/ml) benetzen.
- Kurz antrocknen lassen.
- Vliese in 48er Wellplatten legen mit je 500 µl der dem Versuchsaufbau entsprechenden Differenzierungsmedien.
- Der erste Medienwechsel erfolgt nach 24 Std. und erfolgte für die ersten 8 Tage täglich, dann alle 2 Tage.

## 2.9 Versuchsanordnung der 3D-Vlies-Kulturen

*Tab. 4: Versuchsanordnung der 3D-Vlies-Kulturen.*

| Proben (Vliese)         | n=3 | n=3 | n=3 |
|-------------------------|-----|-----|-----|
| definiertes Basismedium | X   | X   | X   |
| 10 ng/ml TGF-β1         | -   | X   | -   |
| 5% Synovialflüssigkeit  | -   | -   | X   |

## 2.10 Histologie

### 2.10.1 Einfrieren und Schneiden der Proben

Zum Anfertigen der Schnitte wurden die Proben in Carbowachs (OCT) eingebettet und eingefroren. Es entstanden kleine Blöcke die einerseits eine Kryokonservierung der Proben gestatteten, andererseits erlaubten die Proben im Mikrotom einzuspannen. Die Herstellung der Blöcke erfolgte in Tissue-Tek-Einbettungsgefäßen, in die blasenfrei die carbowachshaltige Tissue-Tek-Lösung vorgelegt wurde. Die Proben wurden dann möglichst im Zentrum des ungefrorenen Carbowachsblockes platziert, um eine gute Wiederfindung beim Schneiden zu ermöglichen. Die beschickten Einbettungsgefäße wurden anschließend, von einer Pinzette gehalten, knapp über

der Oberfläche von flüssigem Stickstoff hin- und hergeschwenkt und dabei wiederholt kurz eingetaucht. Dabei fror der Carbowachblock allmählich von außen nach innen durch. Im gefrorenen Zustand konnte er bei  $-70^{\circ}\text{C}$  mehrere Monate gelagert werden.

Das Schneiden der eingebetteten Proben erfolgte mittels eines Mikrotoms. Die eingestellte Schichtdicke betrug  $6\ \mu\text{m}$ . Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und für 12 Stunden an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte direkt gefärbt, oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Trockenperlen gelagert.

### **2.10.2 Alcianblau-Färbung der Schnitte mit Kernechtrot-Gegenfärbung**

Durch Alcianblau-Färbung wird die Knorpelgrundsubstanz, ein saures sulfatreiches Proteoglycan, abhängig vom pH-Wert spezifisch angefärbt. Im Lichtmikroskop erscheint das gefärbte Proteoglycan blau, während die übrigen Zellbestandteile hell erscheinen. Mit einer Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat werden die Zellkerne rot und der Hintergrund schwach rosa angefärbt.

Folgendes Protokoll wurde für die Färbungen in dieser Studie gebraucht:

- Schnitte für 3 Min. in 3%-ige Essigsäure einstellen
- Schnitte für 30 Min. in 1% Alcianblau 8GX gelöst in 3% Essigsäure ( pH 2,5 ) einstellen
- Waschen mit 3%-iger Essigsäure
- Waschen mit Aqua. dest.
- Gegenfärbung mit Kernechtrot
- Waschen mit Aqua. dest.
- Schnitte für je 3 Min. mit 80%, 90%, 100% Ethanol entwässern
- Auswaschen des Alkohols mit Xylol
- Einbetten mit Kanadabalsam und mit Deckgläschen abdecken

### **2.10.3 Quantitative Analyse der Alcianblau gefärbten Schnitte**

Die quantitative Analyse der gefärbten Schnitte wurde mittels der Software Adobe Photoshop 4.0® durchgeführt (Sittinger et al., 1994). Dazu wird ein Farbwert definiert, der der Farbe der zu analysierenden Färbung entspricht. Das Werkzeug „color range“ wählt dann die Flächen aus, die dem definierten Farbwert entsprechen. Die ausgewählte Fläche wird dann im „image

histogramm“ als Pixelzahl quantifiziert. So konnte die Gesamtpixelzahl, wie auch der prozentuale Anteil der gefärbten Pixel ermittelt werden. Für jede Probe wurden 6 Schnitte analysiert, ein Mittelwert errechnet und die Standardabweichung mittels Microsoft Excel® bestimmt.

#### **Berechnung der Standardabweichung:**

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

#### **2.10.4 Immunohistochemische Analyse**

Bei immunhistochemischen Verfahren werden Antigene mit spezifischen Antikörpern, den Primärantikörpern, sichtbar gemacht. Bei der DAKO EnVision HRP-Kaninchen-AEC Methode wird der Primär- durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen. Der primäre Antikörper wurde in Kaninchen produziert, weshalb als sekundärer ein Anti-Kaninchen Antikörper verwendet wird. Letzterer liegt kovalent an ein Dextranpolymer gebunden vor. Ein dritter Bestandteil des als EnVision Konjugat bezeichneten Komplexes ist das Enzym Meerrettichperoxidase. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) zu einem roten Farbprodukt.

Alle Färbeschritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Nach Inkubation der Schnitte wurde das Medium aus den Kammern entfernt und die Proben zweimal mit PBS gewaschen. Eine erneute Spülung mit PBS erfolgte nach 5-minütiger Fixierung mit einem 4°C kalten Methanol/Aceton-Gemisch (1:1). Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit einer 2%-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Auf dreimaliges Spülen mit PBS folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei RT mit einer 10%-igen Ziegen-Normalserum/PBS-Lösung, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Das Blockierungsmedium richtet sich nach der Spezies des sekundären Antikörpers. Anschließendes Spülen mit PBS dient der Entfernung von Resten des Ziegenserums. Danach wurden die Proben mit den primären Antikörpern in entsprechender Verdünnung versetzt und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Antikörperverdünnungslösung besteht aus einem 2%-igem BSA/Tris-Gemisch. Das BSA erhöht die Proteinkonzentration und reduziert eine unspezifische Färbung. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden pro Kammer 4 Tropfen (etwa 200 µl) des unverdünnten Polymerkonjugates auf die Zellen gegeben und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (dreimaliges Spülen mit PBS) wurde die rote Farbreaktion mit einem AEC-Substrat (10-20 Min. bei RT) entwickelt und die Zellen nochmals gespült. Die Gegenfärbung der Zellker-