

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Studiendesign**

Die Studie wurde mit Genehmigung der staatlichen Tierversuchskommission durchgeführt. Anhand dieser Studie sollten vier unterschiedliche Teilaspekte der Einheilung eines freien Sehnentransplantates nach VKB-Rekonstruktion untersucht werden (die biomechanische Testung der Kreuzbandrekonstruktion, die Knochen-Sehnen-Einheilung des Transplantates, die elektronenmikroskopische Untersuchung des Transplantates und die immunhistochemische Untersuchung des Transplantates).

Während des gesamten Versuchszeitraumes befanden sich die Tiere in tierärztlicher und tierpflegerischer Behandlung der tierexperimentellen Abteilung der Charité. Jedes Versuchstier wurde vor dem operativen Eingriff hinsichtlich seiner körperlichen Tauglichkeit untersucht. Alle operativen Eingriffe wurden von demselben Operateur vorgenommen.

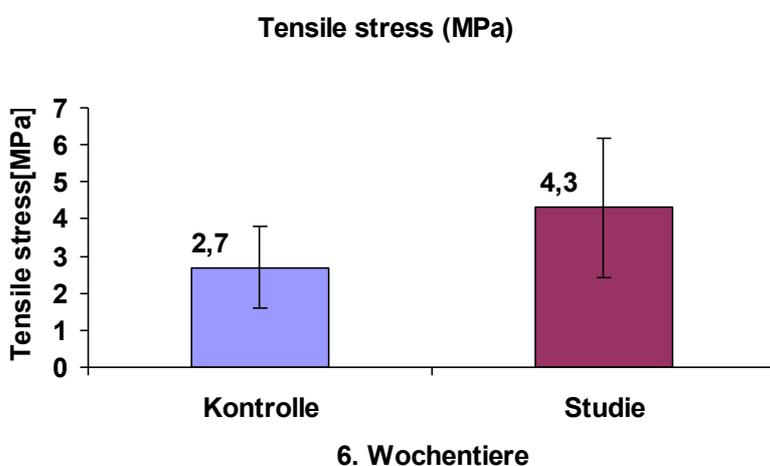
In dieser Studie wurde bei 48 ausgewachsenen weiblichen Heidschnucken, am linken Kniegelenk eine offene vordere Kreuzbandersatzplastik vorgenommen.

Die Versuchstiere wurden in vier Standzeiten und zwei Gruppen (jeweils sechs Tiere in Kontroll- und PDGF-Gruppe) eingeteilt. Die Schafe wurden 3., 6., 12., und 24. Wochen nach der Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes (VKB) mit einer Injektion von Thiopental (Trapanal®) und einer Überdosis Kaliumchlorid getötet. Nach der Tötung erfolgte zunächst eine biomechanische Testung der VKB-Rekonstruktion. Nach Standard Testprotokollen wurden Schubladentests und nach der Bestimmung der cross sectional area ein Versagenstest an den rekonstruierten VKB durchgeführt. Nach den Biomechanischen Untersuchungen wurden die Knie mit rekonstruiertem VKB für die histologische Auswertung präpariert und der intraartikuläre Anteil des rekonstruierten VKB entnommen.

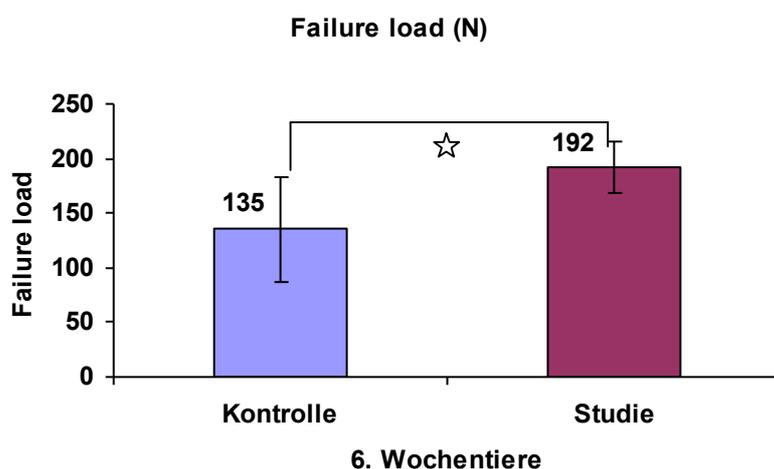
### **2.2.2 Vorversuch**

In der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Charité wurden bereits mehrere Studien am Schafsmodell fertig gestellt, so dass durch die große Erfahrung ein sicherer Ablauf gewährleistet war.

Als Vor-Versuchsgruppe zur Evaluierung des Applikationsmodus und der Dosierung des Wachstumsfaktors diente in dieser Studie die „sechs Wochen-Gruppe“, bestehend aus sechs Studientieren (mit PDGF-**BB**) und sechs Kontrolltieren (ohne PDGF-**BB**). Alle Tiere durchliefen die noch zu beschreibenden Stufen der Studie und wurden nach sechs Wochen getötet und einer biomechanischen Testung unterzogen (siehe folgende Seiten). Die vielversprechenden Ergebnisse der biomechanischen Testung führten zum Beginn des Hauptversuches (Abbildung 2-3).



2-3: Diagramm zeigt den „Tensile stress“ (Reißfestigkeit in Relation zum Querschnitt des Transplantates) zum Zeitpunkt 6. Wochen.



2-3: Diagramm zeigt die „Failure Load“ (Reißfestigkeit) zum Zeitpunkt 6. Wochen. Die Studiengruppe zeigt zu dieser Zeit eine signifikante Zunahme der Stabilität von >40%.

☆ =  $p < 0,05$

### 2.2.3 Auswahl des Tiermodells

Das Schaf ist ein in der experimentellen Kreuzbandchirurgie bewährtes Versuchstier. Dies liegt in der realistischen Belastungssituation für das Kniegelenk begründet. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen wie dem Kaninchen- oder dem Hundemodell kommt es dem menschlichen Knie in Größe und Bewegungsablauf am nächsten. Weiterhin liegen sowohl biomechanische als auch histologische Daten anderer Arbeitsgruppen vor, die in vergleichbaren Studien verschiedene Techniken zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes untersucht haben <sup>[17],[119]</sup>. Für die Durchführung des Versuches wurden ausgewachsene Schafe ausgewählt, um keine aktiven Wachstumsfugen vorzufinden, die beim Eröffnen der Bohrkanäle gegebenenfalls hätten zerstört werden können. Die daraus resultierenden Wachstumsstörungen hätten unabsehbare Veränderungen der Transplantateinheilung und damit der zu erhebenden biomechanischen und histologischen Daten zur Folge haben können.

### 2.2.4 Tierhaltung

Die Tiere wurden randomisiert und abhängig vom Zeitpunkt der geplanten Operation in Stallungen im Forschungsgebäude der Charité oder in Stallungen des Auguste-Viktoria-Krankenhauses (Berlin-Charlottenburg) gehalten. Dort wurden sie von examinierten Tierpflegern und Tierärzten betreut und überwacht.

Zum operativen Eingriff wurden die Tiere in die tierexperimentelle Abteilung der Charité verlegt. Hier wurden die Tiere in einem Stall von 14 qm Größe in einer kleinen Herde mit maximal fünf Tieren gehalten. Postoperativ wurde das operierte Tier in einem Einzelkäfig von den übrigen Tieren separiert. Am ersten postoperativen Tag wurde das operierte Tier in den Stall der übrigen Tiere in der tierexperimentellen Abteilung gebracht und für weitere 10 Tage (bis zu der Entfernung der Hautfäden) täglich klinisch untersucht, bevor sie in das Außengelände (Stallungen des Auguste-Viktoria-Krankenhauses (Berlin-Charlottenburg)) zurückverlegt wurden. Die Tiere konnten sich so zu jedem Zeitpunkt des Versuches bei voller Gewichtsbelastung ungehindert bewegen.

### 2.2.5 Gruppeneinteilung

Aus der Literatur und Arbeiten anderer Projektgruppen ist bekannt, dass das Transplantat nach vier bis sechs Wochen, bedingt durch Remodeling und beginnende Einheilung, in eine kritische „Schwäche-Phase“ eintritt. Dabei kann es vermehrt zu Rupturen und Elongationen kommen. Hinsichtlich der in der Praxis geforderten aggressiven Rehabilitation in Form von physiotherapeutischen Übungsbehandlungen war es für uns von Interesse, Daten über die biomechanische Belastbarkeit und die dazu korrelierenden, biologischen Umbauprozesse des Transplantats in der frühen Einheilungsphase nach VKB-Ersatz zu erhalten. Die Tiere wurden daher in acht Gruppen zu je sechs Tieren eingeteilt.

Vier Gruppen dienten als **Kontrollgruppen**. In die Transplantate dieser Tiere wurden keine Wachstumsfaktoren appliziert.

Die anderen vier Gruppen dienten als **Studiengruppen** in deren Transplantate der Wachstumsfaktor PDGF-**BB** appliziert wurde.

Die Standzeiten der jeweils paarigen Gruppen betragen 3., 6., 12. und 24 Wochen.

## 2.2.6 Operatives Vorgehen

### Präoperative Maßnahmen

Die Einleitung erfolgte durch eine intravenöse Gabe von 20mg/kg Thiopental®. Nach Intubation mit einem Endotrachealtubus mit einem Durchmesser von 7-8 mm wurde die Narkose mit Hilfe eines Inhalators und einem Isofluran-(1,5%) / Sauerstoff- / Lachgas -Gemisch aufrechterhalten. Die Überwachung der Narkose erfolgte anhand eines Pulsoximeters, CO<sub>2</sub>-Messung in der Ausatemluft und EKG.

Während der Operation wurde eine prophylaktische intravenöse Antibiose mit 2,2 g Amoxicillin und Clavulansäure verabreicht. Die Blutstillung erfolgte durch monopolare Elektrokoagulation, die Spülung der Wunden wurde mit steriler Kochsalzlösung (0.9%) vorgenommen.

### Transplantatentnahme

Das operative Vorgehen erfolgte nach herkömmlichen sterilen Regeln. Nach gründlicher Rasur und Säuberung des linken Hinterlaufes, sterilem Abwaschen und Abdecken des Hinterlaufes wurde zunächst das Flexorsehnenransplantat gewonnen. Hierzu wurde ein lateraler, longitudinaler Hautschnitt auf der Endsehne des M. gastrocnemius bis zur Insertionsstelle derselben Sehne geführt.

Nach der Blutstillung wurden die bindegewebigen Verschiebeschichten bis auf die Endsehne des M. gastrocnemius dargestellt, die den M. flexor digitalis superficialis spiralförmig umhüllt (Abbildung 2-4). Die Sehne des M. gastrocnemius wurde stumpf



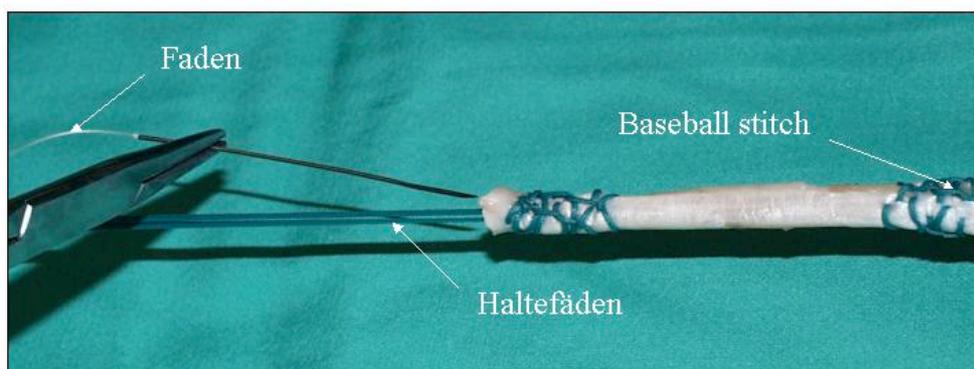
2-4: Bild zeigt Darstellung des M. flexor digitalis superficialis, dessen Sehne das Transplantat darstellt. Diese wird von Teilen des M. gastrocnemius umhüllt.

mit einer Präparierschere entlang des Faserverlaufes gespalten. Die Sehne des M. flexor digitalis superficialis wurde proximal am Beginn des Muskelbauches und distal an der Insertion am Calcaneus durchtrennt. Nach Entnahme dieses Sehnenstückes, das später als VKB-Ersatz dient, wurde die Wunde schichtweise mit Vicryl® 3/0 und Ethilon II® 3/0 wieder verschlossen. Das Transplantat wurde nun vermessen und zum Einbringen als Ersatz des vorderen Kreuzbandes vorbereitet.

### Tranplantatpräparation

Zuerst erfolgte die Armierung beider Enden mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial, Ethibond®-Fäden, in „baseball-stitch“ - Technik. Es wurden proximal und distal zwei Fäden eingebracht, die pro Ende in vier Haltefäden resultierten. Nach Abschluss dieser Knüpfung und manueller zyklischer Zugbelastung für den sicheren Sitz der Fäden wurden in Längsrichtung die „Vicryl-Rapid“ - Fäden als PDGF-Trägermedium eingebracht.

Je nach Gruppenzugehörigkeit implantierten wir Poly-D,L-Lactid-PDGF-beschichtete (Studiengruppen) oder unbeschichtete Fäden (Kontrollgruppen). Es wurden immer vier Fäden eingezogen, deren Länge identisch mit der Länge der Transplantate sein mussten (Abbildung 2-5).



2-5: Photo zeigt das Einziehen des Trägerfadens in das Transplantat. Demonstriert werden die Haltefäden und ihre Befestigung am VKB-Ersatz.

## Rekonstruktion des VKB

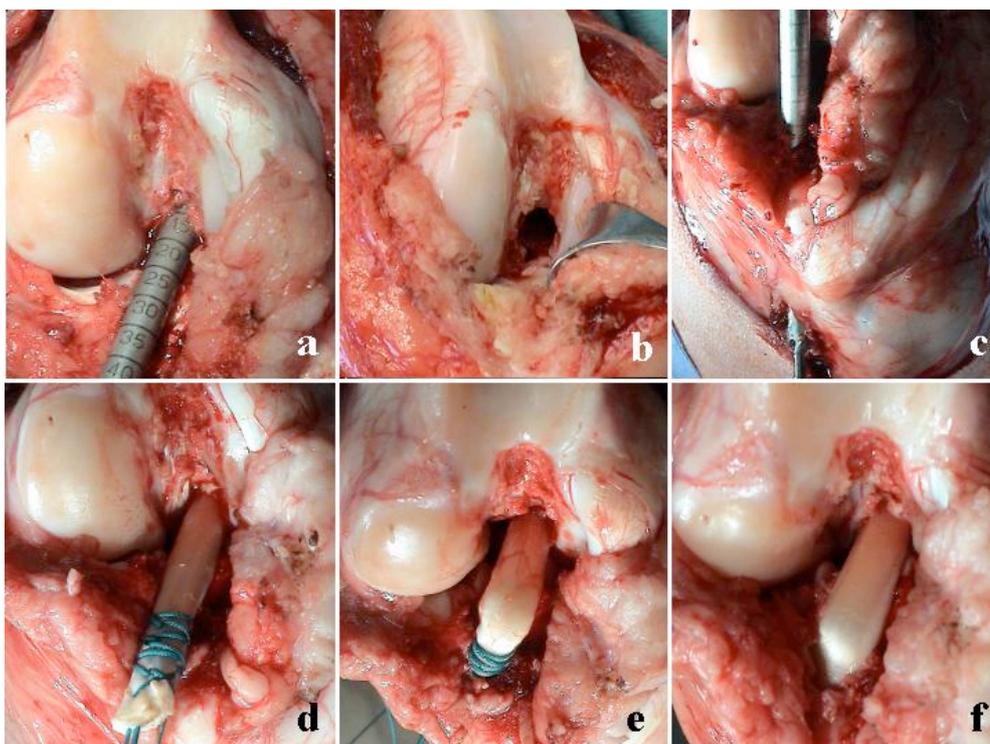
Während der Graftvorbereitung durch den ersten Assistenten konnte zeitgleich die Präparation des ipsilateralen Kniegelenkes erfolgen. Dies geschah, bedingt durch die Anatomie von Schafen und zur Vermeidung der Notwendigkeit einer intraoperativen Umlagerung, in submaximaler Flexion und Abduktion des linken Hüftgelenkes und 90°-Flexion im Kniegelenk.

Das linke Kniegelenk wird mit einem anteromedialen Hautschnitt und Durchtrennung des Retinaculum patellae eröffnet. Die Patella wird nach lateral luxiert und der Hoffa'sche Fettkörper scharf durchtrennt. Unter Erhaltung des Ligamentum transversum genus und des hinteren Kreuzbandes werden die Plica synovialis und das vordere Kreuzband entfernt und dessen Insertionsstellen von verbliebenem Bindegewebe befreit.

Zum genaueren Platzieren des Transplantates wurde nun im Bedarfsfall eine Notchplastik im Sinne einer synovialen und zum Teil ossären Gewebeentfernung vorgenommen. In maximaler Beugung erfolgte das Aufsuchen des ehemaligen femoralen Kreuzbandansatzes mittels Tasthaken zum Definieren des intraartikulären Bohrkanaleingangs in „over-the-top-position“. Daraufhin konnte die femorale-Bohrung, mittels klassischen AO-Instrumentarium, in „over-the-top-position“ unter Gewebeschutz vorgenommen werden. Dies erfolgte in aufsteigendem Bohrerdurchmesser, beginnend mit 2,0 mm. Durch Vermessung des für den femoralen Kanal vorgesehenen armierten Transplantatendes konnte der letztendliche Durchmesser festgelegt werden, der mit der letzten Bohrung um 1,5 mm unterschritten wurde. Um exakte Passgenauigkeit zu erreichen, wurde der Kanal danach sukzessive in 0,5-mm-Schritten dilatiert, wovon wir uns auch eine Verbesserung des Sehnen-Knochen-Einheilens versprochen. Instrumentenbedingte Grate wurden mit der Rundfeile entfernt, um ein artifizielles Verletzen der Bänder oder Haltefäden zu vermeiden.

Bei der Bohrung des tibialen Tunnels wurde genauso verfahren, wobei die Richtung durch den physiologischen distalen Bandansatz und den Zielausgang mediolateral der Tuberositas Tibiae 30 bis 40 mm unter Gelenklinienniveau bestimmt wurde. Vor Implantation musste die tibiale Verankerung noch im Sinne einer Postfixation vorbereitet werden. Hierzu wurde eine transkortikale Bohrung 10 mm kranial lateral des distalen Kanalausgangs gesetzt.

Das Transplantat wurde über die Haltefäden mittels eines Ösendrahtes in die Bohrlöcher eingebracht. Jetzt konnte das vorbereitete armierte Flexorsehnen-Transplantat mittels ösenversehener Drahtsonden in die Bohrkanäle eingebracht werden (Abbildung 2-6). Femoral erfolgte die Fixation des Transplantats über einen



2-6: Foto zeigt die Transplantation der Flexorsehne

- a) Bohrung des femoralen Knochentunnels.
- b) femoraler Knochentunnel.
- c) Bohrung des tibialen Knochentunnels.
- d) femorales Einbringen des Transplantates in den Knochentunnel.
- e) tibiales Einbringen des Transplantates in den Knochentunnel.
- f) Ansicht des eröffneten Gelenkes nach Einbringen des Transplantates.

EndoButton®, tibial wurde nach Rotationsausgleich der Sehne das Einbringen durch manuelle Vorspannung in 90°-Flexion und die oben erwähnte Postfixation beendet. Hierzu wurden zwei Enden der vier Haltefäden mit einer ledigen Periostnadel von extraossär über den Markraum durch das zweite Bohrloch gezogen und mit den anderen beiden sicher verknüpft.

Abschließend wurde der Sitz des Bandes auf physiologische Ausrichtung, Rotation, Festigkeit und Impingement überprüft und die Fixationsloci weicheilig gedeckt.

Beim Wundverschluss wurden der Hoffa'sche Fettkörper, die Gelenkscapsel und die zuvor durchtrennten Muskel- und Sehnenanteile schichtweise wieder mit resorbierbarem Nahtmaterial und die Haut mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial zusammengenäht.

### Nachsorge

Nachdem das Kniegelenk verbunden worden war, wurden beide Kniegelenke jedes Schafes in a.p und seitlichen Strahlengang unter Verwendung eines mobilen Röntgengerätes und speziellen Röntgenfilmen geröntgt. Anschließend wurden die Tiere für 12-24 Stunden in eine mobile Einzelaufwachbox verbracht, um ein übermäßiges Bewegen zu verhindern und die Unversehrtheit des Verbandes zu gewährleisten. Eine Immobilisierung des operierten Beines wurde nicht vorgenommen, so dass vom ersten postoperativen Tag an eine Vollbelastung des operierten Beines möglich war. Zur Analgesie wurde über drei Tage, zweimal täglich eine Dosis von jeweils 700 mg Metamizol intramuskulär verabreicht. Nach Fadenentfernung, meistens 10 Tage nach dem operativen Eingriff, wurden die Tiere wieder in die Stallungen des Auguste-Viktoria-Krankenhauses verlegt.

### 2.2.7 Explantation

Nach 3, 6, 12 und 24 Wochen wurden jeweils sechs Schafe getötet. Den Tieren wurde eine Venenverweilkanüle in die V. jugularis externa gelegt und zunächst Thiopental (1000mg Thiopental aufgelöst in 20 ml aqua dest.) zur Sedierung verabreicht. Nach Applikation von 40-60 ml Kaliumchlorid trat der Tod durch Herzstillstand ein.

Anschließend wurden beide Kniegelenke in toto explantiert. Nach sterilem Abpunktieren der Synovialflüssigkeit wurde die Kniegelenkscapsel eröffnet und der Binnenraum photographisch dokumentiert. Für etwaige sich später stellende Fragestellungen bezüglich entzündlicher Reaktion ausgelöst durch PDGF-BB wurden routinemäßig Synoviaabstriche angefertigt, die inguinalen Lymphknoten sowie Synovialisproben entnommen.

Nun wurden die Kniegelenke in einer Materialtestmaschine (Zwick®1484) auf Bandlaxizität und Ausrißfestigkeit getestet.

Nach der biomechanischen Testung wurde das VKB kurz oberhalb des Eintritts in den Bohrkanaal scharf reseziert. Weiterhin wurden insgesamt sechs native VKB sowie sechs Flexorsehnen der nicht operierten Gegenseite als Kontrollgewebe entnommen.

### **2.2.8 Histologische Aufarbeitung**

Zur Herstellung von histologischen Präparaten wurde das bei der Explantation entnommene Gewebe (Transplantat, VKB, Flexorsehne) zunächst für mindestens 24 Stunden in 5% Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden Proben in längs und quer zum Faserverlauf geschnittene Portionen geteilt und über 18 Stunden lang automatisch entwässert.

Zuletzt wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom 4-5 µm dünne Serienschnitte angefertigt. Diese wurden für die konventionelle Lichtmikroskopie auf unbehandelte und für die immunhistologischen Färbungen auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

### **2.2.9 Konventionelle Färbungen**

Als Übersichtsfärbungen wurden die Färbung mit Haematoxylin und Eosin (H&E) sowie die Trichromfärbung nach Masson-Goldner gewählt. Mit Hilfe der H&E-Färbung lassen sich Zellen differenziert darstellen und unterscheiden. Die Masson-Goldner - Trichromfärbung ermöglicht die Beurteilung der Extrazellulärmatrix und die Differenzierung von Kollagenfibrillen und Epithelgewebe.

### **2.2.10 Immunhistologie**

Theorie der Immunhistologie

Immunhistochemische Färbemethoden ermöglichen es, antigene Strukturen (Epitope) von Zellen und Gewebsabschnitten durch spezifische Antikörper nachzuweisen und zu identifizieren. Antikörper zählen zur einer Gruppe von Proteinen, die man Immunglobuline (Ig) nennt. Es gibt mit abnehmender Häufigkeit fünf Hauptklassen von Immunglobulinen: IgG, IgA, IgM, IgD sowie IgE. Sie werden von durch Antigenkontakt speziell differenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, produziert und sind somit Bestandteile des humoralen Immunsystems.

In der Immunhistochemie werden fast ausschließlich IgG und IgM verwendet. Seit der ersten Verwendung fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper durch Coons im Jahr 1941 wurde die Sensitivität und Spezifität immer weiter verbessert. Heute werden spezifische Antikörper eingesetzt, die durch Isotope partikuläres Material (z.B. Erythrozyten), Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme markiert sind und so dargestellt werden können. Als wesentliche Voraussetzung für die Wertigkeit der Methoden und Untersuchungen sind die Spezifität der verwendeten Antikörper für das zu markierende Antigen sowie die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Strukturen. Diese hängt sowohl von der chemischen Natur des Antigens, als auch von der Vorbehandlung (Fixierung, Einbettmedium, Färbeprotokoll) ab. Grundsätzlich unterscheidet man polyklonale und monoklonale Antikörper.

### **Polyklonale Antikörper**

Polyklonale Antikörperpräparationen entstammen von verschiedenen B-Lymphozyten (Plasmazellen) und sind somit heterogen (bezüglich ihres Antigen-Bindungsspektrums). Sie reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens gegen das sie gebildet wurden. Somit wird die Sensitivität und Reaktivität der Färbemethode erhöht, da mehrere Bindungsstellen des Antigens erkannt und besetzt werden. Sie haben jedoch den Nachteil durch Kreuzreaktionen mit ähnlichen antigenen Determinanten, falsch positive Ergebnisse zu erzeugen.

### **Monoklonale Antikörper**

Monoklonale Antikörperpräparationen stammen von einem einzigen B-Zell-Klon. Diese Zellklone werden durch Fusion einer antigenspezifischen Plasmazelle und einer nicht-sekretorischen Myelomzelle gewonnen. Die B-Lymphozyten sind in der Lage, spezifische Antikörper zu produzieren, während die Myelomzellen für die Stabilität, Langlebigkeit und Kultivierbarkeit des Hybrids sorgen. Durch klonale Vermehrung können theoretisch unendlich viele Antikörper produziert werden. Alle Antikörper eines Plasmazellklons sind immunchemisch identisch, homogen und reagieren nur gegen ein spezifisches Epitop des Antigens, gegen das sie produziert wurden. Somit haben monoklonale Antikörper eine sehr hohe Antigen-Spezifität. Bei zerstörter oder strukturell veränderter antigenen Determinante (durch die Präparation: Temperatur, pH-Wert, Fixierung, usw.) kann es jedoch zu falsch negativen

Ergebnissen kommen und damit zu einer verminderten Sensitivität der monoklonalen Antikörper.

#### Immunhistochemische Färbungen

Alle Serienschnitte für die immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst in Xylol entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe hydriert und in Pufferlösung feucht gehalten. Eine unspezifische Hintergrundfärbung wurde durch eine 20-minütige Applikation von equinem Normalserum bei Raumtemperatur weitgehend unterdrückt.

#### **Immunhistologische Darstellung der Revaskularisierung:**

Zur Detektion von Endothelzellen neu gebildeter Gefäßkapillaren wurden Querschnitte zunächst nach der Entparaffinierung und Hydrierung mit 0,1% Proteinase-Lösung für 10 Minuten bei 37°C vorbehandelt, um die antigenen Epitope zu demaskieren. Anschließend wurde die Schnitte ausgiebig in TBS-Pufferlösung gespült und das Normalserum appliziert. Nach 20 Minuten wurde das Normalserum von den Schnitten abgegossen und ohne zwischenzeitlichen Spülvorgang mit einem polyklonalen F.VIII/ v. Willebrandt-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

#### **Immunhistologische Darstellung der Myofibroblasten:**

Die Myofibroblasten (MFB) konnten aufgrund ihres Gehalts an „ $\alpha$ -smooth-muscle Aktin“, mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (anti-ASMA-Antikörper) markiert und immunhistochemisch dargestellt werden. Hierfür wurden ausschließlich Längsschnitte verwendet.

Die entparaffinierten und hydrierten Präparate wurden keiner Vorbehandlung unterzogen und konnten direkt nach 20-minütiger Applikation mit Normalserum und dem anti-ASMA-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 bei 4°C über Nacht inkubiert werden.

Am Folgetag wurde bei allen Präparaten nach zweimaliger Spülung in TBS-Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten ein biotinylierter Sekundärantikörper aufgetragen. Nach erneutem Waschen in TBS-Puffer wurde das Gewebe für weitere 50 Minuten

mit einem Avidin-Biotin-Komplex, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase als Reporterenzym, inkubiert.

Als Substrat diente Neufuchsin, welches durch die alkalischen Phosphatase in ein rotes Chromogen reduziert wird und somit die markierten Strukturen rot färbt. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün gegengefärbt, die Präparate entwässert und abschließend mit einem xylol-löslichen Einschlussmedium eingedeckt.

Zur Bestimmung einer unspezifischen Hintergrundfärbung aufgrund unspezifischer Bindungsstellen wurden bei allen immunhistochemischen Färbungen Negativ-Kontrollpräparate mit Pufferlösung anstelle Antikörperlösung inkubiert. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten bei der Färbung mit F.VIII/ v. Willebrandt-Antikörper Präparate von gut vaskularisierter Schafshaut, bei der Färbung mit  $\alpha$ -smooth-muscle Actin-Antikörpern wurden die glatten Gefäßmuskelzellen als interne Positivkontrolle herangezogen.

### **2.2.11 Auswertung und Datenanalyse**

Nach Explantation beider Hinterläufe zu den festgelegten Standzeiten wurden die Kniegelenke über einen suprapatellären Schnitt eröffnet und makroskopisch hinsichtlich Entzündungszeichen (Gefäßinjektionen der Synovialis, Gelenkergussbildung und Synovialhypertrophie) sowie der Ausbildung einer neuen synovialen Hüllschicht um das Transplantat beurteilt.

Für die histologische Befundung wurde auf die Methoden der herkömmlichen Durchlichtmikroskopie und der Polarisationsmikroskopie zurückgegriffen. Alle histologischen Präparate wurden an einem konventionellen Mikroskop untersucht. Für die Durchlichtmikroskopie der nach H&E und Masson-Goldner gefärbten Präparate wurden Objektive mit 1,6 x, 2,5 x, 5 x, 10 x, 20 x und 40 x Vergrößerung verwendet. Für die Polarisationsmikroskopie wurden zwei zusätzliche Polarisationsfilter in den Lichtgang zwischengeschaltet. Wegen des hierdurch vermehrt absorbierten Lichtes kamen hier nur Objektive bis zur 20 x Vergrößerung zur Anwendung. Die Dokumentation der histologischen Befunde der Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie erfolgte über das digitale Bildanalysesystem.

### Konventionelle Lichtmikroskopie

Mit Hilfe der konventionellen Lichtmikroskopie werden die Schnittpräparate nach vorheriger Färbung in verschiedenen Vergrößerungen analysiert. Durch die Anwendung verschiedener Farbstoffe werden die verschiedenen Gewebearten, entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften, unterschiedlich angefärbt und können voneinander abgegrenzt werden. Hierdurch lassen sich Aussagen über die feingewebliche Zusammensetzung der Präparate treffen.

Nach oben genannter histologischer Aufarbeitung wurden in je zwei H&E gefärbten Längsschnitten fünf zufällig gewählte Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung in regelmäßigen Intervallen pro Schnitt evaluiert und die mittlere Zelldichte/ mm<sup>2</sup> ermittelt. Weiterhin wurde die morphologische Erscheinungsform (spindelförmig, ovoid, rund) der Zellen dokumentiert.

### Revaskularisierung:

Die immunhistologische Analyse der Revaskularisierung wurde in je zwei Querschnitten der verschiedenen Präparate durchgeführt. Hierzu wurde zunächst in konventionell gefärbten Schnitten (H&E und Masson-Goldner-Trichrom) die Grenze zwischen der synovialen Oberfläche und dem eigentlichen kollagenen Bandgewebe ermittelt. In folgenden Serienschnitten konnte dann nach immunhistologischer Anfärbung des Gefäßendothels mit anti-v. Willebrandt-Faktor (F.VIII) eine Unterteilung des Querschnittes in eine subsynoviale (unmittelbar angrenzend an die synoviale Deckzellschicht), und zentrale Schicht erfolgen. Dazu wurde jeweils der Mittelpunkt jedes Querschnittes festgelegt und die Strecke zwischen der Grenzschicht von Synovia und Bandgewebe bis zum Mittelpunkt halbiert.

### Myofibroblasten

Zur immunhistologischen Darstellung ASMA-exprimierender Myofibroblasten wurden ebenfalls je zwei Präparate im Längsschnitt mit anti- $\alpha$ -smooth-muscle Aktin gefärbt und ausgezählt. Jede Zelle mit unklarer Immunreaktivität wurde aus den Zählungen ausgeschlossen. Pericyten und Myofibroblasten wurden aufgrund ihrer morphologischen Erscheinungsform wie Zellform, Lage im Verhältnis zu Gefäßen und ihre Verteilung zwischen den Kollagenfasern voneinander unterschieden. Es konnten bereits in den frühen Heilungsphase nach 6. und 12. Wochen vereinzelte

Myofibroblasten morphologisch klar identifiziert werden, jedoch gab es häufiger Präparate in denen, aufgrund der in dieser Frühphase noch nicht erfolgten Trennung von Gefäßen und Kollagenfasern, Pericyten und Myofibroblasten nicht klar von einander zu unterscheiden waren.

In je fünf Gesichtsfeldern pro Schnitt wurde die Anzahl der ASMA-positiven Myofibroblasten sowie ASMA-negative Fibroblasten ermittelt und der prozentuale Anteil an Myofibroblasten pro mm<sup>2</sup> errechnet.

Kollagencrimp:

Zur Analyse der Kollagentertiärstruktur und Ermittlung der Kollagenfibrillenfrequenz, dem sogenannten "Kollagencrimp", wurden die Schnitte unter polarisiertem Licht mit einer kalibrierten Skala vermessen. In je 10 Gesichtsfeldern eines Präparates wurde die mittlere Kollagenfibrillenfrequenz errechnet.

Datenanalyse

Alle histologischen Analysen und Zellzählungen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern überprüft. Die Variabilität der Ergebnisse eines Untersuchers lag bei 8,3%, die zwischen den Untersuchern bei 10,8%.

Zur statistischen Datenanalyse wurde zunächst die Datenverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt. Bei fehlender Normalverteilung wurden statistische Vergleiche der verschiedenen Gruppen über die Zeit und Vergleiche innerhalb einer Gruppe mit dem „Mann-Whitney-U Wilcoxon rank sum Test“ durchgeführt.

## Ergebnisse

---

### ***Allgemeines***

#### **2.2.12 Komplikationen**

Von 48 operierten Tieren wurden 48 Tiere in den Hauptversuch aufgenommen. Es musste kein Tier wegen intraoperativen oder postoperativen Komplikationen ausgeschlossen werden.

#### **2.2.13 Postoperativer Verlauf**

Alle Tiere konnten unmittelbar nach dem Eingriff ihren operierten Hinterlauf nach Maßgabe der Beschwerden belasten. Die Vollbelastung wurde spätestens 3 Wochen nach Kreuzbandersatz wieder beobachtet. Sämtliche Arthrotomiewunden und Transplantatentnahmestellen verheilten reiz- und komplikationslos.

#### **2.2.14 Explantation**

Von 48 Tieren konnten nach biomechanischer Testung pro Gruppe von je 6 Tieren das VKB-Transplantat entnommen und zur histologischen Analyse und Auswertung aufgearbeitet werden. Als Kontrollgruppe dienten 9 native vordere Kreuzbänder der Gegenseite und 6 Flexorsehnen als Transplantat zum Zeitpunkt Null.

---

## Makroskopische Auswertung

### 2.2.15 Natives vorderes Kreuzband und Flexorsehne

Makroskopisch zeigte sich das native vordere Kreuzband von einer gut vaskularisierten synovialen Hülle umgeben, während die Flexorsehne zum Zeitpunkt „0“ von einer dünnen Schicht Peritendineum bedeckt war.

### 2.2.16 Nekrosephase und reparativ-proliferative Phase (3 und 6 Wochen Standzeit)

Nach 3 und 6 Wochen zeigte das Kniegelenk noch Entzündungszeichen wie seröser Gelenkerguß und Gefäßinjektionen der Synovialis. Nach 3 Wochen war das Transplantat weder in der Studien- noch in der Kontrollgruppe von einem vollständigen Synovialschlauch überzogen. Das Transplantat war nach 6 Wochen bereits in beiden Gruppen von einer reichlich vaskularisierten und hypertrophen Synovialschicht umhüllt (Abbildung 3-1).



3-1: Makroskopische Kniegelenksaufnahme eines Studientieres der 6-Wochen Gruppe.

6 Wochen nach VKB-Ersatz mit Darstellung des Transplantates umgeben von einem vaskularisierten Synovialschlauch und massiver Gefäßinjektion im Bereich der tibialen Insertion.

### 2.2.17 Intermediäre Remodelingphase (12 und 24 Wochen Standzeit)

Die makroskopische Untersuchung des Kniegelenks zeigte zu diesen Zeitpunkten sowohl in der Kontroll- als auch in der Studiengruppe keinerlei Entzündungszeichen. Das Transplantat war nach 12 Wochen noch von einer diskret verdickten synovialen Hüllschicht bedeckt und vaskularisiert. Nach 24 Wochen zeigte sich das Transplantat von einer straffen synovialen Hülle umgeben und ist makroskopisch nicht mehr von der Gegenseite zu unterscheiden. Insbesondere fanden sich keine Anzeichen einer inflammatorischen Veränderung innerhalb der Studiengruppe (Abbildung 3-2).



3-2:a und b: Makroskopische Kniegelenksaufnahme eines Studientieres der 12-Wochen-Gruppe: 12 Wochen postoperativ zeigt sich das Transplantat noch diskret hypertroph vaskularisiert und verdickt. Bild a zeigt den VKB-Ausschnitt aus b.

3-2:c und d: Makroskopische Kniegelenksaufnahme eines Studientieres der 24-Wochen-Gruppe: 24 Wochen postoperativ lässt sich das Transplantat nicht mehr vom nativen VKB unterscheiden. Bild c zeigt den VKB-Ausschnitt aus d.

---

## ***Mikroskopische Auswertung***

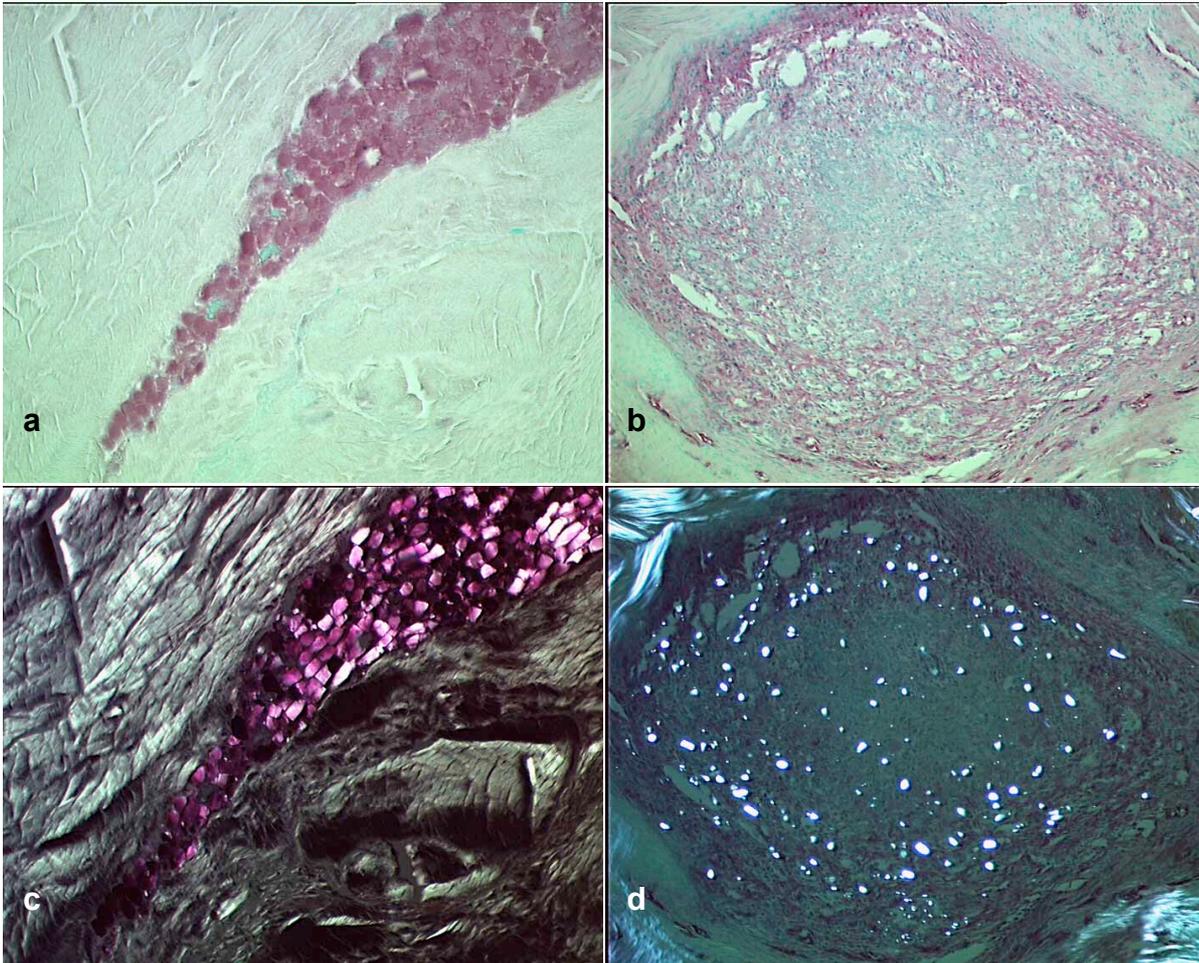
### **2.2.18 Konventionelle Lichtmikroskopie**

#### **Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild**

Im nativen vorderen Kreuzband (VKB) wurde eine signifikant höhere Gesamtzellzahl (1141,2 / mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur Flexorsehne (345,8 / mm<sup>2</sup>, p = 0,002) gezählt. Die Fibroblasten des VKB zeigten in der Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung im Gegensatz zur Flexorsehne mehr ovoide Zellkerne, deren Fibroblastenzellkerne streng spindelförmig imponierten (Abbildung 1-21 und 1-22, Seite 24). In der Trichromfärbung nach Masson-Goldner stellte sich sowohl im VKB als auch in der Flexorsehne ein straffer paralleler Kollagenfaserverband dar. Dieser Verband ist von bindegewebigen Septen durchzogen, die das intraligamentäre Kapillarnetz von den kollagenen Fasern trennt. Insgesamt erschien der Anteil der bindegewebigen Septen in der Flexorsehne geringer.

In der Degenerationsphase nach 3 Wochen zeigten sich in der konventionellen Lichtmikroskopie innerhalb der Kontrollgruppe große Bezirke avitalen Gewebes mit einem kompletten Zellverlust. Lediglich in der Peripherie des Transplantates konnte hyperzelluläres und hypervaskuläres Granulationsgewebe nachgewiesen werden. In vielen Bereichen konnte der, als Trägermedium eingebrachte Faden (ohne PDGF) noch mit einer kristallinen Struktur nachgewiesen werden (Abbildung 3-3 a+c S.56). Im Vergleich dazu zeigte die Studiengruppe eine stärkere Ausbildung des peripheren Granulationsgewebes, das zudem bereits fingerförmig von peripher nach zentral in das Transplantat einwuchs. Der hier eingebrachte, mit PDGF beschichtete Faden konnte immer wieder im Zentrum eines hyperzellulären und hypervaskulären Granulationsgewebes nachgewiesen werden (Abbildung 3-3 b+d, S.56). Diese Inseln hohen Zell- und Gefäßreichtums waren Ursprung für kleine Granulationsstraßen, die in das Zentrum des Transplantates hineinwuchsen (Abbildung 3-4, S.57).

Abbildung 3-3



3-3: **a** Transplantat der Kontrollgruppe nach drei Wochen (Immunhistochemie F.VIII 200x): Es sind keine Fibroblasten oder Gefäßeinsproßungen vorzufinden. Lediglich die kristalline Struktur des Fadens stellt sich ohne ein Zeichen der Resorbtion dar.

**b** Transplantat der Studiengruppe nach drei Wochen (Immunhistochemie F.VIII 200x): Es findet sich eine große Anzahl von Fibroblasten und Makrophagen sowie eine intensive Vaskularisierung des fadenumgebenden Bereiches.

**c** und **d** zeigen die jeweiligen Bildausschnitte im Polarisationslicht (polarisiertes Licht 200x): Hierbei zeigt **d** den bereits in Auflösung befindlichen Faden. Die Fadenpartikel sind wesentlich kleiner und über einen großen Bereich verteilt.

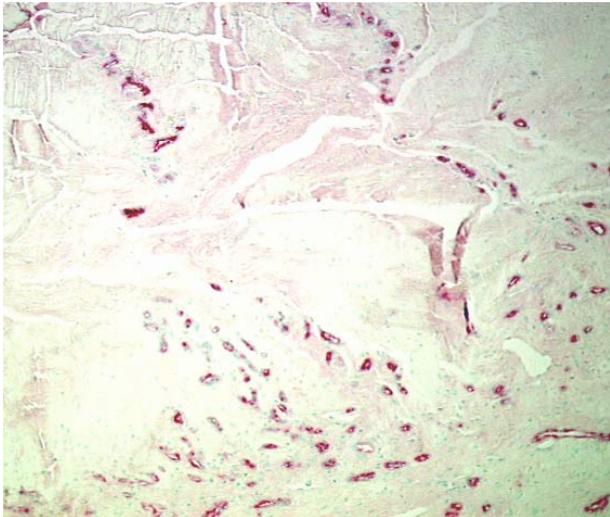
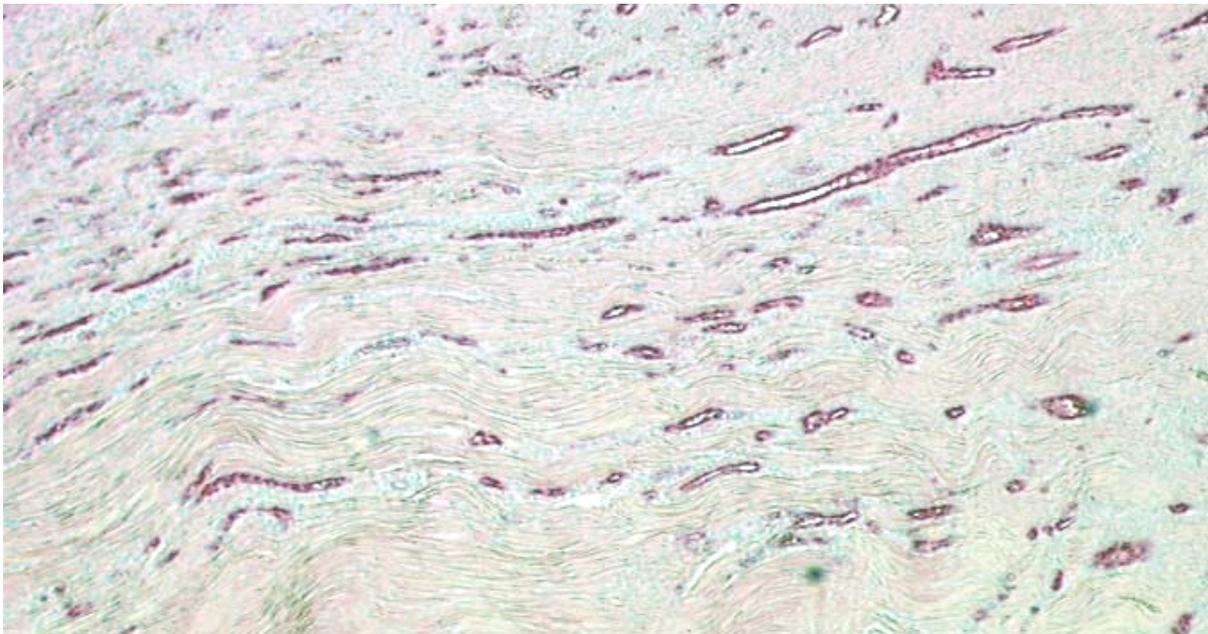


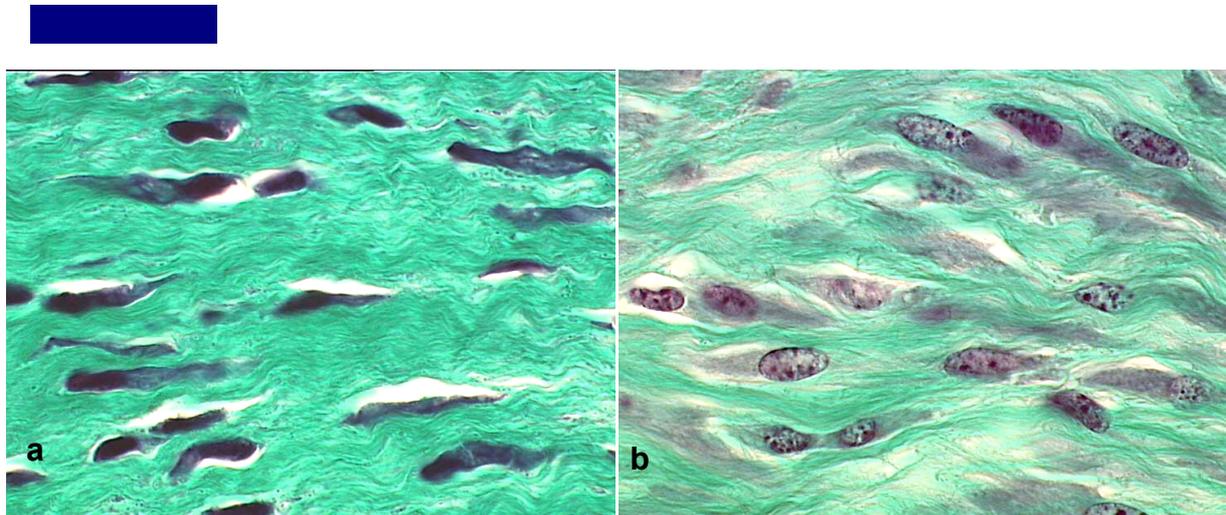
Abbildung 3-4: Gefäßdarstellung in einwachsenden mässig vaskularisierten Bindegewebssträngen, die aus der Peripherie in das nekrotische Zentrum des Transplantates einwachsen (Immunhistochemie, F.VIII 50x, Gegenfärbung mittels Lichtgrün)

In der reparativ-proliferativen Phase nach 6 Wochen zeigte sich in der konventionellen Lichtmikroskopie in beiden Gruppen ein hyperzelluläres und hypervaskuläres Granulationsgewebe, welches fingerförmig von peripher nach zentral in das Transplantat einwuchs (Abbildung 3-5).



3-5: Transplantat, 6 Wochen nach VKB-Ersatz (Immunhistochemie, F.VIII, 100x): Hyperzelluläre Bindegewebsstränge mit massiver Hypervaskularisierung durchziehen „nicht remodelierte“ Gebiete.

Intraligamentär dominierten innerhalb der Kontrollgruppe Zellen mit meist schlanken bis ovoiden Zellkernen. Im Gegensatz dazu überwiegen innerhalb der Studiengruppe ovoide / spherioide Fibroblasten mit aufgelockerten Zellkern typisch



3-6: Transplantat, 6 Wochen nach VKB-Ersatz (Masson-Goldner Trichromfärbung (MG)):  
**a** Transplantat der Kontrollgruppe: Spindelförmigen Fibroblasten mit sehr dichtem Zellkern.  
**b** Transplantat der Studiengruppe: Große, spherioide Fibroblasten mit aufgelockerten Zellkern typisch für intensiv proliferative Tätigkeit und starker Proteinsynthese.

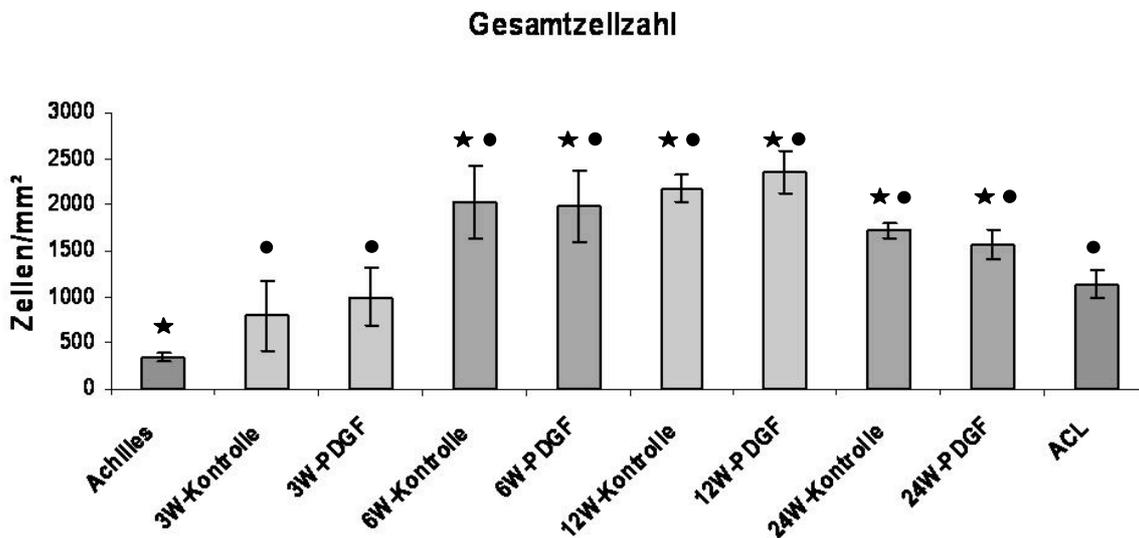
für intensiv proliferative Tätigkeit und starker Proteinsynthese (Abbildung 3-6).

Weiterhin zeigten sich noch verbliebene hypozelluläre „nicht remodelierte“ Bereiche, die nur wenig vaskularisiert waren.

Die Transplantate zeigten aufgrund des hyperzellulären Granulationsgewebes nach 6 Wochen mit 2032 Zellen /mm<sup>2</sup> (Kontrollgruppe) und 1993 Zellen /mm<sup>2</sup> (Studiengruppe) eine signifikant höhere Gesamtzellzahl sowohl gegenüber der Flexorsehne als auch der 3-Wochengruppe auf ( $p = 0.002$ ). Innerhalb der 6-Wochengruppe konnte kein Unterschied in der Zellzahl nachgewiesen werden (Schaubild 3-1, Seite 58).

Nach 12 Wochen Standzeit waren weiterhin hyperzelluläre Transplantate zu beobachten. Das Granulationsgewebe wies jedoch bereits eine regional beginnende Ordnung der kollagenen Fasern auf. Die Gesamtzellzahl zeigte zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen den größten Wert. Während in der Kontrollgruppe durchschnittlich 2174 Zellen /mm<sup>2</sup> gefunden werden konnten, zeigten sich in der Studiengruppe noch 2355 Zellen /mm<sup>2</sup>. Gefäße waren zunehmend nur noch in bindegewebigen Septen

zwischen den Kollagenfasern nachzuweisen. Durch diese Trennung konnten in einigen Regionen bereits Myofibroblasten auf Grund ihrer interfaszikulären Lage



★ signifikant gegenüber VKB,  $p \leq 0,05$

● signifikant gegenüber Flexorsehne,  $p \leq 0,05$

Schaubild 3-1: Gesamtzellzahl/ mm<sup>2</sup> im VKB, der Flexorsehne der Kontroll- und Studiengruppe zu verschiedenen Standzeiten.

von Gefäßzellen und Perizyten unterschieden werden. Sie wiesen zu diesem Zeitpunkt alle Kernmorphologien auf.

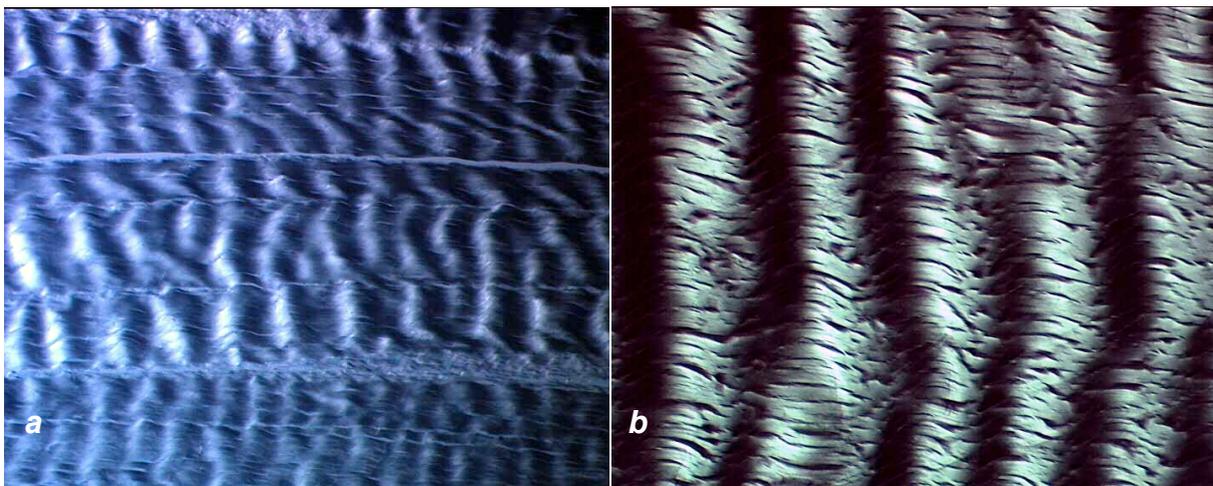
Nach 24 Wochen nahm die Gesamtzellendichte in beiden Gruppen deutlich ab. Die Kontrollgruppe mit 1721 Zellen /mm<sup>2</sup> und insbesondere die Studiengruppe mit 1567 Zellen /mm<sup>2</sup> näherten sich wieder offensichtlich der normalen Zellzahl eines VKB mit 1141 Zellen /mm<sup>2</sup> an. Verglichen mit dem Transplantat zum Zeitpunkt Null (Flexorsehne), zeigte sich die Gesamtzellzahl signifikant erhöht ( $p = 0.004$ ). Die nur noch vereinzelt auftretenden Gefäße waren durch bindegewebige Septen von den kollagenen Fasern getrennt.

Zu keinem Zeitpunkt konnte ein Unterschied in der Zellzahl zwischen Kontroll- und Studiengruppe nachgewiesen werden.

Als Ausdruck der intensiven proliferativen Tätigkeit und starken Proteinsynthese konnten ausschließlich in der Studiengruppe nach 6 und 12 Wochen ovoide / spheroidale Fibroblasten nachgewiesen werden.

## Crimp

Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie konnte eine Kollagenwellenlänge von  $30,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$  im nativen vorderen Kreuzband gemessen werden. Diese war signifikant kürzer als im Flexorsehnentransplantat  $76,6 \pm 8,6 \mu\text{m}$  (Abbildung 3-7).

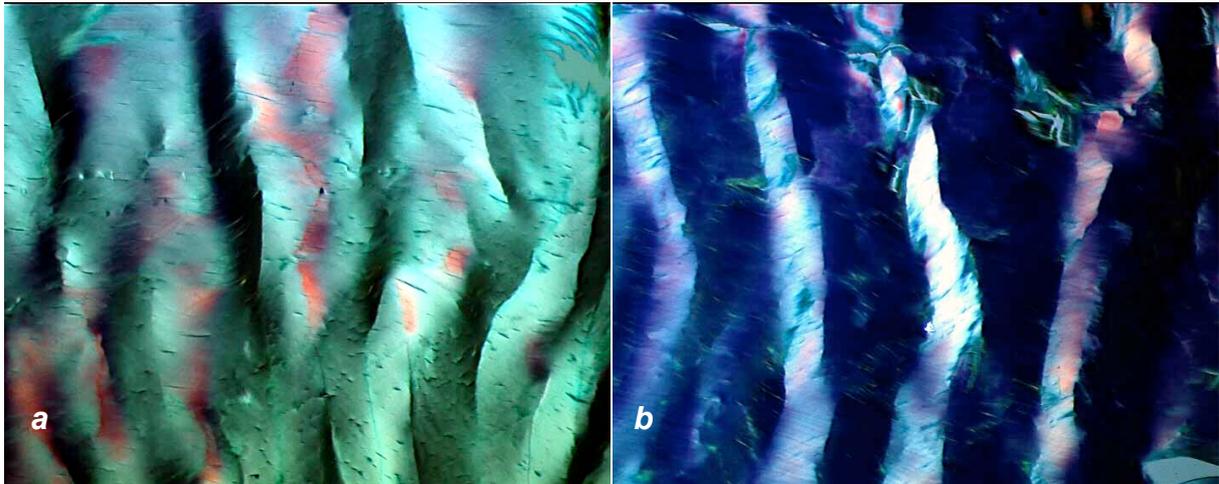


3-7 **a**: Natives vorderes Kreuzband unter polarisiertem Licht: Es imponiert eine hochfrequente, regelmäßige Kollagentertiärstruktur (polarisiertes Licht 200x). **b**: Sehne des M. flexor digitorum superficialis unter polarisiertem Licht: Es lässt sich im Vergleich zum nativen VKB eine deutlich

### Transplantat nach 3 Wochen Standzeit:

In der Nekrose-Phase der Transplantateinheilung zeigte sich nach 3 Wochen in der Kontrollgruppe eine Kollagenwellenlänge von  $82,3 \mu\text{m}$  und in der Studiengruppe von  $119,9 \mu\text{m}$  mit einem signifikanten Unterschied im Vergleich der Kontroll- zur Studiengruppe ( $p=0.004$ ) und im Vergleich der 3-Wochen Studiengruppen mit der Struktur der Flexorsehne ( $p=0.002$ ) (Transplantat zum Zeitpunkt Null).

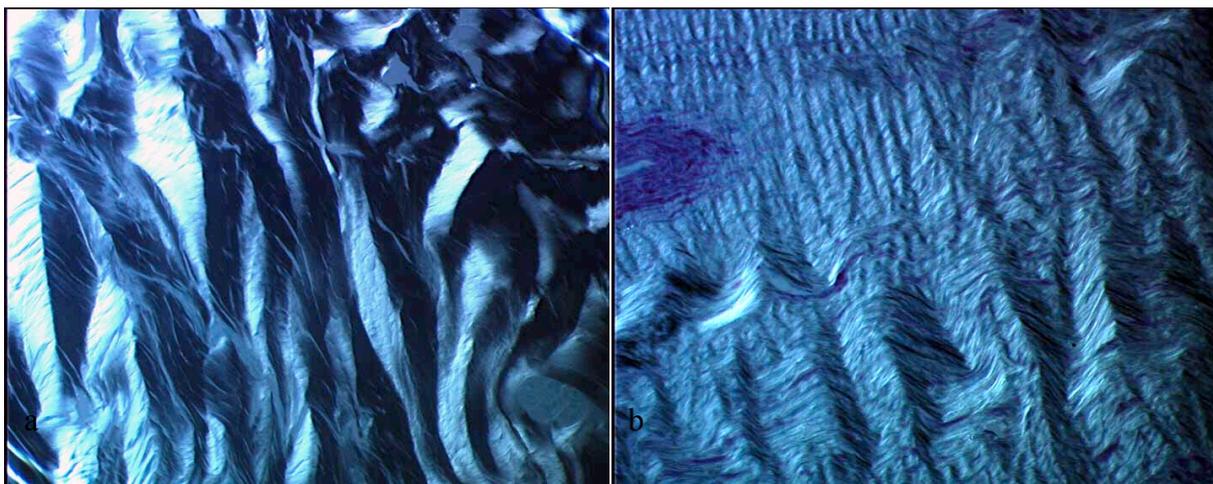
Auffällig ist jedoch eine Entrundung der Wellenstruktur mit Kannten und scharfen Krümmung in beiden 3-Wochen-Gruppen im Vergleich zur Flexorsehne. Die Studiengruppe hebt sich durch eine Senkung der Wellenfrequenz von der Kontrollgruppe ab (Abbildung 3-8, Seite 61).



3-8 **a**: Kontrollgruppe (3 Wochen) Polarisations-Licht (x200): Es imponiert eine unregelmäßige, niederfrequente, Kollagentertiärstruktur. Die Wellenform ist entrundet mit Kanten und scharfer Krümmung **b**: Studiengruppe (3 Wochen) Polarisations-Licht (x200): gestreckte Wellenstruktur mit signifikanter Verminderung der Frequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### Transplantat nach 6 Wochen Standzeit:

In der frühen Phase der Transplantateinheilung zeigte sich nach 6 Wochen in der Kontrollgruppe eine Kollagenwellenlänge von 87,6  $\mu\text{m}$  und in der Studiengruppe von 83,3  $\mu\text{m}$  ohne einen signifikanten Unterschied (Abbildung 3-9, Seite 61).



3-9 **a**: Kontrollgruppe (6 Wochen) Polarisations-Licht (x200): Große Diversität der Kollagentertiärstruktur innerhalb des Transplantates mit sehr inhomogener Kollagenstruktur. Neben neu gebildetem hochfrequentem Granulationsgewebe bestehen große Abschnitte von avaskulärem und niedrigfrequentem "altem" Transplantatgewebe.

**b**: Studiengruppe (6 Wochen) Polarisations-Licht (x200): *Hauptsächlich* neu gebildete Bandstruktur aus hochfrequentem Granulationsgewebe.