

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Methodisches Vorgehen und Dauer der Einzelversuche

Die Versuche erfolgten in zwei Abschnitten. Zunächst wurde eine Vorversuchsreihe an 9 Tieren vorgenommen und nach deren erfolgreicher Durchführung der Hauptversuch angeschlossen. Das Hauptanliegen des Vorversuchs bestand darin, das geeignete operative Vorgehen zum Gelenkknorpelersatz durch autogenes, mikrovaskulär reanastomosiertes Periost zu finden.

Bei den Tieren handelte es sich um Chinchilla-Bastard-Kaninchen beiderlei Geschlechts im Alter von sechs bis acht Monaten und einem durchschnittlichen Körpergewicht von  $3600 \pm 108$  Gramm. Vor Operationsbeginn wurde der Epiphysenfugenverschluss zur Dokumentation des abgeschlossenen Knochenwachstums anhand eines Röntgenbildes überprüft. Die Tiere wurden in standardisierten Käfigen gehalten, erhielten standardisiertes Trockenfutter und Wasser ad libitum und wurden bei 50 bis 60% relativer Luftfeuchtigkeit unter einem Lichtregime von jeweils zwölf Stunden Licht und zwölf Stunden Dunkelheit gehalten, wobei die Lichtzeit 06.00 Uhr begann und 18.00 Uhr endete.

#### 3.2 Versuchsablauf

Die operativen Eingriffe erfolgten unter Allgemeinanästhesie. Diese wurde durch eine intramuskuläre Injektion von Ketamin (50mg/kg Körpergewicht) und Rompun TS (4mg/kg Körpergewicht) eingeleitet und dann durch intravenöse Applikation derselben Medikamente (8,3 mg/kg Körpergewicht Ketamin + 0,417 mg/kg Körpergewicht Rompun TS als intravenöses Gemisch alle 10-40 Minuten) in eine prominente Ohrvene aufrechterhalten.

Nach Einleitung der Narkose erfolgte die Rasur des zu operierenden rechten Hinterlaufes von Ober- und Unterschenkel. Nach dreimaliger Desinfektion und steriler Abdeckung erfolgte die Operation unter sterilen Bedingungen. Durch

einen längsverlaufenden Hautschnitt über dem Kniegelenk wurde die Patella dargestellt. Die Eröffnung des Kniegelenks erfolgte durch parapatellare Inzision des Retinakulums sowie der Synovialis. Zur Darstellung des femoralen Gleitlagers der Patella wurde diese nach lateral luxiert. Durch Osteotomie wurde dort ein definierter Knochen-Knorpeldefekt von sechs mal vier Millimeter Größe geschaffen, der im Anschluss zu decken war. Der zu transplantierende gefäßgestielte beziehungsweise freie Periostlappen wurde präpariert, gehoben und auf den Gelenkflächendefekt transplantiert.

In der Durchführung dieses Operationsschrittes unterscheiden sich die zu untersuchenden Versuchsgruppen.

### 3.2.1 Gruppeneinteilung Vorversuch

Im Vorversuch werden drei Gruppen gebildet: Gruppe 1 mit vier Tieren, Gruppe 2 mit zwei Tieren und Gruppe 3 mit drei Tieren. Das zweite Kniegelenk eines jeden Tieres dient als Kontrolle.

Gruppe 1: Es wird am rechten Bein ein ca. ein mal ein Zentimeter großer, gefäßgestielter Periostlappen vom medialen Bereich des Femurs, der von einem Ast der arteria und vena femoralis, der arteria beziehungsweise vena genus superior, versorgt wird, gehoben und invertiert, d.h. mit der Kambiumschicht zum Gelenkinneren orientiert und in dem osteochondralen Defekt mit Fibrinkleber fixiert. Die Lappen erhält man durch scharfe Präparation. Dadurch wird vermieden, dass die Kambiumzellschicht am Knochen verbleibt.

Der Gefäßstiel des Periostlappens wird unter Ligatur aller anderen abgehenden Gefäße einschließlich doppelter Ligatur und Durchtrennung der arteria und vena femoralis distal des Abgangs der arteria beziehungsweise vena genus superior präpariert. Die ausreichende Blutversorgung des Beins nach Unterbindung der femoralen Gefäße ist durch bestehende Kollateralen gewährleistet. Der Gefäßstiel des Lappens entspringt direkt an den femoralen Gefäßen, diese werden nun durchtrennt und anschließend mikrochirurgisch reanastomosiert. Als Nahtmaterial für

die Gefäßanastomosen dient Ethilon 10-0. Dabei fungiert ein ca. ein Zentimeter langes, distal des Gefäßstielabgangs gelegenes Gefäßbündel als Interponat.

Gruppe 2: Es wird am rechten Bein ein gefäßgestielter Periostlappen vom proximalen, medialen Bereich der Tibia gehoben, invertiert und ohne mikrochirurgische Reanastomosierung in den geschaffenen osteochondralen Defekt transplantiert.

Gruppe 3: Bei dieser Gruppe wird von derselben Entnahmestelle am rechten Bein ein freier, also nicht gefäßgestielter Periostlappen gehoben und in den Defekt transplantiert.

Im Anschluss an die jeweils durchgeführte Operation wird an den Kniegelenken der Gegenseite bis zur Eröffnung der Gelenkkapsel gleichermaßen vorgegangen. Es folgen ein schichtweiser Wundverschluss, Betaisodona-Touchierung und ein steriler Verband. Die Kniegelenke der Gegenseite dienen in dieser Untersuchung als Kontrollgruppe. Es ergeben sich Operationszeiten von zwei bis vier Stunden bei den mikrochirurgischen Operationen und von etwa einer Stunde bei den übrigen Operationen.

### 3.2.2 Gruppeneinteilung des Hauptversuchs

Der Hauptversuch erfolgt nach erfolgreichem Abschluss der Vorversuche an insgesamt 19 Tieren, welche in drei Gruppen eingeteilt werden.

Tabelle eins: Gruppeneinteilung des Hauptversuchs.

<b>Gruppe:</b>	<b>Charakteristikum:</b>	<b>Tieranzahl:</b>
<b>1</b>	Kontrollen	19
<b>2</b>	freie Transplantate	8
<b>3</b>	gefäßgestielte Transplantate	11

Gruppe 1 wird aus allen Tieren gebildet, bei der die linken Kniegelenke der Tiere der gleichen Operationsprozedur wie in den Transplantatgruppen unterzogen werden, jedoch ohne Entnahme von Knorpelgewebe und ohne Transplantatversorgung. Die Tiere der Gruppe 2 erhalten am gegenseitigen Kniegelenk freie Transplantate wie die in Gruppe 3 des Vorversuchs. Die osteochondralen Gelenkflächendefekte der Tiere in Gruppe 3 werden mit gefäßgestielten und mikrochirurgisch reanastomosierten Periostlappen wie in Gruppe 1 des Vorversuchs beschrieben, versorgt.

### 3.2.3 Postoperative Beobachtungsphase

Nach den Operationen werden die Tiere für sechs Monate bei normaler Käfigaktivität gehalten.

Postoperativ ist bei allen Tieren ein üblicher Wundschmerz zu erwarten, der bei normaler Wundheilung wenige Tage anhalten wird. Aus diesem Grund wird für den Zeitraum von drei Tagen eine Analgesie durchgeführt. (Temgesic 0,02 bis 0,05 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht als subkutane Injektion alle acht bis zwölf Stunden).

Nach Abschluss der Wundheilung, das heißt nach etwa sieben bis zehn Tagen, ist nur noch gelegentlich mit geringen Schmerzen zu rechnen. Für den übrigen Beobachtungszeitraum werden dann voraussichtlich keine Schmerzen mehr auftreten.

An Komplikationsmöglichkeiten sind insbesondere Infektionen beziehungsweise Abszesse zu befürchten. Aus diesem Grunde wird die perioperative Infektionsprophylaxe durchgeführt (Antibiotikum Gentamicin zweimal täglich ein Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht als subkutane Injektion bis zum fünften postoperativen Tag).

Nach Abschluss der Beobachtungsperiode werden die Tiere zur Entnahme und Aufarbeitung der operierten Kniegelenke geopfert. In der Gruppe der gefäßgestielten Transplantate erfolgt vorher in Narkose die Darstellung des Gefäßstiels zur Überprüfung der Durchgängigkeit anhand sichtbarer Pulsationen.

Die Opferung erfolgt durch Injektion von fünf Milliliter einer T 61 Injektionslösung (Fa. Hoechst Veterinär GmbH) in eine prominente Ohrvene.

Wie bereits beschrieben erfolgt Rasur, Eröffnung des Kniegelenkes und Darstellung des femoropatellaren Gleitlagers. Nach Ablösung aller mit dem Knochen fest verwachsenen Bänder und Weichteile vom distalen Femur mit Hilfe eines Raspatoriums, wird dieses proximal der Facies patellaris in der Horizontalebene abgesetzt. Vor der Fixierung in 4,5% gepuffertem und säurefreiem Formalin (Fa. Roth) werden alle Knorpel-Knochenpräparate der femoropatellaren Gleitlager makroskopisch beurteilt, fotografiert und ein Teil des regenerierten Knorpelgewebes für biochemische Analysen folgendermaßen entnommen:

Im proximalen Anteil des neugebildeten Gewebes wird mit Hilfe einer Stanze ein definiertes Gewebestück von drei mal drei Millimeter ausgestanzt, mit einem Raspatorium vom Knochen abgelöst, in ein verschließbares Gefäß (Fa. Eppendorf) überführt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die entnommenen Kniegelenke werden makroskopisch, histologisch und biochemisch aufgearbeitet und entsprechend ausgewertet.

### 3.3 Biochemische Analyse

In der biochemischen Analyse wird von den entnommenen Gewebestücken der Wassergehalt bestimmt und eine quantitative Gesamtkollagenbestimmung durchgeführt.

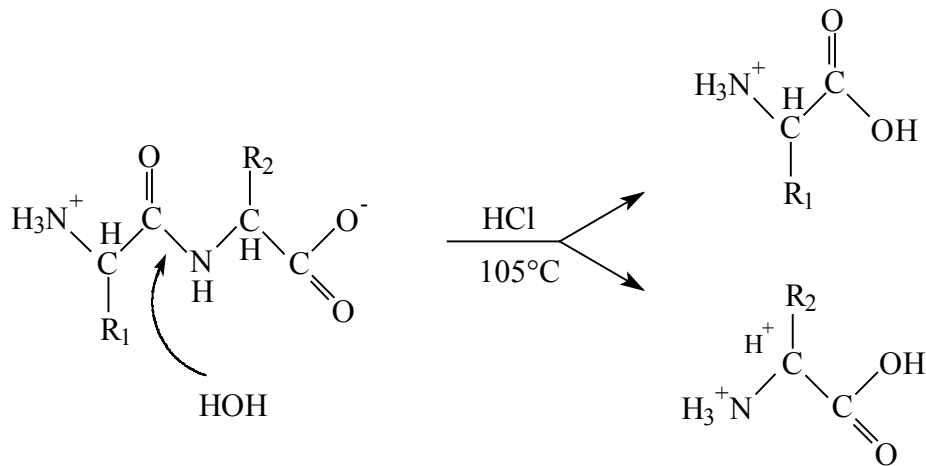
#### 3.3.1 Wassergehalt der Gewebeproben

Zunächst wird das Feuchtgewicht der Knorpelproben ermittelt. Die anschließende Gewebetrocknung der Proben erfolgt unter Vakuum mit Phospho-V-oxid im Exsikkator. Die Proben werden täglich erneut gewogen, bis sich das Gewicht an zwei aufeinanderfolgenden Tagen nicht mehr ändert. Der prozentuale Wassergehalt der entnommenen Knorpelproben wird bestimmt.

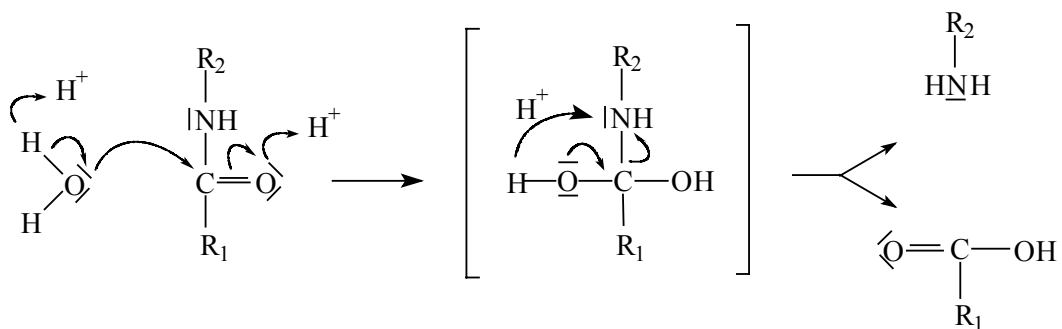
### 3.3.2 Säurehydrolyse von organischem Material

Durch Säurehydrolyse ist es möglich den Hydroxyprolinegehalt von organischen Gewebeproben zu bestimmen und den Gesamtkollagengehalt zu errechnen. Der Hydroxyprolinegehalt wird nach dem Verfahren von Woessner in einer modifizierten Art nach Stegemann und Stalder ermittelt, da sich diese Methode dann auch für Proben mit niedrigem Hydroxyprolinegehalt eignet [Woessner, 1961; Stegemann und Stalder, 1967]. Es handelt sich hierbei um eine quantitative Kollagenbestimmung in Proteinhydrolysaten.

In Anwesenheit von halbkonzentrierter Salzsäure (6 mol/l) wird die Peptidbindung bei hohen Temperaturen (105°C) hydrolytisch gespalten.

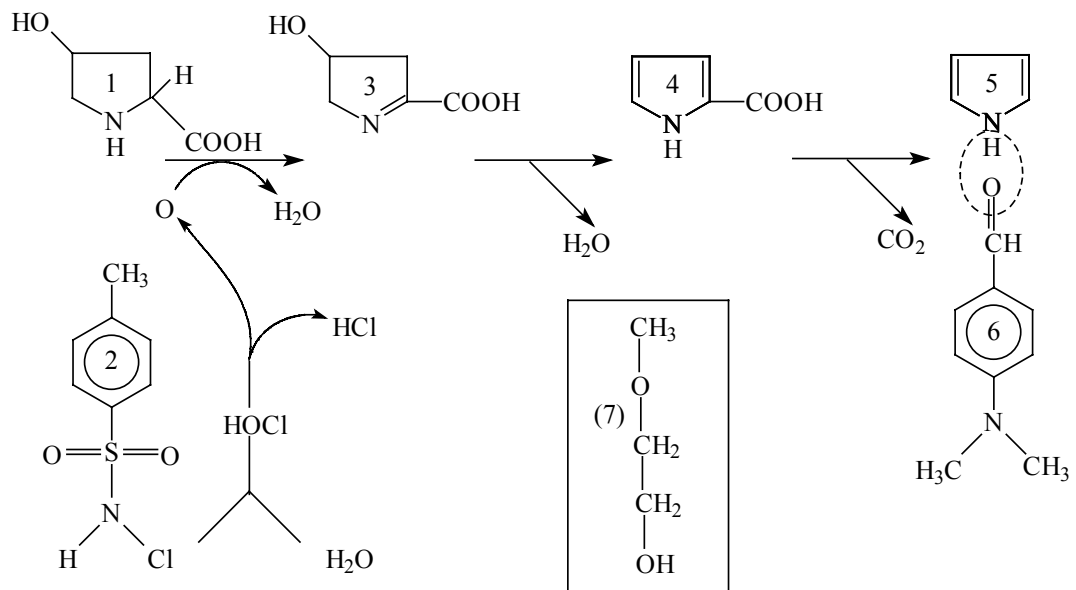


Der Reaktionsmechanismus läuft nach folgendem Schema ab:



Nach Abschluß der Hydrolyse wird das Hydrolysat mit Natronlauge neutralisiert und mit einem Citratpuffer auf pH 5,4 bis 6,0 eingestellt. Anschließend kann Hydroxyprolin mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nachgewiesen werden [Woessner, 1961]:

Hydroxyprolin (1) wird durch Chloramin T (2) schrittweise über Pyrrolincarboxylsäure (3) und Pyrrol-2-Carbonsäure (4) zu Pyrrol (5) oxidiert.



Pyrrol (5) bildet zusammen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (6) ein Chromophor, welches ein Absorptionsmaximum bei 565 nm hat. Als Lösungsvermittler für Chloramin T und p-Dimethylaminobenzaldehyd dient Methylcellosolve (7). (Methylcellosolve entspricht Ethylenglykolmonoethylether).

Reagenzien:

- a.) HCl (6 mol/l)
- b.) Citrat/Acetat-Puffer mit pH=6. Herstellung: 50g Citronensäure x H<sub>2</sub>O; 12 ml Eisessig; 120g Natriumacetat x 3 H<sub>2</sub>O; 34g NaOH; H<sub>2</sub>O ad 1 l.
- c.) NaOH (2,2g%) - Citrat/Acetat-Puffer

d.) Chloramin-T-Reagens. Herstellung: 1,41g Chloramin T + 20 ml H<sub>2</sub>O + 30 ml Methylcellosolve + 50 ml Citrat/Acetat-Puffer (pH=6); täglich frisch hergestellt.

e.) Perchlorsäure (6,2 mol/l)

f.) p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung. Herstellung: 10g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 50ml Methylcellosolve lösen; jeweils frisch hergestellt.

g.) Hydroxyprolin-Standard: Stammlösung: Hyp 1 mg/ml H<sub>2</sub>O gelöst und portioniert bei -20°C aufbewahrt.

h.) Gebrauchslösung: Hyp (5µg/ml). Herstellung: 50µl Stammlösung auf 10 ml Citrat/Acetat-Puffer.

Es folgt die Darstellung zur Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration in den hydrolysierten Proben und die Berechnung des Kollagenanteils im Untersuchungsmaterial.

### 3.3.3 Versuchsdurchführung

#### 1.) Hydrolyse des organischen Materials:

Einwaage des Untersuchungsmaterials in ein Hydrolyserohr

Zugabe von 0,5 ml HCl (6 mol/l)

Zuschmelzen des Hydrolyserohrs

Hydrolyse über 24h bei 105°C im Thermostat

#### 2.) Probenvorbereitung:

Öffnen der Hydrolyse-Ampulle

Entnahme des Hydrolysats

Neutralisation von 0,05 ml Hydrolysats mit 0,45 ml NaOH-Citrat/Acetat-Puffer (End-pH-Wert: 5,4) = 0,5 ml Hydrolysats-Verdünnung (1:10)

Verdünnung der Proben 1:20 mit Citrat/Acetat-Puffer: 250 µl Hydrolysats-Verdünnung (1:10) + 4,75 ml Citrat/Acetat-Puffer (Endverdünnung 1:200).



## 3.) Hydroxyprolin-Bestimmung:

Jeder Test umfasst die Bestimmung von:

- a.) Leerwert des Citrat/Acetat-Puffers
- b.) Standard (Hydroxyprolin-Gebrauchslösung)
- c.) Probe (Hydrolysatverdünnung 1:200)

1,0 ml Untersuchungslösung a.) ; b.) ; c.)

mit 0,5 ml Chloramin-T-Reagens versetzen, schütteln und 20 min bei 22°C stehen lassen.

Zu diesem Ansatz 0,5 ml Perchlorsäure (6,2 mol/l) hinzufügen, schütteln und weitere 12 min bei 22°C stehen lassen.

Anschließend 0,5 ml p-Dimethylaminobenzaldehyd hinzufügen, schütteln und bei 60°C für 20 min inkubieren.

Die Messung der Lichtabsorption bei 565 nm erfolgt innerhalb einer Stunde.

## 4.) Auswertung:

Die Berechnung des Hydroxyprolinanteils in der Hydrolysatverdünnung wird anhand der folgenden Rechenschritte ermittelt: Zunächst wird die Hydroxyprolinkonzentration in den Proben mit der folgenden Formel bestimmt:  $c(\text{Probe}) = (\Delta E(\text{Probe}) \cdot 5) / \Delta E(\text{Standard})$  [ $\mu\text{g/ml}$ ]. Im Anschluss wird die Masse des Hydroxyprolins in den Proben mit folgender Formel ermittelt:  $m(\text{Probe}) = c(\text{Probe}) \cdot 0,1$  [mg]. Daraus errechnet sich die Masse des Kollagenanteils folgendermaßen:  $m(\text{Kollagen}) = (m(\text{Probe}) \cdot 100) / 12,5$  [mg]. Der prozentuale Kollagenanteil ergibt sich wie folgt: Kollagenanteil (Probe) in % =  $(m(\text{Kollagen}) \cdot 100) / m(\text{Probe})$ . Die Berechnung erfolgt nach den Angaben von Stegemann und Stalder, [1967].

### 3.3.4 Eichkurve:

Der lineare Zusammenhang von Konzentration und Extinktion zur Hydroxyprolinbestimmung mittels spektrofotometrischer Messung wird anhand einer Eichkurve dargestellt. Die Extinktion von Proben einer definierten Verdünnungsreihe wird in Dreifachbestimmungen, wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben, gemessen.

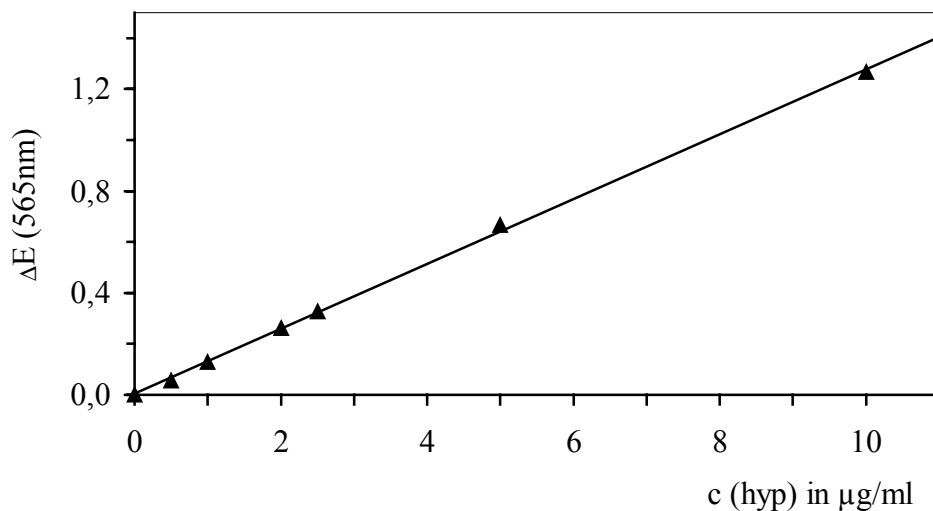


Abbildung eins: Darstellung des Zusammenhangs von Konzentration  $c$  und Extinktion  $\Delta E$  bei einer definiert verdünnten Hydroxyprolinlösung.

### 3.4 Qualitätskontrolle des Verfahrens

Neben den Originalproben werden als Qualitätskontrolle zusätzliche Verdünnungsreihen gemessen.

Der Einfluss potentieller Störfaktoren auf die Hydroxyprolinbestimmung wird ermittelt; die Vollständigkeit der unter Punkt 3.3.2 beschriebenen "Hydrolyse des organischen Materials" wird im Zeitvergleich bestimmt. Außerdem wird der Einfluss hoher und niedriger Temperatur auf die Aminosäurebestimmung überprüft.

### 3.4.1 Einfluss potentieller Störfaktoren

Bei den Faktoren die diese Analyse beeinflussen, könnte es sich sowohl um zelluläre Bestandteile als auch um Teile der extrazellulären Matrix handeln (zum Beispiel Kollagenfibrillen, Hyaluronsäure und Proteoglykane).

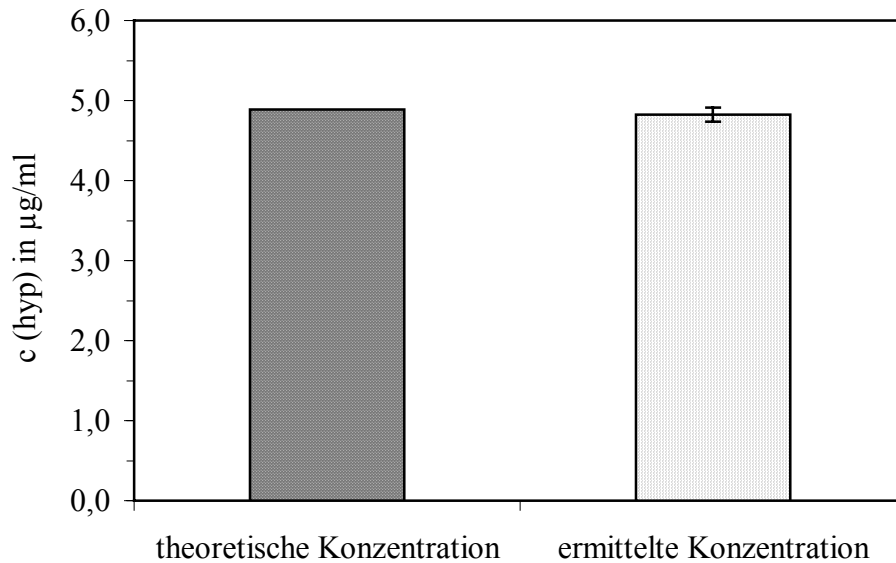


Abbildung zwei: Nachweis des Einflusses von Störfaktoren auf die Konzentrationsbestimmung in Hydroxyprolinhydrolysaten aus Knorpelregeneraten von Kaninchenkniegelenken.

Der Einfluss potentieller Störfaktoren auf die Analyse lässt sich durch Zugabe einer definierten Hydroxyprolinmenge zu den Originalproben feststellen. Anschließend wird der Gesamtgehalt an Hydroxyprolin, der sich idealerweise aus dem ursprünglichen und zugesetzten Hydroxyprolingehalt addiert, in der Probe bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass es sich um einen linearen Zusammenhang zwischen der Hydroxyprolinkonzentration und gemessener Extinktion handelt, sind sämtliche Abweichungen von dem theoretisch zu erwartenden Hydroxyprolingesamtgehalt auf die o.a. Störfaktoren zurückzuführen.

Es werden sechs Gewebeprobe nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Nach der unter Punkt 3.3.2 beschriebenen Hydrolyse und Vorbereitung der Proben, versetzt

man die Proben mit 15 µl einer Hydroxyprolin-Stammlösung der Konzentration  $c=1 \mu\text{g/ml}$  und bestimmt den Hydroxyprolin-Gesamtgehalt in Dreifachbestimmungen. Für die errechnete Konzentration ergibt sich ein Wert von  $c=4,891 \mu\text{g/ml}$ , für die gemessene ein Mittelwert von  $c=4,828 \mu\text{g/ml} \pm 0,09$  (Meßwerte siehe Anlagen).

### 3.4.2 Hydrolyse im Zeitvergleich, Langzeitversuch

Um die Vollständigkeit der Hydrolysereaktion zu überprüfen, werden sechs Versuchsansätze der unter Punkt 3.3.3 beschriebenen Säurehydrolyse bei  $104^\circ\text{C}$  unterzogen. Dabei besteht jeder Ansatz aus drei Einzelproben.

Die Reaktion wird nach definierten Zeitintervallen unterbrochen und die aus dem Kollagen freigesetzte Menge an Hydroxyprolin bestimmt. Als Untersuchungsmaterial dient lyophilisiertes, getrocknetes Rattenschwanzkollagen.

Obwohl die Reaktion nach zwölf Stunden vollständig abgelaufen ist (siehe Abbildung drei), wird im weiteren Vorgehen das Zeitintervall von 24 Stunden beibehalten.

Tabelle zwei: Inkubationsdauer der einzelnen organischen Gewebeproben

<b>Versuchsansatz:</b>	<b>Inkubiert für:</b>
<b>1</b>	72 Stunden
<b>2</b>	48 Stunden
<b>3</b>	24 Stunden
<b>4</b>	12 Stunden
<b>5</b>	6 Stunden
<b>6</b>	1 Stunde

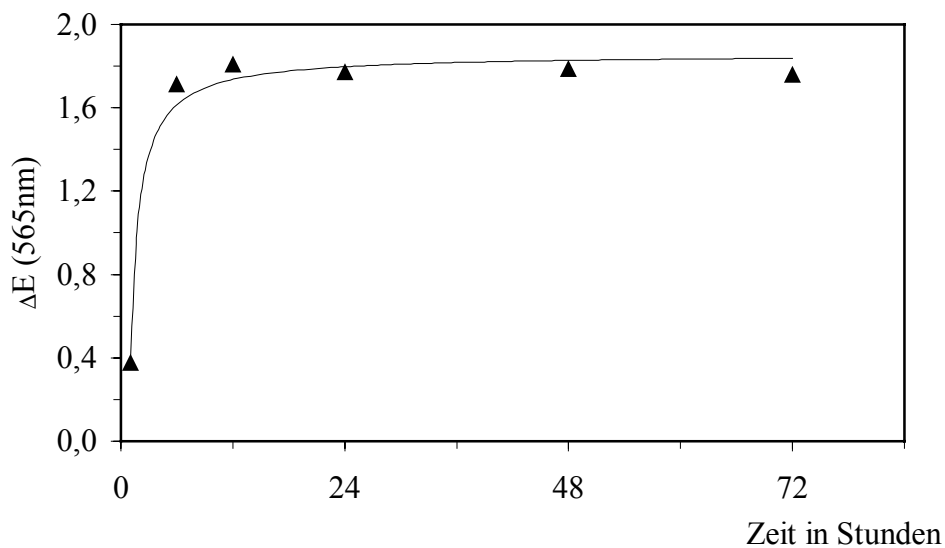


Abbildung drei: Untersuchung des Zeitintervalls für eine vollständige Hydrolysereaktion von organischen Gewebeproben.

### 3.4.3 Temperatureinfluss auf die Hydroxyprolinbestimmung

Der Einfluss der unter Punkt 3.2.2 beschriebenen Säurehydrolyse sowie der hohen Temperatur im Inkubationsofen auf die Hydroxyprolinbestimmung wird untersucht. Dazu wird eine Lösung von zehn Milligramm Hydroxyprolin in zehn Milliliter Aqua destillata hergestellt [ $c(\text{hyp})=1 \text{ mg/ml}$ ]. Diese Konzentration ist durch spätere Verdünnungen bei der Analyse mit den Originalproben vergleichbar (Messwerte siehe Anlagen).

Vier Proben zu je ein Milliliter werden mit 0,5 ml HCl (6 mol/l) versetzt und für 24 h bei 104°C inkubiert (Gruppe 1, Probe 1 bis 4). Zusätzlich werden weitere vier Proben zu je einem Milliliter bei -20°C für 24 h gelagert um den störenden Einfluß niedriger Temperaturen auszuschließen (Gruppe 2, Probe fünf bis acht). Anschließend werden alle Proben der oben beschriebenen "Probenvorbereitung" und "Hydroxyprolinbestimmung" in Dreifachbestimmungen unterzogen.

Für den unbehandelten Standard ergibt sich ein Mittelwert für die gemessene Extinktion von  $\Delta E=0,538$ , die Standardabweichung beträgt 0,005, der Extinktions-

mittelwert der auf 104°C erhitzten Proben beträgt  $\Delta E=0,541$  (Standardabweichung 0,004) und in der Gruppe der auf -20°C abgekühlten Proben wird ein Wert von  $\Delta E=0,542$  und eine Standardabweichung von 0,009 ermittelt. Zur Ergebnisdarstellung siehe Abbildung vier.

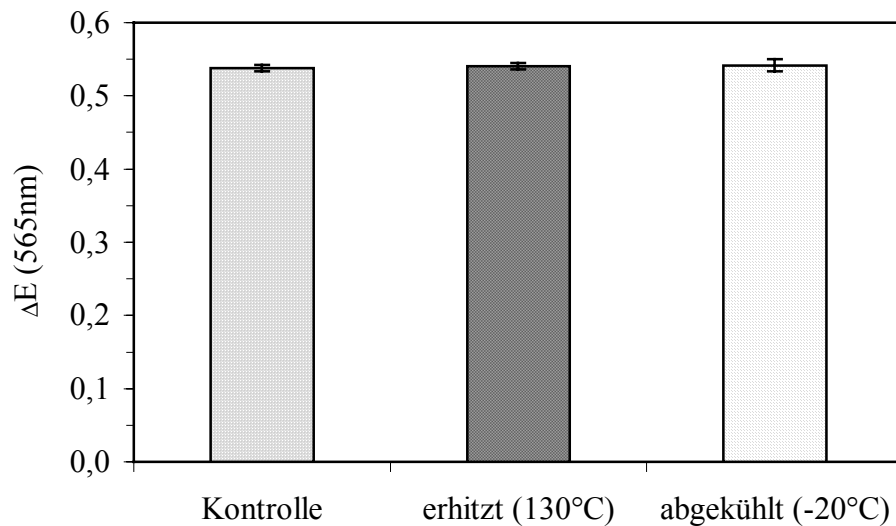


Abbildung vier: Darstellung des Temperatureinflusses auf die Hydroxyprolinbestimmung in Proteinhydrolysaten von Regenerationsgewebe aus Kaninchenkniegelenken.

### 3.5 Makroskopische Untersuchung

Bei allen Kaninchen wird nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten die aktive und passive Beweglichkeit getestet und das Vorliegen eines Gelenkergusses kontrolliert. Die Kontrolle der aktiven Bewegung erfolgt durch Beobachtung der Tiere im Stand und in der Fortbewegung. Bei der passiven Funktionsprüfung wird während des Extensions- und Flexionsvorgangs besonderes auf Krepitationen geachtet.

In Gruppe 3 wird in Narkose das Kniegelenk entlang der ursprünglichen Operationsnarbe nach Rasur unter aseptischen Bedingungen eröffnet, die Gefäßanasto-

mose dargestellt und die Durchgängigkeit visuell anhand sichtbarer Pulsationen überprüft. Für Gruppe 1 und 2 entfällt dieser Operationsschritt.

Die Operierung erfolgt durch Injektion von T-61 analog zur Durchführung im Vorversuch.

### 3.5.1 Makroskopisches Bewertungsschema

Nach Eröffnung der Gelenkkapsel wird der Defektbereich hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit (glatt, rau, Randspalten), der Farbe (weiß, grau), der Niveauunterschiede zwischen Gelenkknorpel und Regenerat, der Konsistenz des Ersatzgewebes im Vergleich zum umgebenden Knorpelgewebe, der Untergrundhaftung des Regenerats und der Rekonstruktion des gesamten femoropatellaren Gleitlagers beurteilt.

Zusätzlich werden degenerative Veränderungen des Umgebungsknorpels erfasst. Alle makroskopischen Ergebnisse werden fotografisch dokumentiert. Die Auswertung wird anhand des folgenden Bewertungsschemas in Anlehnung an O'Driscoll (1988) vorgenommen.

#### Makroskopische Bewertung der Gelenkoberflächen (maximal 4 Punkte)

- 4 Punkte spiegelnd glatte Oberfläche, weiße Farbe, Gewebe liegt im Niveau des Umgebungsknorpels, keine Randspaltenbildung nachweisbar, eine dem Umgebungsknorpel entsprechende Konsistenz.
- 3 Punkte angedeutete Unregelmäßigkeiten der Oberfläche und leichte Konsistenzminderung, sonst wie oben.
- 2 Punkte mäßige Unebenheiten der Oberfläche, geringgradig über oder unter dem Niveau des Umgebungsknorpels, mäßige Konsistenzminderung, angedeutete Randspalten.
- 0 Punkte bei schlechteren Verhältnissen werden keine Punkte vergeben.

### 3.6 Histologische Untersuchungen

Die entnommenen und in 4,5% gepuffertem und säurefreiem Formalin (Fa. Roth) fixierten Präparate werden entkalkt. Dies geschieht nach dem folgenden Arbeitsverfahren:

Entkalkung für 48 Stunden in Ameisensäure (10%) und anschließendem Verbleib der Präparate in Ethylendiaminessäure (=EDTA) folgender Zusammensetzung:

700 g Chelaplex

+4800 ml Aqua destillata

+65 g NaOH

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Nach 9 Tagen werden die Präparate auf vollständige Entkalkung überprüft und je nach Grad der Entkalkung für weitere 24 h in dieser Lösung belassen. Das gewählte Verfahren ist sehr schonend.

Anschließend werden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe über Ethanol (50% → 60% → 70% → 80% → 96%), Isopropanol, Methylbenzoat sowie Toluol entwässert und in Paraffin eingebettet. Von jedem erhaltenen Paraffinblock werden mindestens 5 Schnitte von je 7µm Schichtdicke angefertigt. Die Schnittebene liegt horizontal zur Körperebene, somit kann eine Beurteilung der Defektränder, des Defektbodens und der Schichtdicke des Regenerats erfolgen.

#### 3.6.1 Darstellung der Färbungen

Folgende Färbungen finden Anwendung:

a.) Azan-Färbung nach Heidenhain

Die Azanfärbung ist eine klassische Bindegewebsfärbung, in der die Zellkerne rot dargestellt werden. Kollagen, Basalmembran und Mucin wird blau dargestellt.



b.) Safranin O-Färbung zur selektiven Darstellung der Glykosaminoglykane des Knorpelgewebes. Hierbei handelt es sich um eine histologische Standardfärbung. Der kationische Farbstoff bindet sich an die reaktiven Karboxyl- und Sulfonsäuregruppen der Glykosaminoglykane der Knorpelmatrix und es erfolgt eine stöchiometrische Umsetzung des Farbstoffes mit den Polyanionen. Die Farbintensität ist direkt proportional zum Glykosaminoglykangehalt des Gewebes.

Das Safranin-O wird in seine orthochrome Form transferiert, das heißt, es bindet sich nur an die Gewebepolyanionen und nicht an das Kollagen. Die Färbung mit Safranin-O kann als semiquantitative histochemische Methode für die Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes im Knorpelgewebe angesehen werden [von der Mark und Glückert, 1990].

### 3.6.2 Azan-Färbung nach Heidenhain

Herstellen der Lösungen:

Azokarmin: 0,1 g Azokarmin in 100 ml Aqua bidestillata aufschwämmen; kurz kochen lassen; abkühlen; filtrieren; zu 100 ml Filtrat 1 ml Eisessig

Anilin-Alkohol: 1 ml Anilinöl in 1000 ml 96%igem Alkohol gelöst

Essigsaurer Alkohol: 1 ml Eisessig auf 100 ml 96%igen Alkohol

Anilinblau-Orange: 0,5 g wasserlösliches Anilinblau und 2 g Goldorange in 100 ml Aqua bidestillata gelöst; 8 ml Eisessig hinzusetzen; aufkochen; abkühlen lassen; filtrieren; Stammlösung 1:3 verdünnen mit Aqua bidestillata

Durchführung:

- 1.) Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe über Xylol, Isopropanol und Ethanol (96% → 80% → 70% → 60%) entparaffinieren.
- 2.) Kernfärbung der Schnitte mit Azokarmin für 15 Minuten bei 56°C im Brutschrank
- 3.) Abkühlen der Schnitte auf Zimmertemperatur.
- 4.) Spülen der Schnitte mit Aqua bidestillata.

- 5.) Differenzieren der Schnitte in 1%igem Anilin-Alkohol, bis die Zellkerne deutlich hervortreten.
- 6.) Kurzes Waschen der Schnitte in essigsaurem Alkohol.
- 7.) Beizen des Bindegewebes in 5%iger Phosphorwolframsäure für 30 Minuten.
- 8.) Spülen der Schnitte in Aqua bidestillata.
- 9.) Färben des Bindegewebes mit Anilinblau-Orange-Gemisch für 30 Minuten.
- 10.) Differenzieren der Schnitte in 96%igen Alkohol.
- 11.) Abtrocknen der Schnitte.
- 12.) Eindecken mit Canada Balsam.

### 3.6.3 Safranin O-Färbung

Herstellen der Lösung:

- a.) 6 g eines wasserlöslichen Safranin-O-Farbstoffs in 100 ml 0,03 m HCl bei 50°C lösen, heiß filtrieren; dem Filtrat 10 ml HCl (37%, rauchend) über 10 Minuten langsam zugeben und warten, bis das Filtrat auf 5°C abgekühlt ist
- b.) Filtrat zentrifugieren, Überstand verwerfen, mit Ethanol und danach mit Ether waschen, trocknen
- c.) von diesen Kristallen 0,1 g in 100 ml Aqua bidestillata lösen

Durchführung:

- 1.) Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe über Xylol, Isopropanol und Ethanol (96% → 80% → 70% → 60%) entparaffinieren.
- 2.) Schnitte in 0,1%ige Lösung Safranin O für 6 Minuten
- 3.) Abspülen des freien Farbstoffes in Aqua bidestillata
- 4.) Schnitte in 96%igen Alkohol schwenken
- 5.) Schnitte in 100%igen Alkohol schwenken
- 6.) Abtrocknen der Schnitte

7.) Schnitte in Xylol waschen

8.) Eindecken in Canada Balsam

#### 3.6.4 Histologisches Bewertungsschema

Die histologische Bewertung erfolgte in Anlehnung an O'Driscoll et al. 1988. Das vorherrschende Gewebe im ehemaligen Defektbereich besitzt den höchsten Stellenwert in der Beurteilung.

Die Unterteilung der Gewebe erfolgt in fibröses Gewebe oder Knochen, inkomplett differenziertes Gewebe und hyalinähnlichen Knorpel ohne oder mit typischer Schichtung. Weiterhin wird das Färbeverhalten der Matrix in eine normale oder annähernd normale Anfärbbarkeit, eine leicht beziehungsweise stark verminderte Anfärbbarkeit und einen völligen Färbungsverlust eingeteilt. Von hyalinähnlichem Knorpel wird gesprochen, wenn eine normale Anfärbung der Matrix mit Safranin-O vorliegt und sich die Chondrozyten mit typischem runden bis ovalen Zellkern in Lakunen darstellen. Eine diskrete Hyperzellularität und eine atypische zonale Gliederung wird toleriert.

Die strukturelle Beschaffenheit des Regenerats bildet ein weiteres Kriterium. Es wird unterschieden zwischen einer glatten und intakten Oberfläche, oberflächlichen Laminationen, Fissuren bis 25% der Schichtdicke und schweren Spaltbildungen einschließlich Fibrillationen. Die Beziehung zum umliegenden Gewebe im Sinne einer strukturellen Integrität wird durch Prüfung auf eventuell vorhandene Spaltbildungen beurteilt. Die Schichtdicke des Ersatzgewebes im Vergleich zum vorhandenen Gelenkknorpel wird prozentual auf das Erreichen der Gelenkoberfläche bezogen.

Die zellulären Veränderungen werden mit normalem Gelenkknorpel hinsichtlich der Zellzahl und der Bildung von Chondrozytenclustern verglichen.

Degenerative Veränderungen des umgebenden Knorpelgewebes werden auf Ihre Anfärbbarkeit mit Safranin-O, Clusterbildung und die Zellularität hin untersucht.

Im Score können maximal 24 Punkte erreicht werden. Diese summieren sich aus den einzelnen Punktwerten innerhalb der mikroskopischen Bewertung des im

Defekt gebildeten Gewebes (21 Punkte) und der mikroskopischen Bewertung des Umgebungsknorpels (3 Punkte).

Histologisch-histochemische Bewertung der Gelenkflächen (maximal 21 Punkte):

Art des prädominierenden Gewebes im Defekt (maximal 7 Punkte):

a.) Histomorphologisch:

4 Punkte hyalinähnlicher Knorpel in typischer Schichtung

3 Punkte hyalinähnlicher Knorpel ohne typische Schichtung

2 Punkte inkomplett differenziertes mesenchymales Gewebe

0 Punkte fibröses Gewebe oder Knochen

b.) Safranin-O-Färbung der Matrix:

3 Punkte normale oder annähernd normale Anfärbbarkeit

2 Punkte leicht verminderte Anfärbbarkeit

1 Punkt stark verminderte Anfärbbarkeit

0 Punkte keine Anfärbung

Strukturelle Charakteristika des neugebildeten Gewebes (maximal 9 Punkte):

a.) Oberflächenbeschaffenheit:

3 Punkte glatt und intakt

2 Punkte oberflächliche, horizontale Lamination

1 Punkt Fissuren bis 25% der Schichtdicke

0 Punkte schwerste Spaltbildungen oder Fibrillationen

b.) Strukturelle Integrität:

2 Punkte normal

1 Punkt leichte Spalten und/oder Zysten

0 Punkte schwere Desintegration

c.) Schichtdicke im Vergleich zum Oberflächenniveau des Umgebungsknorpels:

2 Punkte vollständiger Ersatz in voller Höhe

1 Punkt Ersatzgewebe von mehr als 50% der Gesamthöhe

0 Punkte Ersatzgewebe von weniger als 50% der Gesamthöhe

d.) Bindung zum Umgebungsknorpel:

2 Punkte komplett an beiden Seiten

1 Punkt komplett an einer Seite oder partiell an beiden Seiten

0 Punkte keine Bindung

Zelluläre Veränderungen im neugebildeten Gewebe (maximal 5 Punkte):

a.) Zellzahl:

3 Punkte normal

2 Punkte leichte Hypo- oder Hyperzellularität

1 Punkt mäßige Hypozellularität

0 Punkte schwerste Hypo- oder Azellularität

b.) Chondrozytencluster:

2 Punkte keine

1 Punkt weniger als 25% der Zellen

0 Punkte mehr als 25% der Zellen

Degenerative Veränderungen im Umgebungsknorpel (maximal 3 Punkte):

3 Punkte normale Zellularität, keine Cluster, normale Anfärbbarkeit mit Safranin-O

2 Punkte normale Zellularität, wenige Cluster, mäßiger Färbbarkeitsverlust

1 Punkt leichte bis mäßige Hypozellularität, viele Cluster, geringe Anfärbbarkeit

0 Punkte schwerste Hypo- bis Azellularität, keine Anfärbbarkeit mit Safranin-O

### 3.7 Chemikalien, Geräte und Medikamente

Rompun TS ist von Bayer Vital GmbH & Co. KG, Leverkusen, Deutschland. T 61 Injektionslösung von Hoechst Veterinär GmbH, Unterschleißheim, Deutschland. Ketamin und Gentamycin sind von der Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland. Temgesic Injektionslösung stammt von Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland. Tissucol Duo S Gewebekleber ist ein Produkt von Baxter Deutschland GmbH Hyland-Immuno Division, Heidelberg, Deutschland und Betaisodona-Lösung von Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland.

Die Nahtmaterialien Ethilon 10-0 und Prolene 5-0 stammen von Ethicon, Norderstedt, Deutschland.

Das Photometer "Spekol" wird von der Firma Carl Zeiss Jena in Deutschland hergestellt.

Bei dem verwendeten Kamerasystem handelt es sich um eine Leica M4 in Verbindung mit einem Visoflex 2, Balgengerät 2 und dem Objektiv Elmarit 1:2,8 f=90 mm. Alle Fotografischen Geräte kommen aus dem Hause Ernst Leitz, Wetzlar, Deutschland. Sämtliche Chemikalien und Gefäße werden bei Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA bestellt. Alle Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad p.a..

### 3.8 Mathematische und statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse und Darstellung der Ergebnisse werden Microsoft Excel 2000 in Verbindung mit dem Zusatzprogramm Win-Stat und Microsoft Word 2000, beide für Windows 2000, verwendet. Ergebnisse werden als signifikant betrachtet, wenn sich bei der statistischen Analyse eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ergibt ( $p < 0,05$ ). Sämtliche Ergebnisse werden, wenn nicht gesondert angeführt, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.