

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchte Tiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 32 zweijährige weibliche Schafe der Rasse Merino mit einem durchschnittlichen Gewicht von 65 kg +/- 10 %. Die Tiere wurden eingangs tierärztlich untersucht. Nur gesunde, nicht trächtige Tiere gelangten in den Versuch. Am Tag der Einstellungsuntersuchungen erhielten die Tiere das Präparat Iliren® (PGF 2a, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), um eine eventuelle, nicht diagnostizierbare Frühträchtigkeit abzubrechen. Nach Behandlung gegen Ektoparasiten mit Ivomec® (Ivermectin, Merial Deutschland, Halbergmoos, Deutschland) und Fasinex® (Triclabendazol, Novartis Tiergesundheit AG, Wehr / Baden, Deutschland), erhielten sie zur Stärkung ihrer Paraimmunität das Präparat Baypamune® (Immunmodulator, Parapox ovis, Bayer Tiergesundheit AG, Leverkusen, Deutschland). Um postoperativ Beunruhigungen zu vermeiden und das Aggressionspotential in der Gruppe gering zu halten, wurden nur weibliche Tiere in den Versuch aufgenommen. Nach dem Eingriff wurden die Tiere in Innenhaltung der tierexperimentellen Einrichtung der Charité – Campus Virchow-Klinikum auf Einstreuspänen und Stroh gehalten. Der Wechsel der Einstreu erfolgte zweimal wöchentlich. Zwei Wochen post operationem wurden die Tiere in Freilandhaltung verlegt. Die Tiere erhielten zweimal täglich Heu. Wasser und Minerallecksteine standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Der Versuch wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi, Berlin) unter der amtlichen Tierversuchsnummer G 0013/03 genehmigt.

#### 3.2 Gruppenplan

Die 32 Schafe wurden in vier Gruppen zu je acht Tieren eingeteilt. Die Gruppe eins erhielt den mit mineralisiertem Kollagen augmentierten Harms-Cage. In der Gruppe zwei wurden die Tiere neben dem mit mineralisiertem Kollagen augmentierten Harms-Cage mit autologem Thrombozytenkonzentrat (PRP) versorgt. Die Gruppe drei erhielt zusätzlich den Wachstumsfaktor BMP-2. Das mineralisierte Kollagen in der Gruppe vier wurde vor dem Einsetzen in den Harms-Cage mit cRGD beschichtet und dann den Tieren implantiert.

Daraus ergibt sich die folgende Gruppeneinteilung:

**Tabelle 1 Gruppeneinteilung**

Gruppe	Implantat	Beschichtung	Standzeit	Tierzahl
1	Harms-Cage + mineralisiertes Kollagen (HC + m.K.)	keine	12 Wochen	8
2	HC + m.K.	PRP	12 Wochen	8
3	HC + m.K.	BMP-2	12 Wochen	8
4	HC + m.K.	cRGD	12 Wochen	8
5	kein	Keine		8

Als Kontrollgruppe zur histologischen Auswertung wurde zusätzlich eine Gruppe 5 mit histologischen Präparaten von 8 nativen Bewegungssegmenten C3 / C4 von zweijährigen Merino-Schafen hinzugezogen. Die Wirbelsäulen stammten vom Schlachthof.

### 3.3 Implantat

#### 3.3.1 Der Harms-Cage



**Abb. 7 Harms-Cage**, Fa. DePuy AcroMed: Durch Einbringen des mineralisierten Kollagens (weißer Füllstoff in der Cage Pore) wurde der Harms Cage augmentiert

Zum Ersatz der Bandscheibe wurde der von der Firma DePuy AcroMed (Kirkel-Limbach, Deutschland) vertriebene Harms-Cage (Abb. 7) verwendet und mit mineralisiertem Kollagen der Firma Biomet Merck BioMaterials GmbH (Darmstadt, Deutschland) augmentiert. Der Harms-Cage besteht aus zylindrischem Titan-Mesh-Geflecht mit 14 mm im Durchmesser und ist 8 mm hoch. Er besitzt eine Endplatten-Implantat-Kontaktfläche von 0,1 cm<sup>2</sup>. Die zentrale Pore misst 0,63 cm<sup>2</sup>. Das Augmentat wird passgenau in die Cage-Pore eingebracht und dabei nicht komprimiert. Die Präparate wurden bereits zusammengesetzt und steril verpackt geliefert.

### 3.3.2 Implantat-Augmentierung

#### Wachstumsfaktor

Das BMP-2 (Bezug über Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland) wurde uns von der Firma Biomet Merck BioMaterials GmbH zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um rekombinantes humanes BMP-2 in einer Konzentration von 100 µg / ml. Unter sterilen Kautelen wurden 1,5 ml auf den kollagenen Carrier gegeben, der die Lösung vollständig schwammartig aufnahm. Damit wurden insgesamt 150 µg BMP-2 aufgetragen.

#### Autologes Thrombozytenkonzentrat – Platelet rich Plasma (PRP)

Das autologe Thrombozytenkonzentrat wurde intra operationem unter sterilen Bedingungen gewonnen. Dazu wurde das Gravitational Platelet Separation System (GPS<sup>TM</sup>-System) mit dem dazugehörigen GPS<sup>TM</sup> Disposable Kit der Firma Biomet Merck BioMaterials GmbH verwandt. Nach Punktion der Vena jugularis externa sinistra mit einer Butterfly Kanüle (Gauge 10, Firma Braun, Melsungen, Deutschland), wurden 54 ml Vollblut gewonnen und in einer 60 ml Spritze (enthalten im GPS<sup>TM</sup> Disposable Kit) aufgenommen, die 6 ml einer 3,13 % Natriumcitrat-Lösung (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) enthielt. Durch sorgfältiges Schwenken wurde das Blut mit der Natriumcitrat-Lösung vermischt. Nach Überführung der 60 ml Citrat-Blut in ein Disposable Separation Tube wurde dieses mittels GPS<sup>TM</sup> -Zentrifuge bei  $3,2 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$  13 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Vorgang trennte ein Schwimmer die Erythrozyten von den Thrombozyten und dem Buffy Coat. Der Plasmaüberstand wurde abgezogen und verworfen. Die Thrombozyten wurden resuspendiert und separat gewonnen. Man erhielt 6 bis 7 ml Thrombozytenkonzentrat. Das so gewonnene Konzentrat wurde zur Aktivierung mit 1 ml Thrombin-Lösung (bovines Thrombin, Bezug über Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Das Thrombin wurde zuvor in 10%iger CaCl<sub>2</sub>-Lösung so

gelöst, dass man eine Einsatzkonzentration von 1000 IE / ml (die fertige Thrombinlösung wurde uns durch die Biomet Merck BioMaterials GmbH, Darmstadt, Deutschland zur Verfügung gestellt) erhielt. Durch Zufügen der Thrombin-Lösung wurde die Aggregation der Thrombozyten ausgelöst, die so zur Bildung des PRP-Gels führte. Dieses Gel wurde auf das Cage-Implantat verbracht, welches im Anschluss in das Bandscheibenfach C3 / C4 eingesetzt wurde.

Von jedem Tier wurde zusätzlich eine Probe des Vollbluts und des PRP auf Zahl der Thrombozyten im Labor untersucht (siehe Anhang Tabelle 20).

### Zyklisches RGD-Peptid (cRGD)

Das mineralisierte Kollagen der Präparate der Gruppe vier wurde durch die Biomet Merck BioMaterials GmbH mit cRGD beschichtet und in den Cage eingebracht. Nach Sterilisierung der Implantate wurden sie bereitgestellt.

## 3.4 Operation

### 3.4.1 Operationsvorbereitung

Die Tiere wurden einen Tag vor Operationsbeginn in einem Auslauf ohne Futter mit Wasserversorgung untergebracht, um eine 24 stündige Nahrungskarenz zu gewährleisten. Die Narkose wurde mit 0,5-1,5 g Thiopenthal-Natrium (Trapanal®, Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland) und 0,1 mg Fentanylhydrochlorid (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) durch intravenöse Injektion unter Kontrolle der Reflexe eingeleitet, bis die Intubationsfähigkeit erreicht wurde. Das Tier wurde im sedierten Zustand auf den Operationstisch gelegt und in Rechtsseitenlage verbracht. Die endotracheale Intubation erfolgte im Anschluss mit einem 8 bzw. 9 mm starken Tubus (Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland). Nach Überprüfung der korrekten Lage des Tubus wurde dieser fixiert. Zur Vermeidung des Aufgasens des Pansens (Pansentympnie) wurde den Tieren eine Magensonde (Rüsch Ø 14 mm) gelegt. Das Beatmungsgerät (Firma Draeger, Lübeck, Deutschland) wurde auf kontrollierte Atmung mit einem Atemzugvolumen von 600-700 ml und einer Atemfrequenz von 12 Atemzügen je Minute eingestellt und an den Tubus angeschlossen. Die Narkose wurde mit einem Trägergasgemisch aus 40 % Sauerstoff und 60 % Lachgas, sowie 1-2 % Isofluran (Isofluran-Lilly®, Lilly, Bad Homburg, Deutschland) aufrechterhalten. Zur Überwachung der O<sub>2</sub>-Sättigung und des CO<sub>2</sub>-Gehalt des Bluts sowie der Herzfrequenz und des Elektro-Kardiogramm (EKG) wurden die Tiere an ein Monitoring

(Anästhesie Sulla 800V, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) geschlossen. Die Analgesie wurde bei Bedarf durch die intravenöse Gabe von Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) verstärkt. Zur antibiotischen Prophylaxe erhielten die Tiere 2,2 g Amoxicillin (Augmentan i.v.®, SmithKline Beecham Pharma, München, Deutschland) als intravenöse Kurzinfusion. Jedem Tier wurde über die Dauer der Operation 1000 ml kristalloide Infusionslösung (Thomæjonin® Infusionslösung, DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland) infundiert. Dies diente der Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts.

Nach Abpolsterung der unten liegenden Extremitäten wurde das jeweilige Tier auf dem Operationstisch fixiert und das Operationsfeld geschoren und gereinigt.

Zur Bestimmung der präoperativen Bandscheibenraumhöhe wurden seitliche digitale Röntgenaufnahmen (Röntgengerät: Mobilett Plus, Siemens-Elma AG, Solna, Schweden; digitale Röntgenfilme: Fuji CR 24x30, Fuji, Düsseldorf, Deutschland) mit einer Strahlendosis von 60 kV und 30 mAs angefertigt.

Im Anschluss wurde das Tier in den Operationssaal gebracht und für den Eingriff mit sterilen Tüchern abgedeckt.

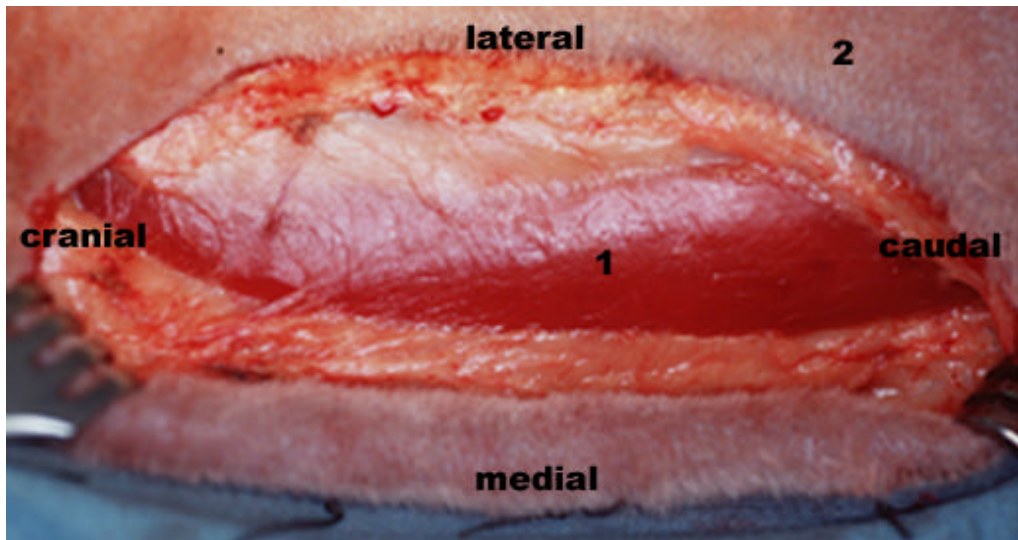
### 3.4.2 Operativer Eingriff

#### 3.4.2.1 Vorbereitung des Implantats

Die Implantate wurden steril verpackt zur Verfügung gestellt. Die Cages der Gruppen 2 und 3 wurden gemäß den Angaben unter Punkt 3.3.2 zusätzlich augmentiert.

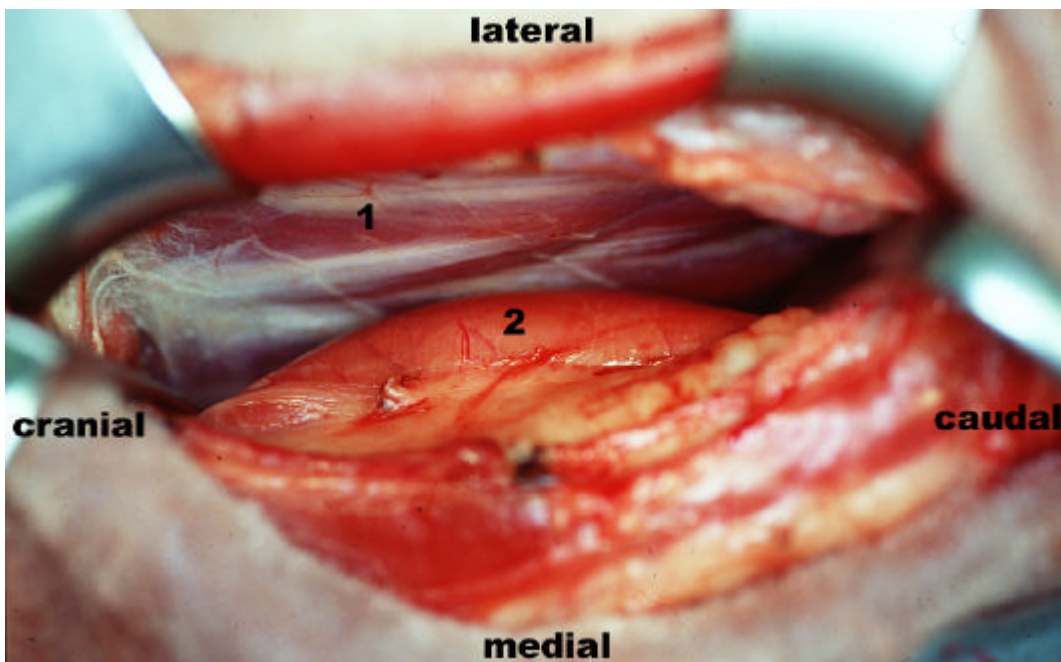
#### 3.4.2.2 Spondylodese

Das zu operierende Tier befand sich in Rechtsseitenlage steril abgedeckt. Dem operativen Zugang diente die linke Halsseite. Durch einen 12 cm langen Schnitt entlang des Vorderrandes des M. sternocleidomastoideus wurde die Haut durchtrennt. Nach Durchtrennung des Unterhautfettgewebes und der oberflächlichen Faszie konnte der M. sternocleidomastoideus dargestellt werden (Abb. 8).



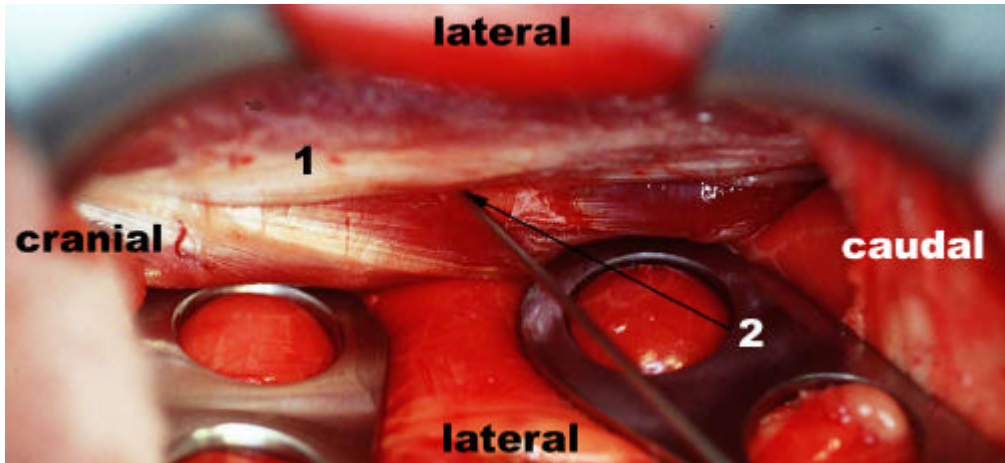
**Abb. 8 Operations-Situs, nach Hautschnitt:** Musculus sternocleidomastoideus (1), Haut (2)

Der M. sternocleidomastoideus wurde mittels Langenbeckhaken angehoben und nach dorsolateral retrahiert. Durch stumpfe Präparation in die Tiefe, unter Schonung der Trachea, des Oesophagus und der Vagina carotica (V. jugularis interna, A. carotis communis, Truncus vagosympathicus) konnte die prävertebrale Muskulatur dargestellt und das Wirbelsäulensegment C3 / C4 aufgesucht werden (Abb. 9).



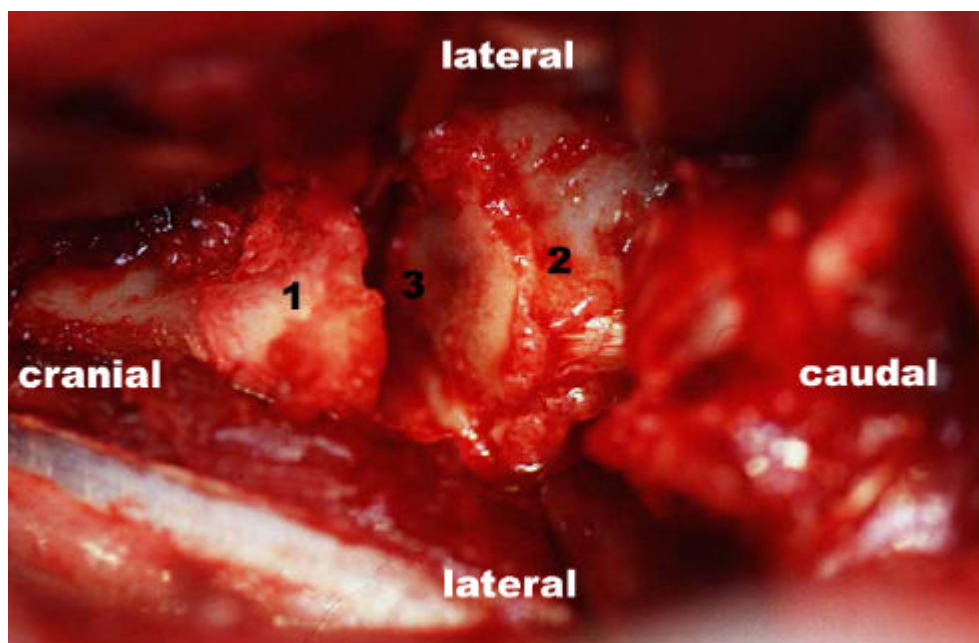
**Abb. 9 Operations-Situs, prävertebrale Muskulatur:** Musculus longus colli (1), Oesophagus (2)

Zur Lokalisierung des Bandscheibenfachs C3 / C4 wurde das Segment mit Hilfe eines Kirschner-Drahts markiert und die Lage über einen Bildwandler (SIREMOBIL Iso-C 3D , Siemens AG, Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) kontrolliert (Abb. 10).



**Abb. 10 Operations-Situs, Bestimmung des Bandscheibenfachs C3 / C4:** Musculus longus colli (1), Kirschner Draht in Bandscheibenfach C3 / C4 (2)

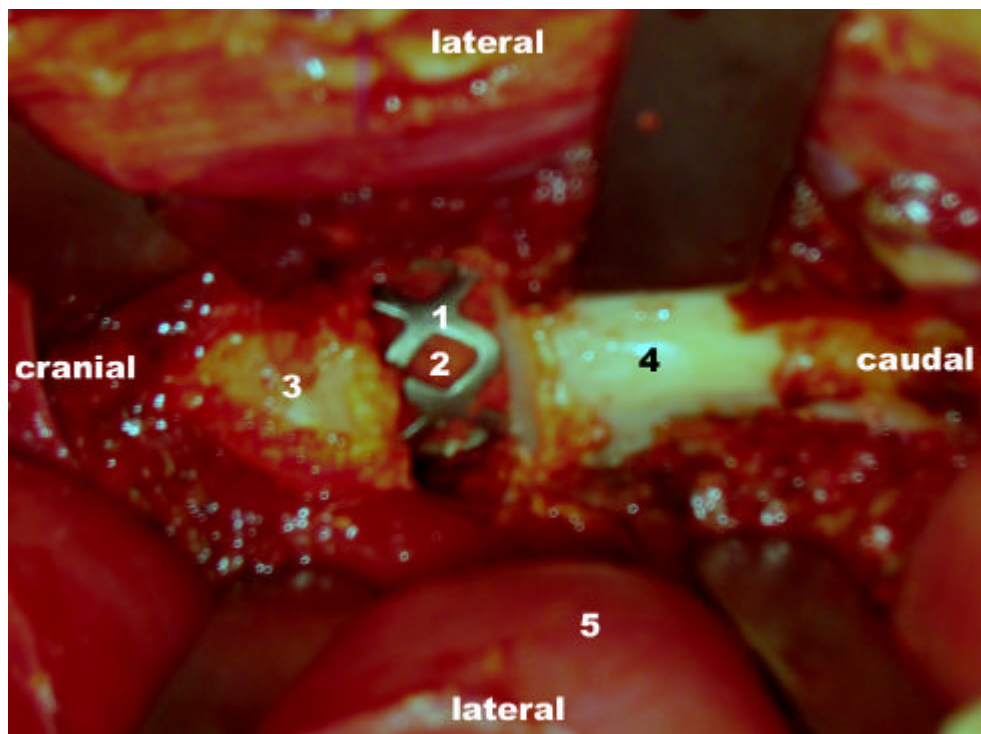
Bei korrekter Lage erfolgte die Spaltung des M. longus colli mittels eines Elektromessers. Nach Darstellung des Ligamentum longitudinale ventrale wurde dieses horizontal durchtrennt und das Bandscheibenfach wurde komplett mit Hilfe eines Luers sowie eines scharfen Löffels diskektomiert (Abb. 11).



**Abb. 11 Operations-Situs, nach Diskektomie:** C3 (1), C4 (2), Bandscheibenfach aufgespannt (3)



Deck- und Bodenplatte wurden durch Dekortikation mittels Hammer und Meißel geebnet. Dabei wurden Knorpelchips abgeschlagen, bis leichte Blutungen auftraten. Nach Spülung des Bandscheibenfachs mit Natriumchloridlösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun®, B.Braun, Melsungen, Deutschland) wurde das Bandscheibenfach mittels Distraktor aufgespannt und das jeweilige Implantat zentral und 2 mm hinter der Vorderkante der Wirbelkörper-Endplatten platziert (Abb. 12). Die Lage des Implantats wurde mit Hilfe des Bildverstärkers (SIREMOBIL Iso-C 3D, Siemens AG, Medical Solutions, Erlangen) kontrolliert.



**Abb. 12 Operations-Situs, nach Implantation:** Harms-Cage (1), mineralisiertes Kollagen (mit Blut aus dem Defekt vollgesogen, 2), Halswirbel drei (3), Halswirbel vier (4), Oesophagus (5)

Im Anschluss erfolgte die Naht der prävertebralen Muskulatur und der darauf folgenden Muskelschichten, eine Fasziennaht, sowie eine Subkutannaht und eine Hautnaht. Nach Anlegen eines Verbandes wurde das Tier aus der Narkose ausgeleitet. Die Extubation und das vollständige Erwachen wurde tierärztlich überwacht. Von 32 Schafen erholten sich 31 ohne Komplikationen innerhalb eines Tages von der Operation. Bei einem Tier der Gruppe 4 kam es zu postoperativen Komplikationen (siehe 4.1 Operationsbefunde). Futter und Wasser standen den Tieren post operationem zur freien Verfügung.

Während der folgenden fünf Tage erhielten die Tiere täglich 0.5 g Metamizol-Natrium i.m. (Novaminsulfon®, Lichtenstein, Fürstenfeldbruck, Deutschland). Der Verband wurde dabei



täglich gewechselt und am fünften Tag durch einen Sprühverband ersetzt. Die kutanen Fäden wurden am Tag 14 post operationem entfernt. Begleitend erfolgte die Kontrolle des Allgemeinzustands, der Körpertemperatur (rektal) und des Gewichts.

### 3.5 Entnahme und Aufbereitung der Proben

#### 3.5.1 Euthanasie und Probengewinnung

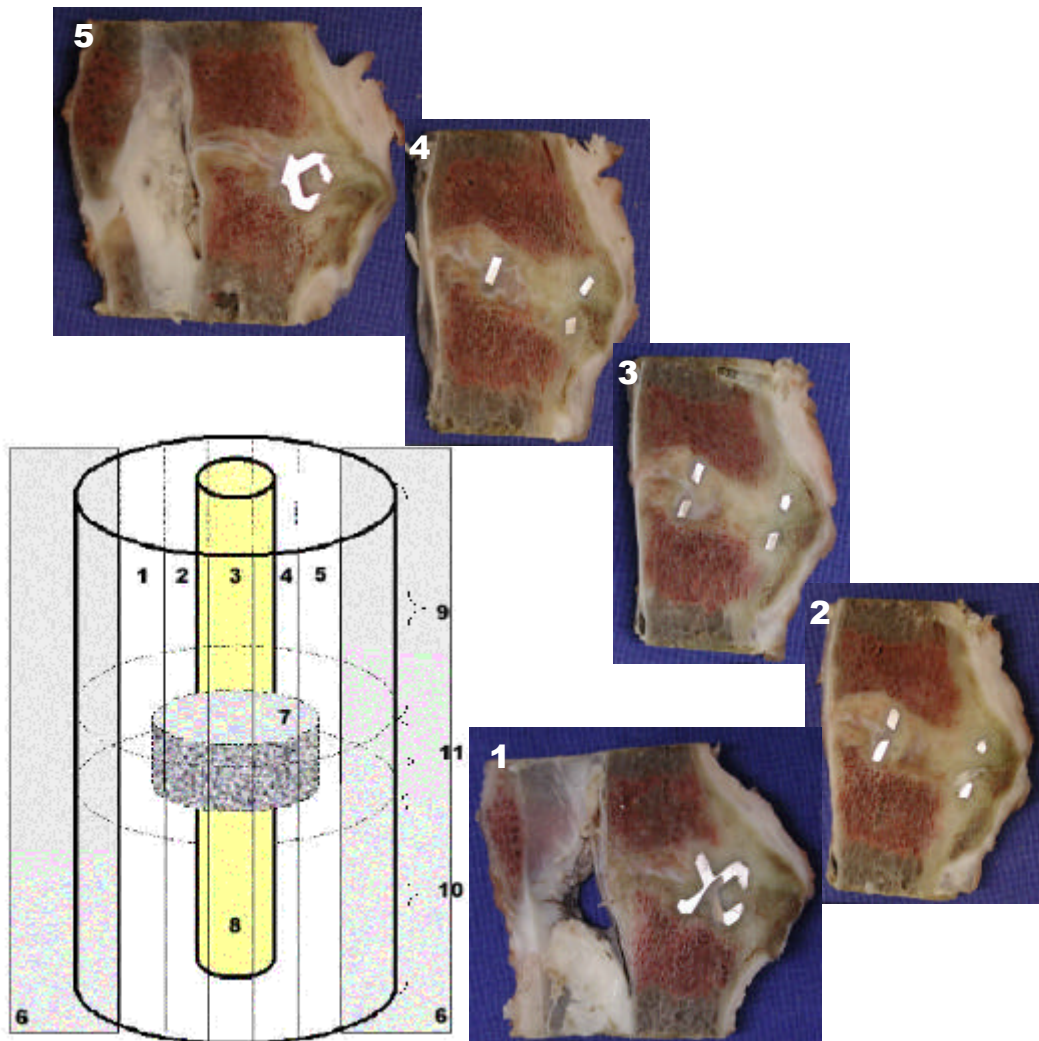
Nach einer Standzeit von 12 Wochen post operationem wurden die Tiere euthanasiert. Die Schafe wurden mit 1 g Thiopenthal-Natrium (Trapanal®, Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland) und 0,1 g Fentanylhydrogencitrat (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) sediert und anschließend mit intravenöser Kaliumchlorid-Gabe getötet. Der Tod wurde durch Auskultation des Herzens (Herzstillstand) festgestellt.

Aus dem in Seitenlage befindlichen Tier wurde die Halswirbelsäule vom Caput occipitale bis zum ersten Thorakalwirbel entnommen und von Weichteilen befreit.

#### 3.5.2 Präparation der Halswirbelsäule

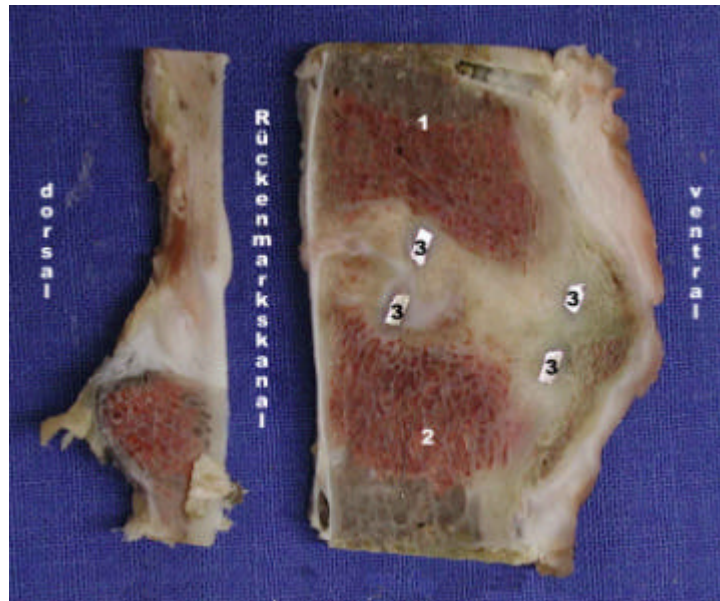
Bindegewebe und die gesamte Muskulatur wurden von der entnommenen Halswirbelsäule abpräpariert. Die Wirbelkörper C3 und C4 wurden mittels Knochensäge in der Mitte der Corpora vertebrae so getrennt, dass das Segment C3 / C4 isoliert werden konnte.

3.5.3 Sägen des Halswirbelsäulensegments drei / vier



**Abb. 13 Sägeschema:** Segmente 1 bis 5 (1-5), grau unterlegte Flächen wurden verworfen (6), Implantat (7), Wirbelkanal mit Rückenmark (8), C3 (9), C4 (10), ehemaliges Bandscheibenfach (11)

Mit Hilfe einer wassergekühlten Säge (Makrotrennschleifsystem, Firma Exakt, Norderstedt, Deutschland) wurde das Segment sagittal von ventral nach dorsal in fünf 4 mm starke Scheiben gesägt (Abb. 13).



**Abb. 14 Schnittbild des mittleren Säge-Präparats** (Segment 3), Dargestellt sind der Wirbelkörper C3 (1), der Wirbelkörper C4 (2) und Anschnitte des Cage-Implantats (3). Links im Bild befindet sich der dazugehörige Wirbelkörperbogen, der mit den Wirbelkörpern den Rückenmarkskanal bildet.

Die mittlere Scheibe (Abb. 13-3, Abb. 14) wurde für die histologische Aufarbeitung genutzt. Die übrigen Präparate dienten als Ersatzpräparate (Abb. 13-4,5) weiterführenden Untersuchungen, wie der Anfertigung immunhistologischer Präparate (Abb. 13-1,2), die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind. Das Titan-Implantat wurde im Anschluss vorsichtig entfernt, um das Präparat später mit einem Hartschnittmikrotom bearbeiten zu können. Die Restgewebe (laterale Wirbelkörperflächen) wurden verworfen.

### 3.5.4 Fixierung und Einbettung

Um postmortal einsetzende Veränderungen (Autolyse bzw. Heterolyse) der Präparate zu verhindern, war es notwendig diese zu fixieren. Die Fixierung erfolgte für fünf Tage in isotoner Formaldehyd-Alkohol-Lösung (Zusammensetzung: 324 ml Formol 34%ig, 540 ml Ethanol 100%ig, 130 ml Barbitol-Natrium-Puffer ph 7,4 / 01molar, 6 g Glukose). Im Anschluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe nach folgendem Schema entfettet:

3 Tage	70 % Ethanol
3 Tage	80 % Ethanol
7 Tage	80 % Ethanol
7 Tage	96 % Ethanol
7 Tage	96 % Ethanol
7 Tage	100 % Ethanol
7 Tage	100 % Ethanol
7 Tage	100 % Ethanol

Die Ethanol-Verdünnungen wurden aus 100%igem Ethanol und mit einer entsprechenden Menge Aqua destillata hergestellt. Die Lagerung der Präparate erfolgte in luftdicht verschlossenen Gläsern. Zur optimalen Infiltration der Präparate wurden diese auf einem Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) platziert. Seine ständigen Schwingungen stellten die stetige Durchmischung und Benetzung der Präparate mit Ethanol sicher. Im Anschluss erfolgte die 12-stündige Lagerung der Präparate in 100%igem Xylol. Zur Einbettung wurde ein Kunststoff auf Methylmethacrylatbasis verwendet (Technovit 9100 neu, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland). Dieser Kunststoff wird aus drei Komponenten angesetzt: Das ist die Basislösung (Methylmethacrylat), ein Weichmacher, der dritte Bestandteil ist ein Aktivator. Die Herstellung von Präinfiltrations- und Basislösung sowie der Stammlösungen A und B erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Laut Beschreibung des Herstellers ist es möglich, bei Verwendung dieses Kunststoffes histologische Schnitte ab einer Dicke von 2 µm anzufertigen. Der Kunststoff wurde direkt vor dem Gebrauch angefertigt. Zur Erzielung einer optimalen Kunststoff-Infiltration wurden die Präparate vor dem Einbetten für 24 Stunden in Präinfiltrationslösung gelagert und anschließend für sieben Tage in Infiltrationslösung bei 8 °C verbracht. Die Behandlung gewährleistete, dass die Präparate vollständig mit Kunststoff durchtränkt waren. Zur Herstellung der Infiltrationslösung wurden Stammlösung A und Stammlösung B im Verhältnis 9:1 vermischt. Die Präparate wurden, mit der zu schneidenden Seite nach unten, in Kunststoffförmchen gelegt und sofort

mit dem Einbettmedium bedeckt und verschlossen. Zur Auspolymerisation ist eine Temperatur von 0 °C notwendig, darum wurden die Präparate für 24 Stunden auf Eis gelagert. Danach war der Kunststoff ausgehärtet und die Präparate konnten entnommen und weiter prozessiert werden.

### 3.5.5 Anfertigen der histologischen Präparate

Zum Einspannen in das Mikrotom mussten die Präparate zuvor mit Hilfe einer Tischarmleifmaschine (Phoenix 3000, Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf, Deutschland) in die entsprechende Form gebracht werden. Mittels Hartschnittmikrotom (Polycut S, Firma Cambridge Instruments, Heidelberg, Deutschland) wurden 6 µm starke Serien-Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträger verbracht. Zur Entfaltung und Glättung der Präparate wurden sie mit einer Streckflüssigkeit, bestehend aus sechs Teilen 70%igem Alkohol und vier Teilen Butoxyethylacetat, benetzt. Im Anschluss wurden sie mit einer Kunststoffolie (Kisol-Folie, Kettenbach, Eschenburg / Eibelshausen) bedeckt und 48 Stunden bei 60 °C gepresst und getrocknet.

### 3.5.6 Histologische Färbungen

Vorbereitend wurden die Schnitte entplastet. Das heißt, dass der Kunststoff aus dem Gewebe gelöst wurde, um es so für die Aufnahme des Farbstoffes zugänglich zu machen. Zur Entplastung wurden die Präparate dreimal für 30 min in Methoxymethylacetat (MEA; 2-Methoxymethylacetat, Merck 806061, Merck, Darmstadt, Deutschland) verbracht und anschließend mittels absteigender Alkoholreihe rehydriert.

#### 3.5.6.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Diese Färbung stellt Zellkerne bräunlich-schwarz dar, während das Zytoplasma ziegelrot gefärbt wird. Erythrozyten sind orangegelb. Bindegewebe und saure Mucopolysaccharide werden blassgrün dargestellt, während mineralisiertes Knochengewebe strahlend grün hervorsteht. Verkalktes Knochengewebe ist hellgrün und unverkalkte Osteoidsäume werden rot gefärbt.

### 3.5.6.2 Safranin-Orange / Lichtgrün-Färbung

Diese Färbung erlaubt die Darstellung bindegewebiger Strukturen und deren Unterscheidung von Knorpelgeweben. Bindegewebe sowie Knochengewebe werden grün dargestellt, während der Knorpel rot erscheint.

### 3.5.6.3 Kombinierte Färbung Safranin-Orange / von Kossa

Die kombinierte Färbung nach Safranin-Orange / von Kossa eignet sich zur Anfärbung von kalziumphosphathaltigen Geweben (Knochen), die schwarz erscheinen. Übrige Strukturen werden in unterschiedlichen Rottönen dargestellt.

### 3.5.6.4 Astrablaufärbung

Saure Mukopolysaccharide lassen sich mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau blau anfärben. Die Gegenfärbung erfolgt mit Kernechtrot.

## 3.5.7 Eindecken der Schnitte

Nach der histologischen Färbung wurden die Präparate in 100 % Xylol gelagert und anschließend unter Verwendung von Vitroclud® (Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) und Deckgläschen eingedeckt.

## 3.6 Histologische Auswertung

### 3.6.1 Semiquantitative Auswertung

Die Präparate wurden makroskopisch und mittels Lichtmikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgewertet.

Für die orientierende, lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Präparate gefärbt nach Masson-Goldner beurteilt. Sie wurden zunächst bei 5-facher Vergrößerung durchgemustert. Mit Hilfe dieser Übersichtsfärbung wurde das Gewebe im Intervertebralspalt identifiziert und in Relation zueinander gesetzt. Die Implantat-Knochen-Kontaktfläche wurde bei 40-facher Vergrößerung betrachtet und konnte so auf Fremdkörperreaktionen und deren typische Anzeichen hin untersucht werden. Bei der 40-fachen Vergrößerung wurde auch das Core-Material auf Vorhandensein, Grad und Form des Abbaus und etwaiger ausgelöster zellulärer



Reaktionen hin beurteilt. Weiterhin wurde besonderes Augenmerk auf die Vaskularisierung im Intervertebralspalt resp. an den Endplatten gelegt.

Die Beurteilung der Wirbelkörperfusion erfolgte anhand des Scores nach Lund und Mitarbeitern (1998). Der ehemalige Bandscheibenraum wurde dabei in drei zu untersuchende Areale eingeteilt: den Bereich dorsal des Harms-Cage, die Pore des Harms-Cage und den Bereich ventral des Harms-Cage. So war es möglich, den Ort des eingebrachten mineralisierten Kollagens (Cage Pore) gesondert zu beurteilen.

Die Sinterung wurde makroskopisch anhand des Einbrechens des Cages in die knöcherne Grundstruktur des Wirbelkörpers beurteilt und mit Hilfe der Safranin-Orange / von Kossa gefärbten Schnitte ausgemessen (Abb. 15). Ein Cage gilt als gesintert, wenn der Kontaktbereich zwischen Cage und Wirbelkörper über das Niveau der Extremitas caudalis des Halswirbels drei bzw. der Extremitas cranialis des Halswirbels vier tritt.



**Abb. 15 Darstellung der Cage-Sinterung:** Präparat nach interkorporeller Spondylodese der Halswirbelkörper drei und vier, Safranin Orange / von Kossa, C3 (1), C4 (2), Artefakt des Cages nach Entfernung (3), gestrichelte Linie (gelb) stellt den Verlauf der Extremitas cranialis respektive caudalis dar. Tier-Nummer 157, Masson-Goldner, Fotografie

Das Core-Material wurde hinsichtlich vorhandener Reste und des Zustands untersucht. Waren im mineralisierten Kollagen Zellen und Blutgefäße nachweisbar, so galt es als erschlossen. War mineralisiertes Kollagen vollkommen zellfrei, so wurde es als unerschlossen eingestuft.

Die Resorptionszonen wurden mikroskopisch identifiziert und anhand der Präparate nach Safranin-Orange / Lichtgrün vermessen. Als Resorptionszone wurden Areale gewertet, die einen Einbruch in die trabekuläre Knochenstruktur des Wirbelkörpers darstellen. Dabei ist die knöcherne Struktur aufgelöst und in diesen Präparaten rot angefärbt. Die rot gefärbten Bereiche können histologisch als Bindegewebe verifiziert werden. Im Übergangsbereich von Knochen zu Bindegewebe finden sich eine erhöhte Anzahl Knochen resorbierender Osteoklasten.

Die Kortikalis wurde lichtmikroskopisch untersucht und beurteilt. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Integrität der Struktur der dorsalen und ventralen Wirbelkörper-Kortikalis gelegt.

Eventuelle Auffälligkeiten wurden gesondert festgehalten.

Im Besonderen wurde auf die folgenden Merkmale geachtet. Um ein Merkmal mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS für Windows 10.0 (SPSS Deutschland GmbH, München, Deutschland) grafisch darstellen zu können, wurden den Parametern Zahlen zugeordnet. Die Parameter wurden unabhängig von einander beurteilt und miteinander verglichen. Die den Merkmalsausprägungen zugeordneten Zahlenwerte werden in den Tabellen 2 – 12 wiedergegeben:

**Tabelle 2 Beurteilung der Gewebequalität im Intervertebralraum** und im Besonderen in der Cage Pore nach Emery und Mitarbeiter (1994 b)

Gewebequalität im Zwischenwirbelraum und im besonderen in der Cage Pore	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Knöcherne Verbindung der Halswirbelkörper	7
Mehr Knochen als Knorpel	6
Mehr Knorpel als Knochen	5
Knorpel	4
Mehr Knorpel als Bindegewebe	3
Mehr Bindegewebe als Knorpel	2
Bindegewebe	1

**Tabelle 3 Vaskularisierung im Bereich der Endplatten** beziehungsweise des Bandscheibenfachs

Vaskularisierung im Bereich der Endplatten resp. des Bandscheibenfachs	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Stärker als physiologisch	2
Physiologisch	1
Schwächer als physiologisch	0

**Tabelle 4 Integration des Implantats**

Integration des Implantats	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Knochen	5
Knochen und Bindegewebe	4
Knochen und Knorpel	3
Bindegewebe	2
Knorpel	1

**Tabelle 5 Sinterung des Implantats**

Sinterung des Implantats	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Sinterung	1
Keine Sinterung	0

**Tabelle 6 Mineralisiertes Kollagen**

Mineralisiertes Kollagen	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Vollständiger Abbau	2
Erschlossenes Restgewebe	1
Unerschlossenes Restgewebe	0

**Tabelle 7 Fremdkörperreaktion im Bereich des Implantat-Knochen-Kontakts**

Fremdkörperreaktion im Bereich des Implantat-Knochen-Kontakts	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Hochgradig, bei Vorhandensein von Fremdkörperriesenzellen (FKRZ), Hypervaskularisierung und Endzündungszellen	3
Mittelgradig, bei Auffinden von vielen Entzündungszellen, ohne FKRZ	2
Geringgradig, es finden sich keine Entzündungszellen, bzw. das Implantat ist direkt von Knochen oder Bindegewebe umschlossen	1

**Tabelle 8 Anzahl der Resorptionszonen im Bereich des Implantat-Wirbelkörper-Kontakts**

Anzahl der Resorptionszonen im Bereich des Implantat-Wirbelkörper-Kontakts	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Mehr als vier Resorptionszonen	3
Drei bis vier Resorptionszonen	2
Ein bis zwei Resorptionszonen	1
Keine Resorptionszonen	0

**Tabelle 9 Ausmaß der Resorptionszonen** in Anlehnung an Hoffmann und Mitarbeiter (1997)

Ausmaß der Resorptionszonen im Bereich des Implantat-Wirbelkörper-Kontakts	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Resorptionszone ist größer als 3 mm - Grad III	3
Resorptionszone größer als 1 mm, aber geringer 3 mm - Grad II	2
Resorptionszone bis 1 mm - Grad I	1
keine Resorptionszonen	0

**Tabelle 10 Fusion der Wirbelkörper** nach Lund und Mitarbeiter (1998)

Fusion der Wirbelkörper	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Vollständige knöcherner Fusion – D	3
Minimale residuale Bandscheibenraumhöhe C3 / C4 kleiner als 5 mm – C	2
Minimale residuale Bandscheibenraumhöhe C3 / C4 größer als 5 mm – B	1
Keine Fusion – A	0

**Tabelle 11 Beurteilung der Kortikalis**

Beurteilung der Kortikalis	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Aufgefaserte Kortikalis, die eine kompakte Struktur nicht erkennen lässt	2
Geschlossene, aber verdickte Kortikalis	1
Geschlossene, unauffällige Kortikalis	0

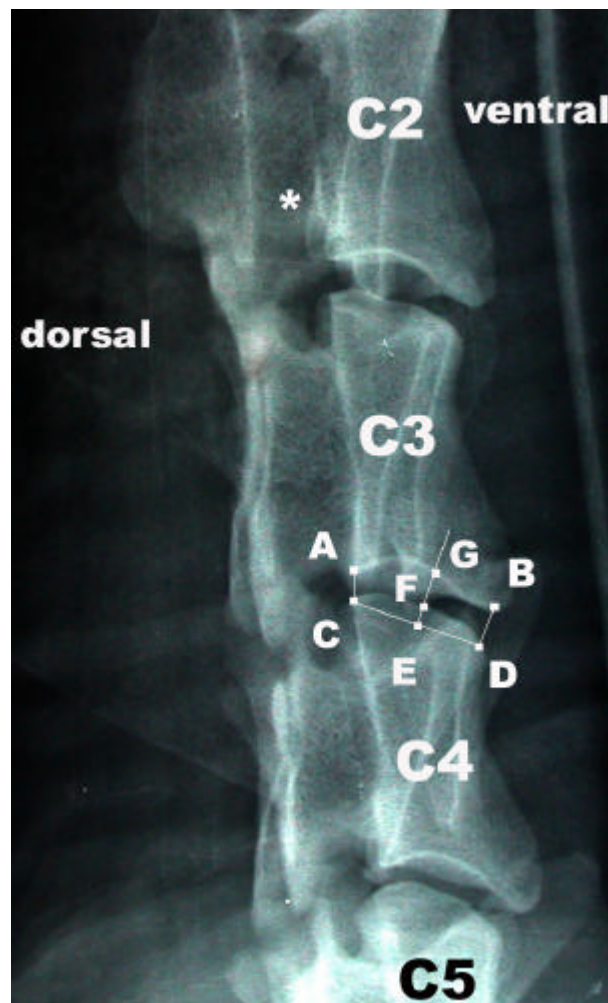
**Tabelle 12 Kallusbildung**

Kallusbildung: Kallus beschreibt die ventrale Knochenzubildung.	
Merkmals-Ausprägung	Zahlenwert
Knochenspanne, die den Wirbelkörper C3 mit C4 verbindet	3
Starke Zubildung ohne Verbindung zwischen den Wirbelkörpern	2
Geringe Zubildung ohne Verbindung zwischen den Wirbelkörpern	1
Keine Zubildung	0

### 3.6.2 Quantitative Auswertung

Durch die computergestützte Auswertung besteht die Möglichkeit, die histologischen Knochenschnitte zu analysieren und zu quantifizieren. Die histologischen Präparate wurden vor der quantitativen Histomorphometrie digitalisiert. Dazu nutzten wir eine hochauflösende Digitalkamera (Nikon Superhigh-Performance, 3xZoom, Cool Pix 990, Japan) und einen Leuchttisch, auf den die Präparate abgelegt wurden. Für die spätere Kalibrierung des digitalen Bildes wurde ein Millimetermaß neben das Präparat gelegt und fotografisch festgehalten.

Die morphometrische Auswertung erfolgte in der Bildanalyse, bestehend aus Personalcomputer mit Monitor und Morphometrie-Software (KS 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland). Für das Versuchsvorhaben der ventralen interkorporellen Spondylodese existiert ein von Gerd Krummrey (Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland) entwickeltes Programm, das es ermöglicht, die digitalen Bilder zu analysieren. In Abhängigkeit von der unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Gewebe ist es möglich, Distanzen und Flächen zu berechnen. Mit Hilfe der im Bild befindlichen Skalierung und der manuellen Distanzeingabe wurden die Präparate durch das Programm auf eine einheitliche Maßeinheit angeglichen und kalibriert.



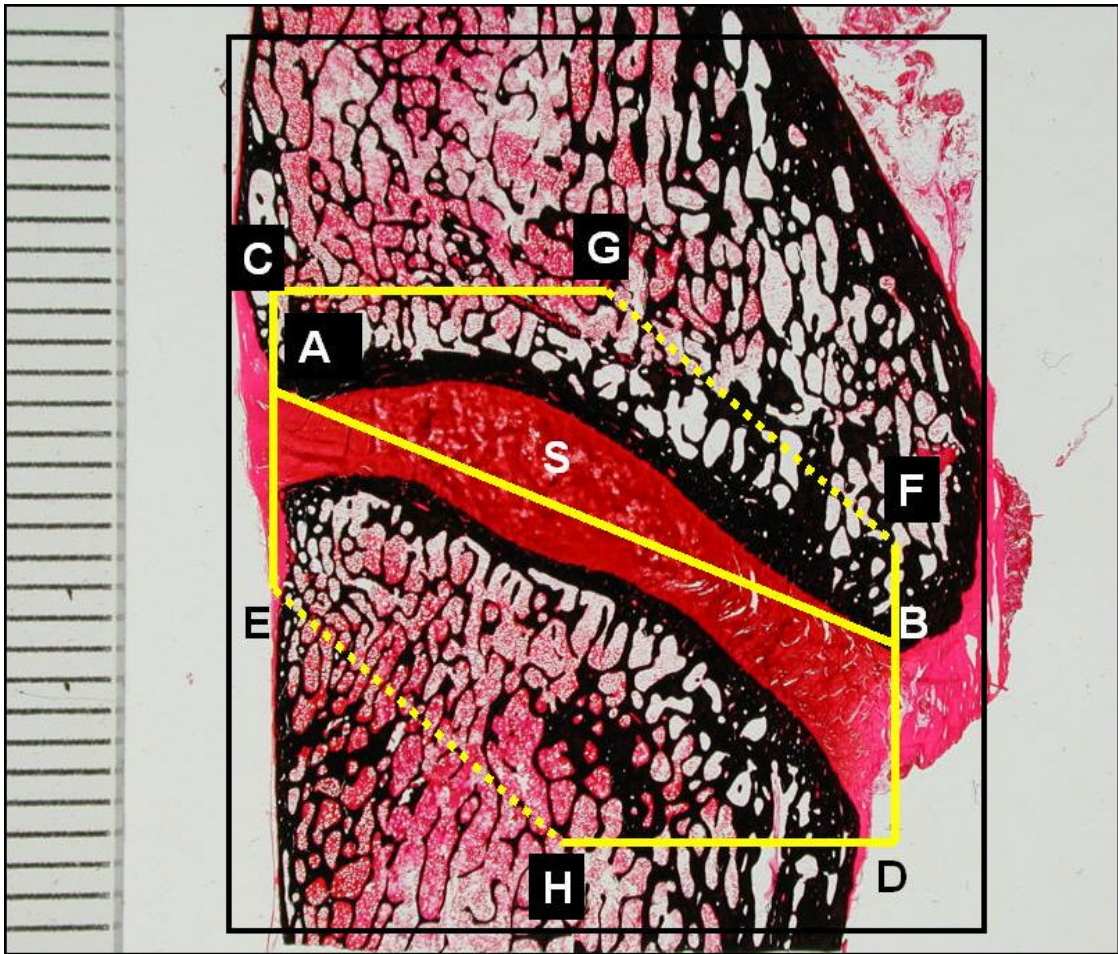
**Abb. 16 Schematische Darstellung zur Ermittlung der mittleren Bandscheibenraumhöhe:** Dargestellt sind die Hilfspunkte A (Hinterkante Extremitas caudalis C3), B (Vorderkante Extremitas caudalis C3), C (Hinterkante Extremitas cranialis C4), D (Vorderkante Extremitas cranialis C4), E (stellt die Hälfte der Strecke C / D dar) F und G Hilfspunkte siehe Text. Der Canalis vertebralis (\*) dient der Orientierung. Seitliche Röntgenaufnahme, Tier-Nummer: 187, prae operationem.

Ein wichtiger Parameter zur Konstruktion der ROI war die Messung der durchschnittlichen Bandscheibenraumhöhen (DBSRH) an präoperativ angefertigten Röntgenbildern. Es wurden



Punkte festgelegt, die eine standardisierte Bestimmung des Bandscheibenraums des Segments C3 / C4 ermöglichen (Abb. 16). Am Halswirbelkörper drei dienten die Hinterkante (A) und die Vorderkante (B) der Extremitas caudalis als äußere Begrenzung des Bandscheibenfachs. An der Extremitas cranialis des Halswirbelkörpers vier wurden in gleicher Weise die Hinterkante (C) und die Vorderkante (D) bestimmt. Die hintere Bandscheibenraumhöhe (HBSRH) entsprach der Länge der Strecke A / C. Die Länge der Strecke B / D ergab die vordere Bandscheibenraumhöhe (VBSRH). Die Hälfte der Strecke C / D bildete den Punkt E. Um die mittlere Bandscheibenraumhöhe (MBSRH) zu berechnen, wurde im Punkt E das Lot gefällt. Diese Gerade schnitt sowohl die Extremitas caudalis des Halswirbels drei im Punkt F, wie auch die Extremitas cranialis des Halswirbels vier im Punkt G. Die Länge der Strecke F / G entsprach der MBSRH. Im Anschluss wurde aus der vorderen, mittleren und hinteren Bandscheibenraumhöhe die durchschnittliche Bandscheibenraumhöhe nach folgender Formel berechnet:

$$DBSRH = (VBSRH + MBSRH + HBSRH) : 3 .$$



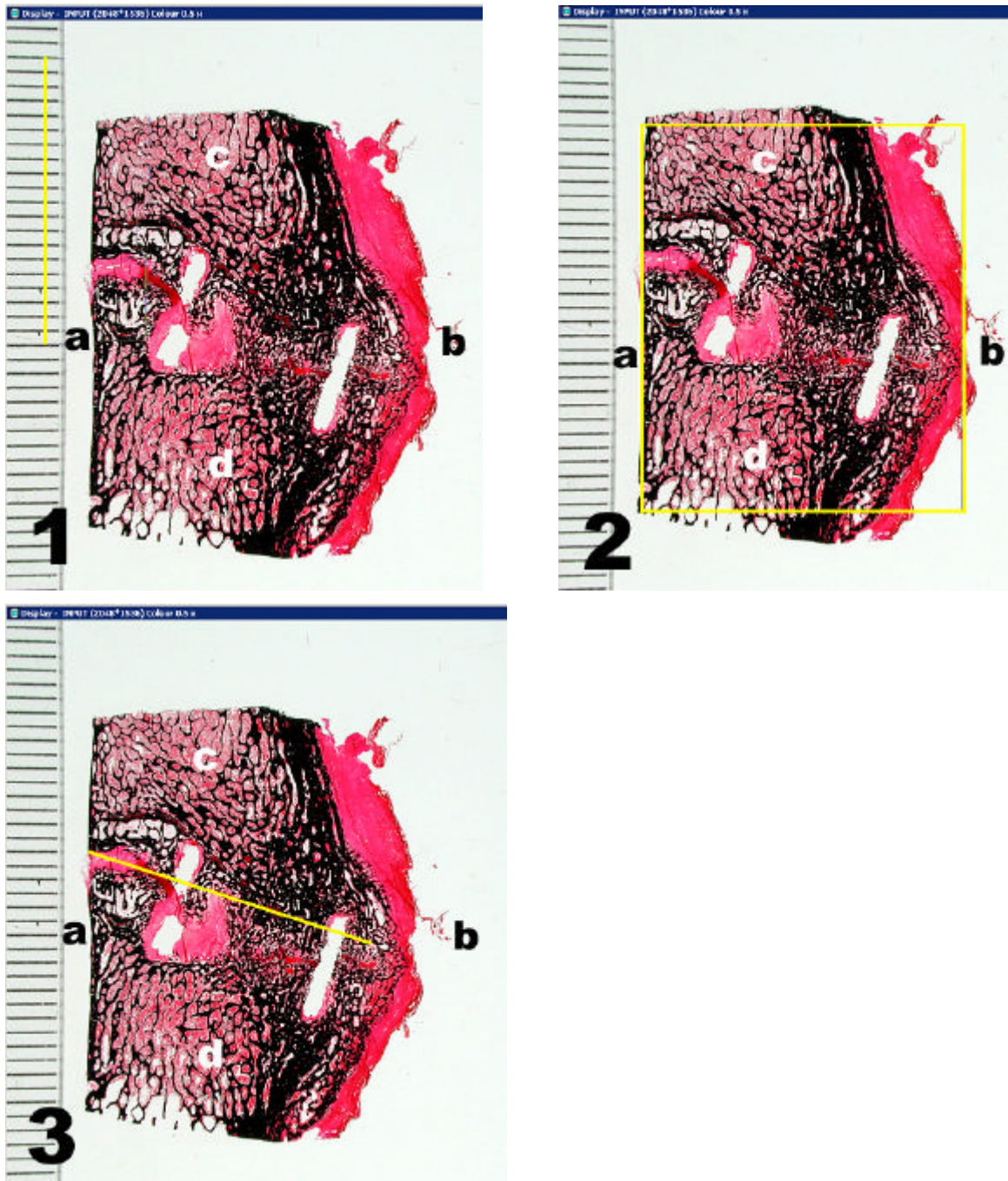
**Abb. 17 Schematische Darstellung der „Region of Interest“:** Die Eingrenzung des Präparats geschieht über das Einzeichnen eines Rechtecks (schwarz). Dargestellt sind die Hilfspunkte A (Hinterkante der Extremitas caudalis von C3) und B (Vorderkante der Extremitas caudalis von C3). Die Strecke A / B stellt die Baseline (S, gelbe Linie) dar. Die Strecke A / C, sowie die Strecke B / F stellen die durchschnittliche präoperative Bandscheibenraumhöhe dar, die in den Punkten A respektive B nach kranial abgetragen wird, während die Strecken A / E, sowie B / D die Länge der doppelten präoperativen durchschnittlichen Bandscheibenraumhöhe aufweisen und in den Punkten A respektive B nach kaudal abgetragen werden. Im rechten Winkel zur Strecke A / E respektive der Strecke B / D wird jeweils die Hälfte der Länge der Baseline (S) abgetragen, so dass die Punkte H und G entstehen. Die Verbindung der Punkte E und H, sowie der Punkte F und G vervollständigt die Region of Interest. Kontroll-Präparat, Safranin Orange / von Kossa, 4-fache Vergrößerung

Die Berechnung der Flächen für Knochen, Knorpel und mineralisierten Knorpel erfolgte anhand der digitalen Bilder der Färbungen nach Safranin-Orange / von Kossa, Safranin-Orange / Lichtgrün und Astrablau in einer vorab definierten „Region of Interest“. Die ROI wurde dabei für jedes Präparat gesondert und individuell anhand des folgenden Beispiels für ein Kontrollpräparat ermittelt und erfolgte programmgesteuert. Nach Kalibrierung des Systems auf 20 mm erfolgte die Eingrenzung des Präparats im Rechteck, um im Programm die bedeutenden Bildpunkte zu definieren. Im Anschluss wurde die Baseline (S) eingetragen. Sie wurde definiert als die Distanz zwischen Vorder- (Abb. 17-A) und Hinterkante (Abb. 17-B) der Extremitas caudalis des dritten Halswirbelkörpers. Aus der Baseline und der DBSRH

wurde die ROI durch das Programm berechnet und eingezeichnet. Das Programm orientierte sich dabei an der manuell eingezeichneten Baseline, die durch die Punkte A und B begrenzt werden (Abb. 17). Parallel zu den quadratisch eingegrenzten Bildrändern wurde in den Punkten A bzw. B die zweifache DBSRH nach kaudal und die einfache DBSRH nach dorsal abgetragen (Abb. 17). Die halbe Baseline wurde nun vom Punkt C aus nach ventral und von Punkt D aus nach dorsal im rechten Winkel zur Strecke AC resp. BD abgetragen (Abb. 17). Die entstanden Punkte G und H wurden mit den Punkten F und E so verbunden, dass die hexagonale ROI entstand (Abb. 17, Abb. 18).

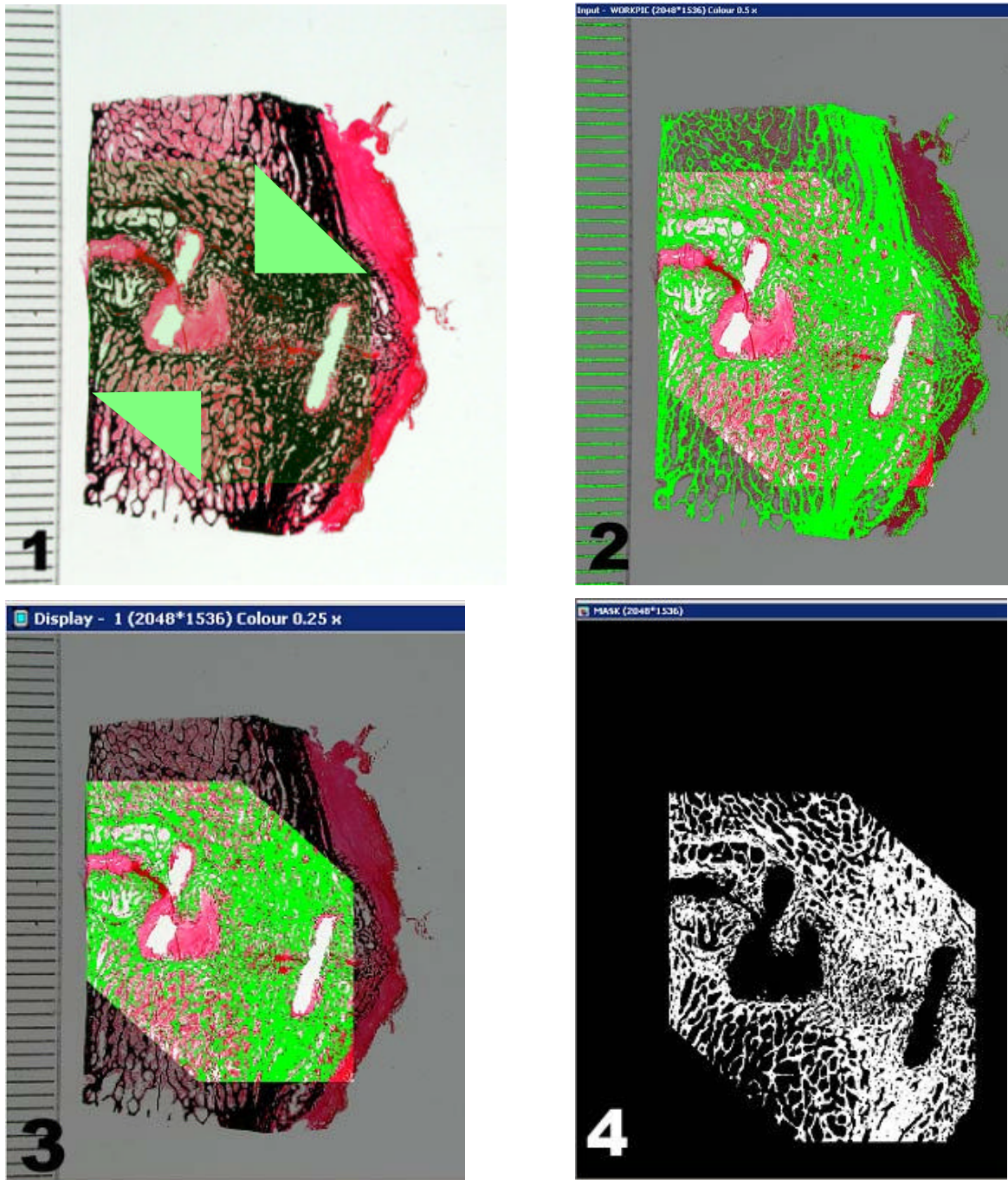
Das Präparat gefärbt nach Safranin-Orange / von Kossa wurde zur Berechnung der Knochenfläche genutzt. In dieser Färbung wurde Knochengewebe schwarz gefärbt. In der aus Baseline und DBSRH definierten ROI wurde die Fläche des Knochens markiert. Es war möglich durch Auswahl eines Schwellenwerts, diese für den Computer als relevant zu markieren. Es bestand die Möglichkeit nicht optimal gefärbte Areale, die vom Computersystem nicht erkannt wurden, von Hand nachzumarkieren. Im Anschluss wurde die markierte Fläche berechnet (Abb. 19).

In Analogie berechnete sich die Knorpelfläche aus den rot gefärbten Arealen der Präparate, gefärbt nach Safranin-Orange / Lichtgrün bzw. die Fläche des mineralisierten Knorpels mit Hilfe der dunkelblau dargestellten Strukturen im Präparat nach Astrablau gefärbt. Bei der Berechnung der Knorpelfläche (nichtmineralisiert oder mineralisiert) war zu beachten, dass nur Gewebe einbezogen wurden, die in Folge des postoperativen Geschehens im Bandscheibenraum entstanden und nicht eventuell vorhandene Bandscheibenreste oder Wachstumsfugen.



**Abb. 18 Quantitative Histomorphometrie:** C3 / C4-Präparat Safranin-Orange / von Kossa: Nacheinander dargestellte Arbeitsschritte; Kalibrierung des Systems auf 20 mm (gelbe Linie), mit Hilfe des Maßstabes links neben dem Präparat (1), Eingrenzen des Präparats (gelbes Rechteck) auf die zu beurteilende Fläche (2), Einfügen der Baseline (gelbe Linie), als Verbindung des dorsalen Endpunktes der Kortikalis mit dem ventralen Punkt der Kortikalis des Halswirbelkörpers drei (3), dorsal (a), ventral (b), C3 (c), C4 (d)





**Abb. 19 Quantitative Histomorphometrie:** C3 / C4-Präparat Safranin-Orange / von Kossa, digitale Fotografie: Programm definiert ROI (1), schwarz gefärbte Anteile werden markiert (grün, 2), markierte Fläche der ROI wird ermittelt (3), markierte Fläche der ROI wird berechnet (4)

### 3.7 Statistik

Die berechneten Werte der Analyse wurden, abgesehen vom Autor dieser Arbeit, von zwei weiteren Personen gemessen. Die Werte wurden anschließend gemittelt, um einen individuellen Messfehler auszuschließen. Die histomorphometrischen Daten wurden zur

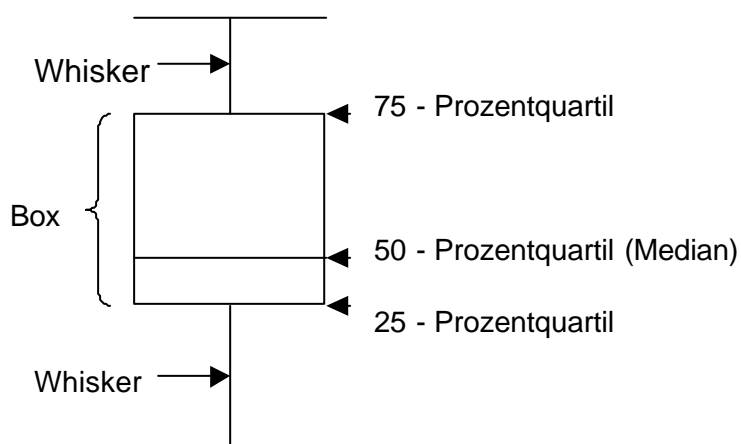
grafischen Darstellung in das Datenverarbeitungsprogramm SPSS für Windows 10.0 (SPSS Deutschland GmbH, München, Deutschland) übertragen.

Die histologischen Ergebnisse wurden mit Hilfe von Häufigkeitstabellen beschrieben. Etwaige biologische Zusammenhänge konnten in Kreuztabellen verdeutlicht werden.

Die histomorphometrischen Ergebnisse wurden mittels Boxplots dargestellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Median, da die Gruppengröße gering war und nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. Die grafische Darstellung erfolgte mittels Boxplot-Diagrammen. Die Boxplotdarstellung enthält folgende Parameter: Den Median (auch 50-Prozentquartil genannt), das 25- und 75-Prozentquartil, den Minimum- und Maximumwert. Außerdem sind Ausreißer und Extremwerte dargestellt. Der Körper des Boxplots wird vom 25- und 75-Prozentquartil begrenzt und vereint 50 Prozent der Werte in sich. Die sich oben und unten an den Körper anschließenden Whisker (T-förmige Markierung) umfassen jeweils die Werte unterhalb des 25-Prozentquartils bzw. oberhalb des 75-Prozentquartils. Die Whisker können maximal die 1,5-fache Länge der Box betragen. Gibt es Fälle mit Werten außerhalb dieses Bereichs, werden sie als Ausreißer bzw. Extremwerte bezeichnet.

\* Extremwerte: Fälle mit Werten, die über 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind.

O Ausreißer: Fälle mit Werten, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind.



Die statistische Auswertung erfolgte mittels U-Tests nach Mann-Whitney-Wilcoxon, ein nichtparametrischer Zwei-Stichproben-Test für zwei unabhängige Stichproben, der keine



Normalverteilung voraussetzt (Berchthold 1979). Vorausgesetzt, dass beide Proben annähernd gleiche Wölbungen aufweisen, ist der Test relativ trennscharf. Die Nullhypothese entspricht der des t-Test für unverbundene Stichproben. Die angegebenen p-Werte zeigen die signifikanten Unterschiede der untersuchten Gruppen bei einem festgelegten Signifikanzniveau ( $p$ ) von 0,05 (5 %) an. Da durch den statistischen Vergleich der einzelnen Gruppen eine Abhängigkeit der Tests untereinander geschaffen wurde, erfolgte die Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm (Aickin und Mitarbeiter 1996). Dabei handelt es sich um ein sogenanntes *step-down* Verfahren. Die p-Werte werden der Größe nach sortiert und mit einem adjustierten  $\alpha$  ( $p / m$ ;  $m$  = Zahl der jeweiligen Hypothesen) verglichen. Die p-Werte werden bis an den Punkt verglichen, an dem die Nullhypothese nicht abgelehnt werden kann oder alle Gruppen signifikante Unterschiede aufweisen. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass nicht alle Vergleiche auf einem sehr hohen Niveau stattfinden (Aickin und Mitarbeiter 1996) und so die Gefahr der fälschlichen Beibehaltung der Nullhypothese geringer ist (Sankoh und Mitarbeiter 1997).

Die festgestellten Unterschiede charakterisieren die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben und stellen keine allgemeingültigen Aussagen dar.

Die übrigen Ergebnisse wurden in Tabellen und Diagrammen des Programms Word für Windows erstellt.