

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Im Rahmen unserer Studie wurde an 54 ausgewachsenen, weiblichen Merino-Mix-Schafen (*Abb. 8*) eine Ersatzplastik des vorderen Kreuzbandes durchgeführt. Die Rekonstruktion des VKB erfolgte zur Hälfte mit einem autologen, zur anderen Hälfte mit einem allogenen freien Sehnentransplantat des *M. flexor digitalis superficialis*. Die Transplantate wurden extrakortikal fixiert, femoral über einen Endobutton, tibial über eine Faden-Knochenbrücke (*Abb. 14*). Standzeiten waren 6, 12 und 52 Wochen (*Tab. 1*). Die Kniegelenke wurden direkt nach der Operation und nach der Tötung geröntgt, in der Gruppe mit der Standzeit von einem Jahr als Verlaufskontrolle auch nach 3, 6 und 9 Monaten. Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene weitere Teilaspekte in weiteren Studien unersucht. Daher wurde für eine spätere Beurteilung der Knochen-Sehnen-Heilung alle Tiere nach einem standardisierten Protokoll mit fluoreszierenden Knochen-Farbstoffen markiert. Nach der Tötung erfolgte zunächst eine makroskopische Evaluation des Gelenkes bezüglich Arthrose, Gefäßinjektionen, Entzündungszeichen und der Synovia. Die biomechanischen Versuche beinhalteten Testungen zur Ermittlung der Bandlaxizität und der Versagenskraft. In jeder Gruppe von 9 Tieren wurden 7 biomechanisch getestet. Die übrigen 2 standen ausschließlich der histologischen Untersuchung zur Verfügung. Anschließend wurde der intraartikuläre Anteil des Transplantates entnommen und getrennt von den Knochenteilen histologisch weiterverarbeitet. Wir führten konventionelle histologische und immunhistologische Färbungen durch. Gefäße und Myofibroblasten wurden immunhistologisch markiert.

Standzeiten	autolog		allogen		Summe
	<i>Biomechanik + Histologie</i>	<i>Histologie</i>	<i>Biomechanik + Histologie</i>	<i>Histologie</i>	
6 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2	n = 18
12 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2	n = 18
52 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2	n = 18
Summe	n = 27		n = 27		n = 54

Tabelle 1: postoperative Standzeiten, Einteilung der Gruppen und Anzahl der Tiere pro Gruppe

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 54 ausgewachsene, weibliche Merino-Mix-Schafe mit einem mittleren Gewicht von 65,5 kg ($\pm 10,2$) und einem Alter von 2-3 Jahren (*Abb. 9*). Die Studie wurde durch die zuständige Tierversuchskommission genehmigt. Die Schafe wurden von einem amtlich zugelassenen Züchter erworben und umfangreich tierärztlich untersucht. Zu junge Schafe, deren Epiphysenfugen noch nicht geschlossen waren und tragende sowie kranke Tiere wurden nicht in den Versuch aufgenommen. Wir verabreichten ein Prostaglandin-Analogen¹ zur Unterbindung einer potentiell bestehenden frühen Trächtigkeit, ein Antiparasitikum² und einen Immunmodulator³. Zur Operation waren die Tiere in den tierexperimentellen Einrichtungen der Charité, Campus Virchow-Klinikum bis zum Abschluss der Wundheilung untergebracht. Anschließend hatten sie auf einem Forschungs- und Lehrbauernhof der Humboldt Universität Berlin freien Auslauf. In beiden Einrichtungen befanden sich die Tiere unter veterinärmedizinischer und tierpflegerischer Aufsicht.



Abb. 9: Merino-Mix-Schaf auf Bauernhof der Humboldt-Universität 3 Wochen postoperativ

2.1.2 Tiermodell

Das pflegeleichte Schaf eignet sich vor allem aufgrund seiner anatomischen und funktionellen Ähnlichkeiten zum menschlichen Kniegelenk sowie seiner guten Verfügbarkeit besonders als Tiermodell für Rekonstruktionen des VKB mit freien Sehnentransplantaten [75, 131]. Auch

¹ Pronilen®, Intervet GmbH, Tönisvorst, Deutschland

² Ivomec S®, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland

³ Baypamune®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

histologisch finden sich wenige Unterschiede zum menschlichen VKB. Kleintiermodelle dagegen zeigen eine zum menschlichen Kniegelenk unterschiedlichere makroskopische Anatomie auch wenn das Kaninchen mikroskopisch dem menschlichen VKB etwas näher kommt [112]. Aufgrund des kleineren Gelenkes gestaltet sich die VKB-Rekonstruktion jedoch schwieriger und durch die Käfighaltung werden die Gelenke und damit auch die Transplantate weniger belastet. Dagegen gewährleistet die Größe der Kniegelenke beim Schaf eine genaue Platzierung der Knochentunnel. Die Entnahme der Sehne des M. flexor digitalis superficialis führt zu keinen funktionellen Einschränkungen mit Rückkehr zur vollen Belastbarkeit der operierten Kniegelenke nach etwa 4 Wochen. Es können postoperativ weder Knieinstabilitäten und Bewegungseinschränkungen noch Zeichen einer Arthrose festgestellt werden [75]. Des Weiteren wurden Schafe bereits in zahlreichen Studien zum VKB-Ersatz verwendet, was eine Vergleichbarkeit der Daten auch mit Vorgängerstudien gewährleistet [74, 76, 126, 143, 144, 175, 182, 183, 186, 187, 190]. Somit waren Kleintiermodelle für unser Projekt ungeeignet.

2.1.3 Transplantatwahl

Da die Hamstringsehnen des Schafes eine eher flächige und faszienähnliche Gestalt haben, sind sie für die Verwendung als Transplantat ungeeignet.

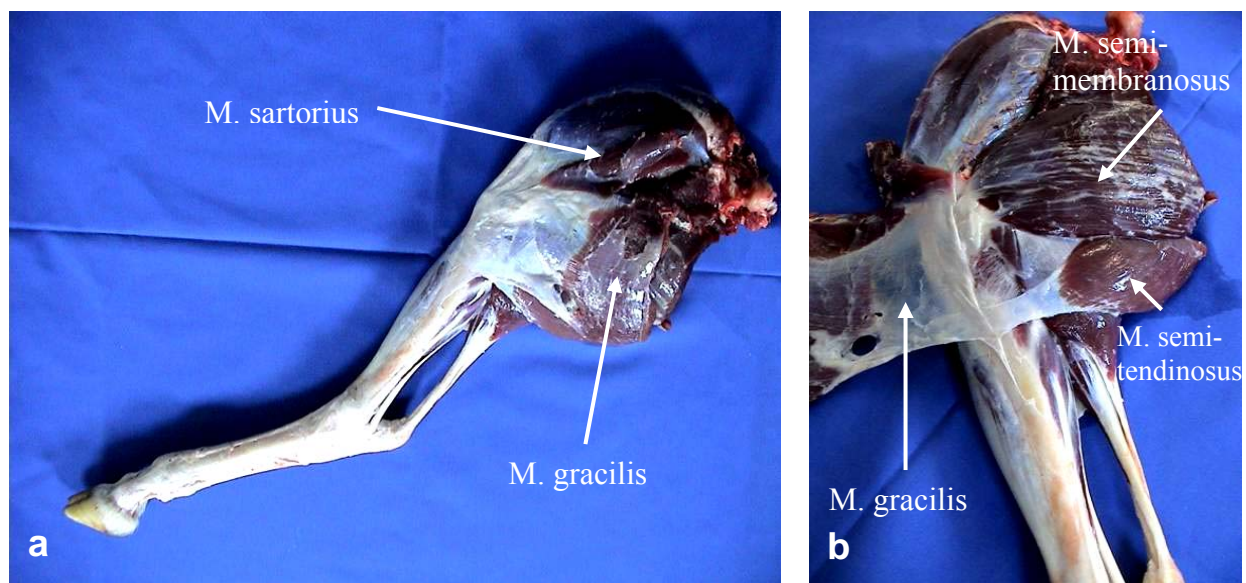


Abb. 10: a) Übersicht der hinteren Extremität des Schafes mit flächiger gemeinsamer Sehne des M. gracilis und M. sartorius. b) Nach Umklappen des M. gracilis kommt die flächige und kurze Sehne des M. semitendinosus zum Vorschein.

Wir wählten daher die Verwendung der Sehne des M. flexor digitalis superficialis, die chirurgisch leicht zugänglich ist, gute biomechanische Eigenschaften besitzt und dessen Entnahme von den Schafen außerordentlich gut toleriert wird [75].

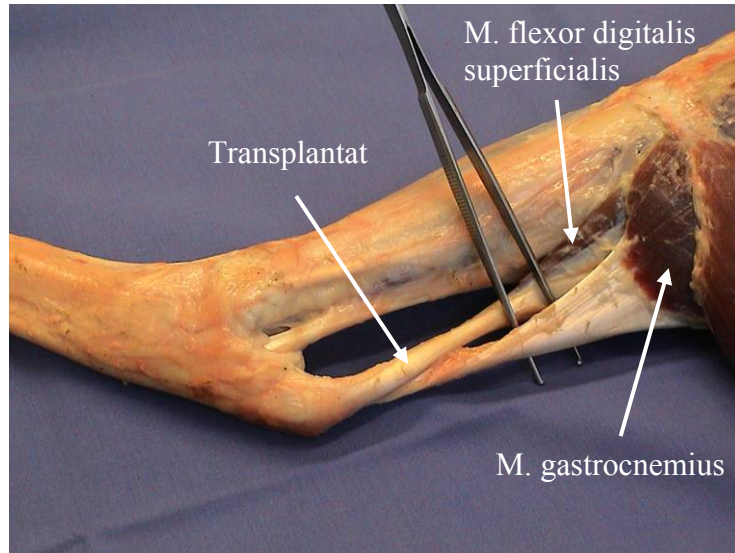


Abb. 11: Als Transplantat diente die Sehne des M. flexor digitalis superficialis, die von der Sehne des M. gastrocnemius umhüllt ist.

2.2 Operatives Vorgehen

2.2.1 Anästhesie und OP-Vorbereitungen

Zur Narkoseeinleitung wurde den nüchternen Schafen 20 mg/kg Thiopental-Natrium⁴ i.v. (gelöst in Aqua ad injectabilia) verabreicht. Anschließend konnten sie mit einem Laryngoskop mit langem geradem Spatel nach Foregger und einem Endotrachealtubus⁵, Größe 8.0, intubiert werden. Die Narkose wurde als Inhalationsnarkose mit Hilfe eines Inhalators⁶ und einem Gasgemisch aus Isofluran^{®7}-(1,5%)-O₂(1/3)-N₂(2/3) fortgesetzt. Als intraoperative Analgesie infundierten wir 0,5 mg Fentanyl^{®8}, als Antibioseprophylaxe Amoxicillin und Clavulansäure⁹ sowie 0,9% Kochsalzlösung¹⁰ i.v.. Die Narkoseüberwachung erfolgte mit einem Pulsoximeter, expiratorischer CO₂-Messung und EKG. Der linke Hinterlauf, ein Teil

⁴ Trapanal[®], Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

⁵ Hi-Lo Lanz[™] Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland

⁶ Ventilator 711, Siemens-Elema Ab, Solna, Schweden

⁷ Forene[®], Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

⁸ Fentanyl[®], Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

⁹ Augmentan[®] i.v. 2,2 g, (Amoxicillin/Clavulansäure) SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland

¹⁰ Natriumchlorid-Infusionslösung 154, Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland

des Beckens und des Bauches wurden geschoren, gewaschen und desinfiziert¹¹. Die Augen schützten wir vor Austrocknung und Infektion mit einer Augensalbe¹². Schließlich fixierten wir die Tiere in rechter Seitenlage auf dem OP-Tisch.

2.2.2 Operation

Die Operation erfolgte unter standardisierten sterilen Bedingungen. Dazu wurde der linke Hinterlauf mit einer Jod-Lösung¹³ abgewaschen, die Klaue steril verpackt und abgedeckt. Die Blutstillung erfolgte durch monopolare Elektrokoagulation, als Spülung wurde 0,9% Kochsalzlösung¹⁴ verwendet.

Transplantatentnahme und Präparation

Über einen posterolateralen Hautschnitt des linken Hinterlaufes wurde die Sehne des M. gastrocnemius dargestellt der die als Transplantat zu verwendende Sehne des M. flexor digitalis superficialis umhüllt. Um sie freizupräparieren wurde die Gastrocnemiussehne der Länge nach gespalten, worauf nun die tiefe Flexorsehne mithilfe einer Overholt-Klemme mobilisiert werden konnte. Anschließend trennten wir proximal des Tuber calcanei und distal des Muskelbauches das Transplantat scharf heraus. Somit erhielten wir ein 6 bis 8 cm langes und ca. 7 mm breites Transplantat. Die gespaltene Flexorsehne wurde mit resorbierbarem¹⁵, die Haut mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial¹⁶ verschlossen. Das Transplantat wurde in mit 0,9% Kochsalzlösung¹⁷ getränkten Mullkompressen feucht gehalten.

Bei den Tieren, die einen autologen Kreuzbandersatz erhalten sollten, diente das Transplantat gleich zur VKB-Rekonstruktion. In den Gruppen mit allogenen Bandersatz wurde das feucht und steril verpackte Transplantat zunächst in einem Kühlschrank bei -80° C tiefgefroren und später zum Kreuzbandersatz wieder aufgetaut.

¹¹ Desderman[®]N, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland

¹² Refobacin[®] (Gentamicinsulfat) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

¹³ Braunoderm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

¹⁴ NaCl 0,9 % Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

¹⁵ 1/0 Vicryl[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

¹⁶ 2/0 Prolene[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

¹⁷ NaCl 0,9 % Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

Nun präparierten wir das Transplantat in Baseball-stitch Technik indem wir an jedem Ende zwei nicht-resorbierbare, polyesterbeschichtete Fäden¹⁸ der Stärke 2 einbrachten. Hierbei wurde das Transplantat auf beiden Seiten über eine Länge von ca. 2 cm armiert (*Abb. 12*). Anschließend wurde die Konstruktion manuell vorgespannt und der exakte Durchmesser für die spätere Bohrung gemessen.



Abb. 12: Transplantat in Baseball-stitch Technik präpariert.

Für die Gruppen mit allogenen Transplantaten wurden die entnommenen Sehnen vorerst nicht präpariert sondern in einer Kochsalz-getränkten Mullkompressen auf -80°C eingefroren.

Arthrotomie

Durch einen anteromedialen Schnitt wurden die Haut und die Verschiebeschichten durchtrennt und das Gelenk arthrotomiert (*Abb. 13, a*). Hierbei wurde auf eine sorgfältige Blutstillung geachtet. Nach Inzision des M. vastus medialis sowie des patellofemorales Bandes, konnte die Patella lateralisiert und das Gelenk flektiert werden. Zur besseren Darstellung wurde der Hoffa'sche Fettkörper unter Schonung des Lig. transversum genus medially gelöst und nach lateral geschlagen. Nun trennten wir das VKB heraus und debridierten die Insertionsstellen mit Hilfe eines scharfen Löffels und einer Luer-Zange (*Abb. 13, b*).

¹⁸ 2 Ethibond-Excel[®], Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland

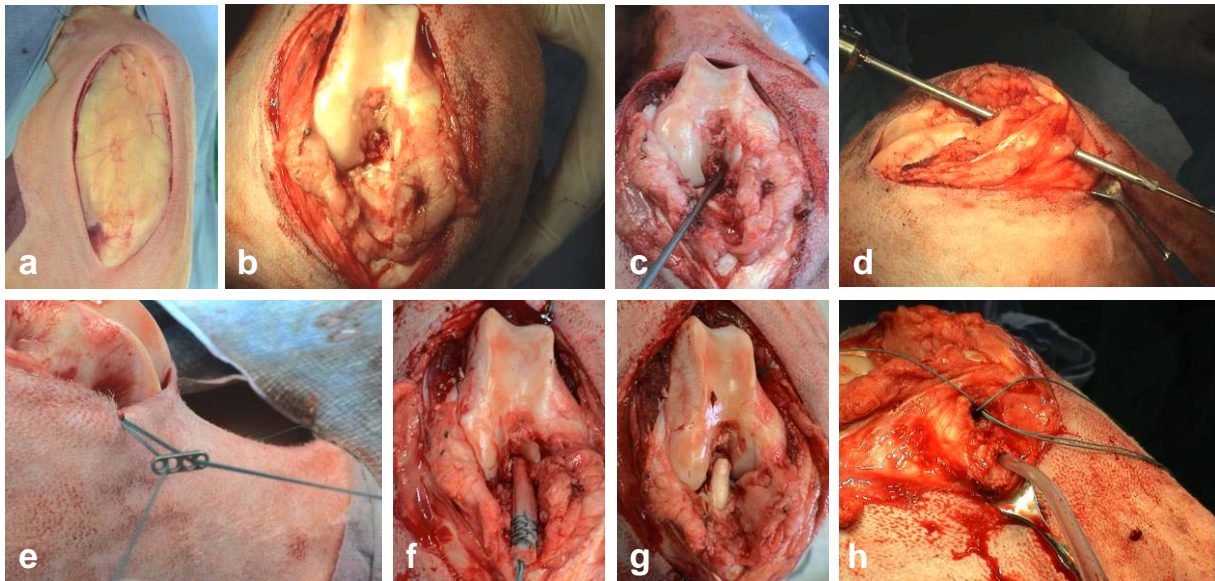


Abb. 13: a) anteromediale Arthrotomie; b) debridierete Insertionsstelle des VKB; c) Bohrung des femoralen Knochentunnels; d) Bohrung des tibialen Knochentunnels; e) femorale Verankerung mit einem Endobutton; f) und g) Einziehen des Transplantates; h) tibiale Verankerung über eine Knochenbrücke.

Knochentunnel

Unter maximaler Flexion des Kniegelenkes wurde der femorale Knochentunnel nach proximal in 1-Uhr Richtung angelegt und auf den genauen Transplantatdurchmesser und 20 mm Tiefe aufgebohrt. Eine hohe Präzision ermöglichte dabei ein vorher bis durch die Haut gebohrter Führungsdraht (Abb. 13, c). Zielgeräte wurden nicht verwendet. Der femorale Knochentunnel verläuft somit vom ehemaligen Ursprung der VKB in der Fossa intercondylaris in Richtung Epicondylus lateralis. Tibial erfolgte die Bohrung ebenfalls in inside-out-Technik. Ausgangspunkt der Bohrung war auch hier die ursprüngliche Ansatzstelle des Vorderen Kreuzbandes, medial der Eminentia intercondylaris. Jedoch wurde hier bis durch die Gegenkortikalis medial der Tuberositas tibiae gebohrt (Abb. 13, d). Für die distale Fixation wurde eine Knochenbrücke mit Hilfe eines weiteren Bohrloches gebildet (Abb. 13, h).

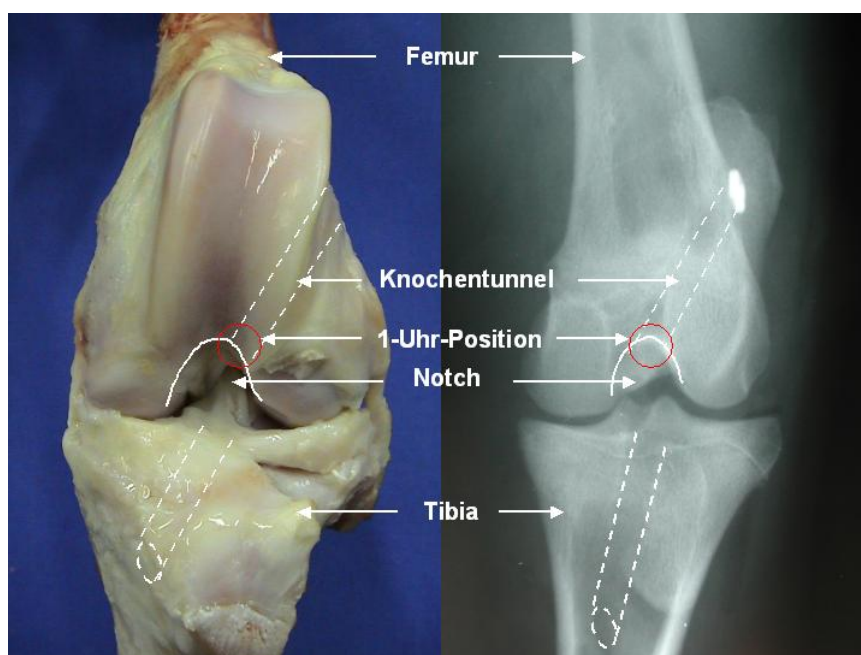


Abb. 14: Schematische Darstellung der Knochentunnel. Aus [73]

Transplantatverankerung

Die Verankerungsfäden des Transplantates wurden über einen Führungsdraht von innen nach außen durch die Tunnel gezogen. Darauf wurde das Transplantat in die Knochentunnel eingezogen und femoral über einen extrakortikalen Endobutton¹⁹ fixiert (Abb. 13, e; Abb. 15). Nach mehrfachem Beugen und Strecken verknöteten wir das Transplantat unter maximaler Vorspannung in 30° Flexion über die tibiale Knochenbrücke (Abb.14). Somit war eine, dem VKB entsprechende Position des Transplantates erreicht. Nach Reposition der Patella wurde die Beweglichkeit und Verankerungsfestigkeit der Konstruktion durch erneutes Durchbewegen getestet. Das patellofemorale Band wurde zur Vermeidung von postoperativen Patellaluxationen mit resorbierbarem Nahtmaterial²⁰ refixiert, die Gelenkkapsel und Verschiebeschichten verschlossen. Für die Haut verwendeten wir nicht-resorbierbares Nahtmaterial²¹.

¹⁹ Acufex[®], Smith & Nephew Endoscopy Inc., Ma, USA

²⁰ 1/0 Vicryl[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

²¹ 2/0 Prolene[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

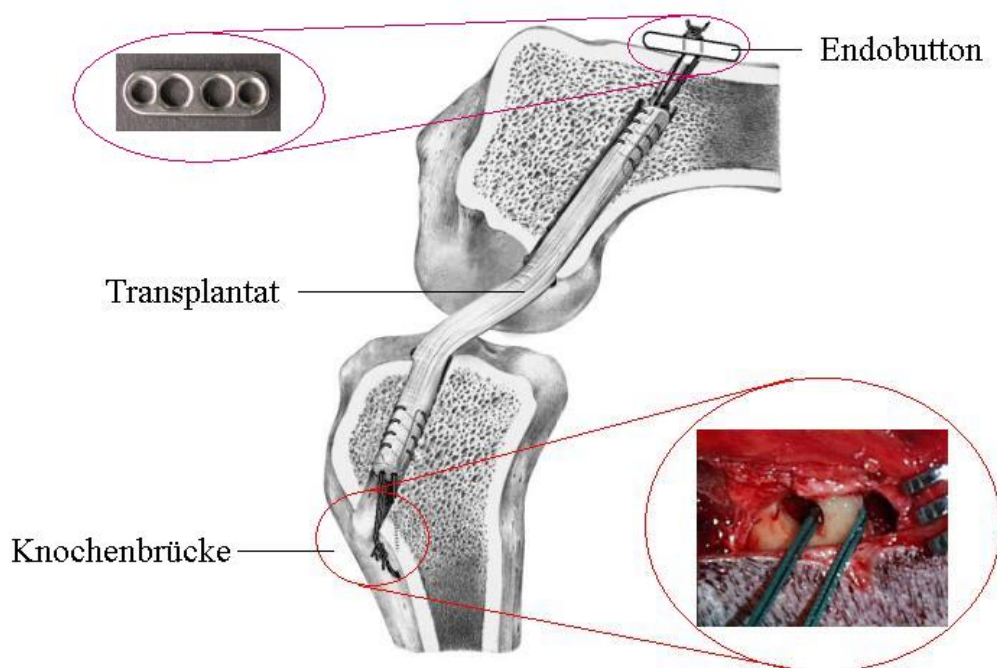


Abb. 15: Das Transplantat wurde femoral über einen Endobutton, tibial über eine Knochenbrücke verankert.

2.2.3 Postoperative Maßnahmen

Die Wunden wurden mit Braunol^{®22} desinfiziert und mit sterilen Kompressen bedeckt und verbunden. Nachdem die Schafe extubiert waren, konnten postoperative Röntgenbilder in kraniokaudalem und mediolateralem Strahlengang mit Hilfe eines mobilen Röntgengerätes²³ und speziellen Röntgenfilmen²⁴ angefertigt werden. Aus hygienischen Gründen und um übermäßige Bewegung und Beeinträchtigung durch andere Schafe zu verhindern, kamen die Tiere für einen Tag in eine Einzelbox. Nach einem Tag durften die Tiere wieder zu den anderen Schafen der Einrichtung. In den ersten drei Tagen postoperativ wurden Analgetika²⁵ verabreicht. Ein Verbandswechsel erfolgte jeden zweiten Tag bis die Wunden trocken waren. Die Fäden wurden nach Abschluss der Wundheilung nach 10-14 Tagen gezogen. Die Schafe befanden sich in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité unter veterinärmedizinischer und tierpflegerischer Aufsicht und wurden täglich visitiert, um den Verlauf der Wundheilung und die Belastung der Gelenke auf einer Skala von 0-4 zu beurteilen. Waren die Fäden

²² Braunol[®]2000, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

²³ Mobilett Plus, Siemens-Elema AB, Solna, Schweden

²⁴ Cronex 5, 24x30 cm, AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien

²⁵ Finadyne[®] 25 mg Injektionslösung 1%, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland

gezogen, die Wunden geheilt und die Belastung zufrieden stellend, wurden sie auf einen Bauernhof der Humboldt-Universität Berlin transportiert, wo sie auf einer Wiese freien Auslauf hatten.

Alle Schafe wurden regelmäßig auf Lahmheit und Klaueninfektionen untersucht und die Klauen aufgrund der fehlenden Abnutzung auf dem weichen Boden in 6-wöchigem Abstand geschnitten.

Die Schafe mit der Standzeit von einem Jahr wurden als Verlaufskontrolle nach 3, 6 und 9 Monaten geröntgt. Für eine spätere Beurteilung der Knochen-Sehnen-Heilung wurden alle Tiere nach einem standardisierten Protokoll mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die sich in dem neu gebildeten Knochen einlagerten.

2.3 Probenentnahme und histologische Aufarbeitung

Nach 6, 12 und 52 Wochen Standzeit wurden jeweils 9 Schafe getötet. Dazu wurden sie mit 20 mg/kg Thiopental-Natrium²⁶ i.v. (gelöst in 40 ml Aqua ad injectabilia) sediert und anschließend mit 50 ml Kaliumchlorid²⁷ i.v. getötet.

Wir explantierten die operierten Kniegelenke in toto und setzten dazu Femora und Tibiae ca. 15 cm proximal und distal der Kniegelenke ab. Des Weiteren wurden Inguinallymphknoten auf beiden Seiten gewonnen. Um ein Austrocknen zu verhindern, wickelten wir die Gelenke in 0,9% Kochsalz-getränkte Binden ein. Anschließend erfolgte eine Röntgenaufnahme. Während der Eröffnung der Kniegelenke entnahmen wir mit einer sterilen Nadel Synovialflüssigkeit und fertigten Ausstriche an. Die Beschaffenheit der Synovia sowie der makroskopische Zustand des Gelenkes, insbesondere Entzündungszeichen wurden dokumentiert. Außerdem wurde Plica und Synovialmembran zur histologischen Aufarbeitung entnommen. 7 der 9 Schafe pro Standzeit wurden von einer Mitdoktorandin biomechanisch getestet. Dies



²⁶ Trapanal®, Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

²⁷ 1M-Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

beinhaltete Messungen der Schubladenlaxizität mit und ohne Weichteilmantel sowie einem Versagenstest. Nach der biomechanischen Testung konnten wir schließlich Längs- und Querschnitte aus einem intraartikulären Bereich des Kreuzbandtransplantates entnehmen, wobei die Längsschnitte noch einmal longitudinal geteilt wurden.

Auf der gesunden Seite wurden von insgesamt 8 Schafen Kreuzbänder und die als Transplantat verwendeten Sehnen des *M. flexor digitalis superficialis* explantiert. Sie dienten als Nativkontrolle für die histologischen Untersuchungen.

Alle gewonnenen Proben wurden in Fixiergittern²⁸ für 2-3 Tage in 4% Formaldehyd-Lösung²⁹ fixiert und anschließend für mindestens 15 min gewässert. Es folgte die automatische Entwässerung über 67 Stunden³⁰ und die Einbettung in Paraffin³¹. Paraffin hat als Fixierungsmittel gegenüber der Gefrierschnittechnik den Vorteil der besseren Strukturhaltung, die insbesondere für die Immunhistochemie eine wesentliche Rolle spielt. Von den fertigen Gewebelöcken wurden 4 µm dünne Serienschnitte mit einem Mikrotom³² angefertigt, die anschließend auf silanisierte Adhäsions-Objektträger³³ aufgezogen wurden.

2.4 Konventionelle Färbungen

Als konventionelle Färbungen für die deskriptive Auswertung dienten die Hämatoxylin/Eosin-Färbung³⁴ (HE) und die Masson-Goldner Trichromfärbung³⁵. Die HE-Färbung ermöglicht die deskriptive Analyse der Kernmorphologie und der Zellverteilung. Der azidophile Farbstoff Hämatoxylin stellt die Zellkerne blau dar, der basophile Farbstoff Eosin färbt die Interzellulärschubstanz und das Cytoplasma rosa. Die Masson-Goldner Färbung eignet sich besonders für die Beurteilung der Extrazellulären Matrix, der Anordnung des Kollagens

²⁸ Tissue Tek III, Miles Limited, Slough, England

²⁹ Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

³⁰ Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

³¹ Paraplast Plus[®], Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA

³² Leica RM 2125, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

³³ HistoBond[®], Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

³⁴ Hämatoxylin, Papanicolaous Lösung 1a Harris', Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Eosin Solution Aqueous, Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri, USA

³⁵ Orange g Differenzierungslösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Lichtgrün, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

Weigerts Eisenhämatoxylin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

Säurefuchsin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

und der bindegewebigen Septen. Sie stellt Zellkerne bräunlich-schwarz, Zytoplasma ziegelrot und Bindegewebe grün dar.

2.5 Immunhistologie

2.5.1 Theoretische Grundlagen der Immunhistologie

Ziel der Immunhistologie ist es, antigene Strukturen von Zellen und Gewebe durch spezifische Antikörper zu identifizieren und darzustellen.

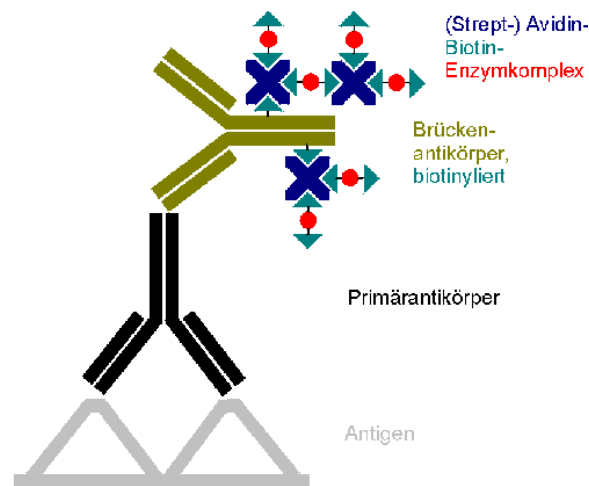
Den Grundstein der Immunhistologie legte Coons [31] im Jahre 1941 durch die Verwendung fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper. Seitdem wurden Sensitivität und Spezifität erheblich verbessert und weitere Markersubstanzen wie verschiedene Enzyme (Peroxidase, alkalische Phosphatase), partikuläres Material (z.B. Goldpartikel) und Isotope etabliert. Heute spielen immunhistochemische Färbemethoden in der medizinischen Forschung und Diagnostik eine unentbehrliche Rolle [45].

Wichtige Voraussetzung für die Qualität der Färbung sind die Spezifität der Antikörper und die Stabilität der Antikörper-Bindungsstellen auf Antigenen (Epitope, Determinanten). Die Stabilität wird durch dessen chemischen Aufbau und der Vorbehandlung des Gewebes bestimmt [45]. Es kommen poly- und monoklonale Antikörper sowie Detektionssysteme aus verschiedenen Antikörper-Farbstoff-Kombinationen zum Einsatz.

Monoklonale Antikörper werden aus einem einzelnen Plasmazellklon gewonnen. Diese entstehen durch Verschmelzen von Myelomzellen mit B-Lymphozyten. Die gebildeten Antikörper richten sich im Gegensatz zu Polyklonalen Antikörpern gegen ein einziges Epitop eines Antigens. Somit sind monoklonale Antikörper hoch spezifisch. Sie besitzen allerdings gegenüber polyklonalen Antikörpern eine geringere Sensitivität und Stabilität [16, 164].

Ferner unterscheidet man nach der Anzahl der eingesetzten Antikörpersysteme direkte und indirekte Methoden. Bei der direkten Methode ist der Farbstoff direkt an den Antikörper gebunden, der auch an das Antigen bindet. Die Verwendung eines Systems aus Primär- und Sekundärantikörper nennt man indirekte Methode (*Abb. 16*). Sie ermöglicht eine Steigerung der Sensitivität der Färbung.

Zur optischen Darstellung der so entstandenen Antigen-Antikörper-Verbindung bedarf es schließlich noch eines Enzymsystems. Hierfür kam die Avidin-Biotin-Methode zur Anwendung. Diese beruht auf der großen Affinität des Hühnereiweiß-Glycoproteins Avidin gegenüber dem antikörpergebundenen Vitamin Biotin. Da Avidin vier Bindungsstellen besitzt und dadurch mehrere Markerenzyme anlagern können, kommt es zu einer Signalverstärkung und somit zu einer weiteren Steigerung der Sensitivität (*Abb. 16*) [45].



(Strept-) Avidin-Biotin-Complex

ABC-Methode

Abb. 16: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbemethode mit biotinyliertem Sekundärantikörper und Avidin-Biotin-Komplex. Aus [66]

2.5.2 Immunhistologische Färbung der Myofibroblasten

Die von uns markierten Myofibroblasten enthalten eine Isoform des Aktins, das α -smooth-muscle Aktin (ASMA), welches für die kontraktile Eigenschaften verantwortlich ist und sich immunhistochemisch anfärben lässt [160].

Hierfür wurden ausschließlich in Paraffin fixierte Längsschnitte verwendet. Alle Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und rehydriert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit Normalserum³⁶. Das Normalserum stammt von der gleichen Tierspezies wie der später verwendete Sekundärantikörper und verhindert so unspezifische

³⁶ Normal Horse Serum, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

Hintergrundfärbungen durch Anlagerung von Proteinen an das Bindegewebe [164]. Es folgte die Inkubation mit einem monoklonalen Anti-ASMA-Primärantikörper³⁷ bei 4°C über Nacht.

Am Folgetag wurde nach zweimaligem Spülen mit PBS-Puffer³⁸ ein biotinylierter Sekundärantikörper³⁹ für 30 Minuten aufgetragen. Dieser bindet an den Primärantikörper. Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer erfolgte die Inkubation mit ABC-Komplex⁴⁰ (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex) für 50 Minuten. Das Reagenz bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper. Als Markerenzym wurde hier die alkalische Phosphatase verwendet. Nach Spülen mit einem Chromogenpuffer⁴¹ brachten wir das Substrat Vector[®] Red⁴² (gelöst in 100 mM – 200 mM Tris-HCl, pH 8,2 - 8,5) auf, welches von der alkalische Phosphatase zu einem Chromogen umgesetzt wird und die markierten ASMA-Moleküle rot anfärbt. Die Farbreaktion wurde in einer Pufferlösung gestoppt. Die Zellkerne wurden schließlich noch in Methylgrün⁴³ gegengefärbt, die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Vitro-Clud^{®44} eingedeckelt.

Alle durchgeführten Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer. Als Negativ-Kontrollen wurde bei jeder Färbung ein Schnitt mit Puffer anstelle des Antikörpers inkubiert. Glatte Gefäßmuskelzellen jedes Schnittes dienten als interne Positiv-Kontrolle.

2.6 Auswertung der Daten

Die histologische Analyse der Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines konventionellen Lichtmikroskopes⁴⁵ und einer angeschlossenen Kamera⁴⁶. Die Dokumentation ermöglichte ein digitales Bildanalysestystem⁴⁹.

³⁷ Smooth Muscle Actin, Klon 1A4, DAKO A/S, Glostrup, Denmark

³⁸ 3L 175 Phosphatpuffer Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

³⁹ Vectastain[®], Biotinylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG, Made in Horse, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

⁴⁰ ABC kit, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

⁴¹ Trizma[®] Base T-1503, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Trizma[®] Hydrochloride T-3253, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt

⁴² Vector[®] Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

⁴³ Certistain[®] Methylgrün, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

⁴⁴ Vitro-Clud[®], R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

⁴⁵ DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

⁴⁶ Sony Color Video Camera, Modell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

2.6.1 Deskriptive Auswertung

Zur deskriptiven Auswertung wurden mehrere Längs- und Querschnitte eines Transplantates beurteilt. Dazu wurden Vergrößerungen von 1,6; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100 gewählt. Mit Hilfe der Masson-Goldner Färbung konnte die Kollagenanordnung und die Anzahl und Ausrichtung der bindegewebigen Septen analysiert werden. Die HE-Färbung diente v.a. der Beurteilung der Zellverteilung (peripher, zentral) sowie der Zell- und Kernmorphologie (rund, ovoid, spindelförmig) sowie deren Größe. Des Weiteren wurden die Ausdehnung der Synovialhülle und die Vaskularisierung der Präparate evaluiert. Schließlich konnte anhand der immunhistochemisch gefärbten Schnitte Verteilung und Gestalt der Myofibroblasten beurteilt werden. Wichtig für den Prozess des Remodelings war auch die Gesamthomogenität der einzelnen Schnitte sowie der Präparate einer Gruppe untereinander.

2.6.2 Bindegewebszellen und Myofibroblasten

Die quantitative Analyse der Zellen insbesondere der Myofibroblasten erfolgte anhand der immunhistochemisch gefärbten Transplantat-Längsschnitte. Zum Auszählen der Zellen wurde in je 10 Gesichtfeldern in 20-facher Vergrößerung, zuerst die Zahl der ASMA-negativen Bindegewebszellen (Fibroblasten und Fibrozyten) und in einem zweiten Schritt die Zahl der ASMA-positiven Myofibroblasten ermittelt. Da Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen ebenfalls α -smooth-muscle Aktin exprimieren, mussten Myofibroblasten auch durch ihre morphologische Gestalt und ihrer Lage im Gewebe differenziert werden. Daher wurden bevorzugt Gesichtfelder gewählt, die wenige Gefäße enthielten und Zellen, die nahe an Gefäßen lagen nicht als ASMA-positiv mitgezählt. Das Auszählen erleichterte ein Bildanalyseprogramm⁴⁷, das die von mir markierten Zellen zusammenrechnet und den prozentualen Anteil von ASMA-positiven zu ASMA-negativen Zellen errechnet.

2.6.3 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie erlaubte es schon vor der Erfindung des Elektronenmikroskops Aussagen über die molekulare Ordnung und Struktur von Geweben zu treffen. Sie beruht auf dem Prinzip der Doppelbrechung, die von der Anordnung der Moleküle bzw. Atome eines Gewebes abhängt.

⁴⁷ KS 400 3.0, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland

Substanzen die das Licht in 2 senkrecht aufeinander stehende Schwingungsebenen aufteilt nennt man doppelbrechend oder anisotrop, während Substanzen, die keinen Einfluss auf den Lichtstrahl nehmen als einfachbrechend oder isotrop bezeichnet werden. Ein Polarisator aus einer doppelbrechenden Folie zerlegt das diffus in alle Richtungen schwingende, natürliche Licht in einen außerordentlichen und einen ordentlichen Lichtstrahl. Dabei wird der ordentliche Lichtstrahl, der in alle Richtungen schwingt absorbiert und nur der außerordentliche Lichtstrahl der in einer definierten Ebene schwingt kann durch die Folie hindurchtreten. Man erhält so linear polarisiertes Licht (*Abb. 17*). Trifft dieses Licht auf eine doppelbrechende Struktur wie z.B. Kollagen, wird das Licht in 2 Komponenten aufgespaltet und gedreht. Ein nachgeschalteter Analysator, der wie der Polarisator aufgebaut ist, lässt Licht wiederum nur in Abhängigkeit seiner Schwingungsrichtung passieren und stellt somit Strukturen die das Licht durch gleichsame Ausrichtung gleichsinnig drehen leuchtend dar. Das Präparat erscheint auf diese Weise plastisch (*Abb. 4, S. 10*) [86].

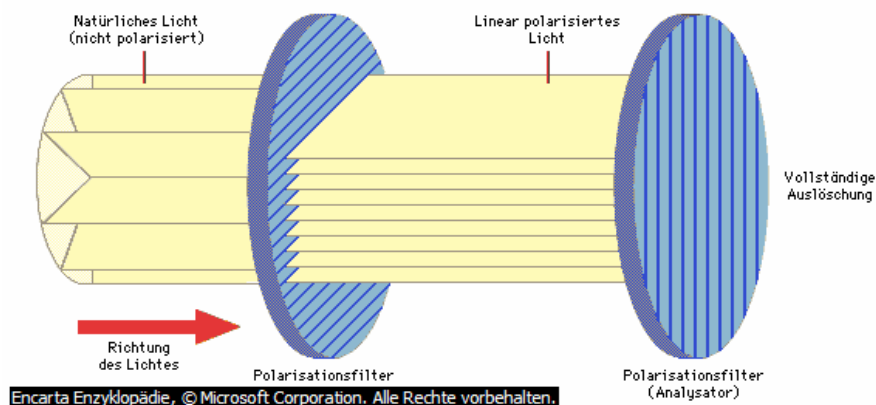


Abb. 17: Der Polarisator zerlegt diffus, in alle Richtungen schwingendes Licht in linear polarisiertes Licht. Der Analysator lässt Licht nur in einer definierten Schwingungsrichtung passieren.

2.6.4 Kollagen-Crimp

Die Polarisationsmikroskopie ermöglicht es, Aussagen über die Kollagentertiärstruktur zu treffen, d.h. über die Anordnung und Ausrichtung des Kollagens im Gewebe (*Abb. 4*). Kollagen besteht aus langen parallel verlaufenden Fasermolekülen die daher im Polarisationsmikroskop anisotrop erscheinen. Die Kollagenfaserbündel verlaufen in Wellenform. Die Frequenz der Kollagenfibrillen nennt man „Kollagen-Crimp“.

Gemessen wurde die Kollagenfibrillenfrequenz mit einer kalibrierten Skala in den gleichen 10 Gesichtsfeldern der Transplantat-Längsschnitte wie die Anzahl der Bindegewebszellen

und Myofibroblasten. Das Computerprogramm errechnete die mittlere Kollagenfibrillenfrequenz pro mm.

2.6.5 Statistik

Zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde zunächst ein Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt. Da die Daten jedoch auch aufgrund der Tierzahl pro Gruppe nicht normalverteilt waren diente der Mann-Whitney-U-Rangsummen-Test zur statistischen Analyse unserer Ergebnisse. Das Signifikanzniveau wurde für $p \leq 0,05$ festgelegt.