

4. Material und Methoden

4.1 Begründung der Modellwahl

In früheren Arbeiten zur Erforschung verschiedener Fragestellungen zu Pathologien der Wirbelsäule wurden bereits diverse Tierspezies als Modell eingesetzt und miteinander verglichen (39, 100, 151-153). Die Arbeit von Smit und Mitarbeitern zeigt, dass Quadrupeden trotz, des horizontalen Verlaufs ihrer Wirbelsäule, eine ähnliche Achsenbelastung aufweisen wie der aufrecht gehende Mensch (154). Das Schaf ist derzeit das Großtiermodell der Wahl für in vivo und in vitro Studien mit Spinal-Implantaten und Wirbelkörper-Fusionen. Aufgrund seiner anatomischen Dimensionen hat es sich bereits mehrfach in der experimentellen Wirbelsäulen Chirurgie als Versuchstier bewährt (105, 155-158). Ausgewählte Studien haben belegt, dass die ovine Wirbelsäule anatomisch und biomechanisch, insbesondere im thorakalen und lumbalen Abschnitt, große Parallelen zur menschlichen Wirbelsäule aufzeigt (77, 159). Auch die für prothetische Verfahren erforderliche Mindesthöhe der Wirbelkörper und Bandscheiben sind durch das Schaf gegeben (75, 105). Reid und Mitarbeiter untersuchten den Wasser- und Kollagengehalt des Anulus fibrosus und die Kollagenfaserausrichtung der ovinen Bandscheibe und verglichen ihre Werte mit früheren Arbeiten zu humanem Material. Die Ähnlichkeit der Parameter zeigte, dass die Bandscheibe des Schafes auch aus histochemischer Sicht ein brauchbares Modell ist (78).

Wählt man die Tiere nach Alter, Rasse und Geschlecht, so zeigen sie eine große Homogenität untereinander (75). In der hier vorliegenden Studie entschieden wir uns für 40 weibliche, mindestens zwei Jahre alte Merinoschafe mit einem durchschnittlichen Gewicht von 70 kg (± 10 kg) (Abb. 6). Eine eingehende tierärztliche Untersuchung sicherte die Standardisierung des Versuchsvorhabens. Es wurden Tiere mit gleicher körperlicher Entwicklung und unter Ausschluss von Vorerkrankungen eingestellt. Um eine eventuelle Trächtigkeit im Frühstadium abubrechen, erhielten alle Tiere Prostaglandin F 2 α (ILIREN[®], Intervet Deutschland GmbH, Unterschleissheim). Vor Beginn der Studie erfolgten eine Paramunisierung mittels Parapox ovis (BAYPAMUNE[®], Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und eine Behandlung gegen Ekto- und Endoparasiten mit Ivermectin (IVOMEK[®], Merial, Deutschland) und Triclabendazolum (FASINEX[®], Novartis, Tiergesundheit AG, Deutschland).

Direkt vor und nach der Operation wurden die Tiere auf Einstreu und Stroh in den Stallungen der tierexperimentellen Einrichtung der Charité untergebracht. Zur Fütterung wurde zweimal täglich Heu verwendet. Wasser stand den Schafen ad libitum zur Verfügung.

Zwei Wochen post operationem wurden sie in eine Freilandhaltung verlegt. Die Pflege sowie Operationsvor- und nachsorge erfolgte somit für alle Tiere möglichst gleich.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des folgenden Projekts: „In vivo Evaluation eines posterioren dynamischen Stabilisationssystems am lumbalen ovinen Bandscheibendegegenerationsmodell“. Es wurde von den lokalen Tierschutzbehörden unter der amtliche Tierversuchsnummer Reg 0038/04 genehmigt.



Abb. 6: Merinoschaf

4.2 Versuchsaufbau

4.2.1 Versuchsgruppen

Von den 40 verwendeten Merinoschafen wurden nach randomisierter Auswahl 20 Tiere im Lendenwirbelsegment L3-L4 lediglich nukleotomiert. Den verbleibenden 20 Schafen wurde nach der Nukleotomie im gleichen Segment zusätzlich das zu untersuchende posteriore dynamische Stabilisationssystem der Firma SYNTHES® aus der Schweiz, implantiert. Im Studienverlauf wurden die Tiere prospektiv über einen Zeitraum von 12 und 48 Wochen beobachtet und untersucht. Somit ergeben sich vier Gruppen von je 10 Tiere (Tab. 3). Die 20 Schafe ohne Implantat dienten in der Auswertung als Referenzgruppe.

Die Anzahl von 10 Tieren wurde gewählt, um nach eventuell auftretenden operations- oder narkosebedingten Komplikationen und daraus folgender Gruppengrößenminimierung noch über mindestens 8 statistisch auswertbare Segmente zu verfügen.

Ferner wurden aus Studien anderer Arbeitsgruppen 7 Lendenwirbelsäulen zwei Jahre alter Merinoschafe gewonnen, welche keinerlei Operationen im Wirbelsäulenbereich unterzogen wurden. Diese Präparate, ebenfalls des Segmentes L3-L4, galten für die histologische Auswertung als Nativkontrolle und wurden auf gleiche Weise aufgearbeitet wie alle anderen Proben.

Gruppe	Verfahren	Standzeit
I A n = 10	Nukleotomie + Implantat	12 Wochen
I B n = 10	Nukleotomie	12 Wochen
II A n = 10	Nukleotomie + Implantat	48 Wochen
II B n = 10	Nukleotomie	48 Wochen

Tab. 3: Darstellung der Gruppengrößen, der Operationsverfahren und der jeweiligen Standzeiten

4.2.2 Das posteriore dynamische Stabilisationssystem

Die Basis für die Implantation des in der vorliegenden Studie zum Einsatz kommenden dynamischen Stabilisationssystems bildet das sich bereits in klinischer Anwendung befindliche Click'X-System (SYNTHES[®], Stratec Medical, Schweiz). Dieses besteht aus folgenden Bauelementen: 4 selbstausrichtende Verschlusskappen, 4 ± 25° polyaxial bewegliche 3-D-Köpfe, 4 Titanschrauben (Ø 5,2 mm, 30-35 mm) und 2 Stäbe (Abb. 7). Das in 3 verschiedenen Längen verfügbare bewegliche Element des Stabilisationssystems setzt sich aus einer Komposition von Titan (TiAl6Nb7 und CpTi) und Polycarbonat-Urethan (PCU) zusammen (Abb. 8). Wie aus der Abbildung 10 ersichtlich, wird dieses neuartige Implantat intraoperativ mit einem Titanstab individuell angepasster Länge verbunden und dann zwischen die Pedikelschrauben platziert. Auf diese Weise kommen bei jedem Schaf zwei der beweglichen Elemente, je eines rechts und links, zum Einsatz (Abb. 11). Die Montage des Implantates erfolgte mit eigens dafür hergestelltem Instrumentarium (MATHYS[®], Mathys Medizinaltechnik AG, Schweiz).

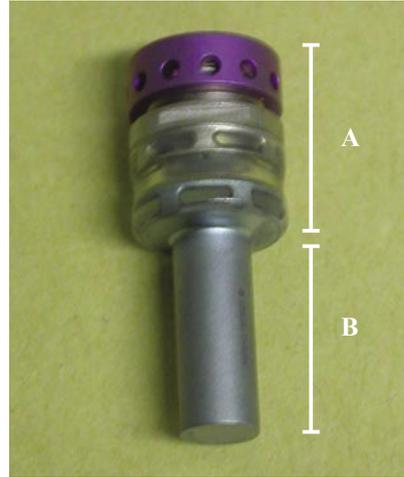
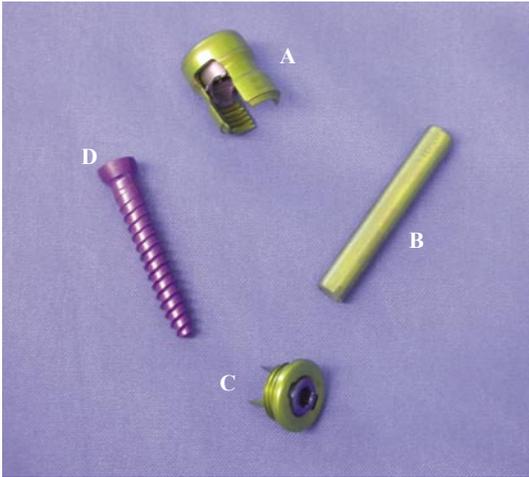


Abb. 7: Die Bauelemente des Click'X-Systems: $\pm 25^\circ$ polyaxial beweglicher 3D-Kopf (A), Standardstab (B), selbstausrichtende Verschlusskappe (C), und Titanschrauben (\varnothing 5,2 mm, 30-35 mm) (D)

Abb. 8: Das dynamische Element aus Polycarbonat-Urethan (PCU) (A) und Titan (TiA16Nb7 und CpTi) (B)

4.2.3 Operationstechnik

4.2.3.1 Operationsvorbereitungen

Die zu operierenden Tiere unterlagen vor dem Eingriff einer 24-stündigen Futterkarenz. Wasser stand ihnen bis zum Morgen der Operation ad libitum zur Verfügung. Jedes Tier erhielt als perioperative Antibiotikaphylaxe 60 min vor Operationsbeginn 2,2 g Amoxicillin i.v. (Augmentan[®], SmithKline Beecham Pharma) über einen Zugang in der Vena cephalica antebrachii. Zur Narkoseeinleitung wurde in gewichtsadaptierter Dosierung Thiopenthal-Natrium (Trapanal[®], Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) und Fentanylhydrogencitrat (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) genutzt.

Nach der Reflexkontrolle erfolgte die Intubation mittels eines Endotrachealtubus (Mallinckrodt, Irland, \varnothing 8 – 9 mm) und das Legen einer Magensonde (Rüsch, \varnothing 14 mm). Zur Überwachung der Vitalparameter wurde ein Monitoringsystem für Sauerstoffsättigung, Kapnometrie, Herzfrequenz und EKG eingesetzt (Anästhesie Sulla 800V, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland). Die Schafe wurden in Bauchlage gelagert und am Operationstisch fixiert. Anschließend erfolgte die Reinigung und Rasur des Operationsfeldes. Eine mit Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) und einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch im Verhältnis 60:40 durchgeführte Inhalationsanästhesie diente der Erhaltungsnarkose. Fentanylhydrogencitrat i.v. verabreicht, entsprach der analgetischen Komponente.

Eine perioperative Flüssigkeitssubstitution durch eine Elektrolytinfusion (Jonosteril[®], Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Deutschland) wurde je nach Bedarf bei jedem Tier vorgenommen.

Unmittelbar vor dem Hautschnitt erfolgte eine Muskelrelaxation mittels 1 ml Pancuronium (Pancuronium Curamed[®], CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

4.2.3.2 Nukleotomie

Um die Anzahl und Lokalisation der Lendenwirbelkörper zu identifizieren, wurde das Tier vor Operationsbeginn durchleuchtet (BV 25, Phillips, Deutschland). Als Orientierung dienten die letzten Rippen sowie die Dornfortsätze des letzten Thorakalwirbels und der Lumbalwirbel. Ein Schaf besitzt variierend 6 bis 7 Lendenwirbelkörper. Unter Röntgenkontrolle wurde die Höhe des Intervertebralfachs L3-L4 mit einer 1er Kanüle interspinös markiert.

Der retroperitoneale Zugang zur Lendenwirbelsäule erfolgte über einen ca. 10 cm langen Hautschnitt, beginnend distal der 12. Rippe und links lateral der lumbalen Querfortsätze. Der Schnitt verlief von kranial nach kaudal gerade und parallel zur Wirbelsäule. Nach Eröffnung der Haut und Durchtrennung des subkutanen Fettgewebes kam es zur schichtweisen Durchtrennung der drei Bauchmuskeln (Mm. obliquus externus et internus, M. transversus abdominis) in ihrer jeweiligen Faserrichtung.

Die Separation des M. transversus abdominis erfolgte vorsichtig vom unmittelbar darunter liegenden, leicht verletzlichen Peritoneum. Durch anschließende stumpfe Abpräparation des präperitonealen Fettgewebes konnten die im Retroperitonealraum befindlichen Mm. quadratus lumborum und psoas major dargestellt werden. Nach Eröffnung der Psoasfaszie und stumpfem Abheben des M. psoas von der Unterlage waren das Bandscheibenfach des Bewegungssegmentes L3-L4 und die dazugehörigen segmentalen Blutgefäße einsehbar. Eine ggfs. notwendige Blutstillung wurde intermittierend mit Hilfe eines Elektrocauters durchgeführt. Die partielle Nukleotomie erfolgte standardisiert mittels einer x-förmigen Inzision von 5 mm × 5 mm am links lateralen Rand des Anulus fibrosus mit dem Skalpell (Abb. 9). Das Nukleusmaterial wurde mit einem Rongeur (2 mm) entnommen und zur Quantifizierung dessen Gewicht dokumentiert. Durch einen schichtweisen Wundverschluss, der Faszi-, Muskulatur-, Subkutan- und Hautnaht beinhaltet, wurde die Wunde verschlossen. Nach Anlegen eines Sprühpflasterverbandes erfolgte die Narkoseausleitung.

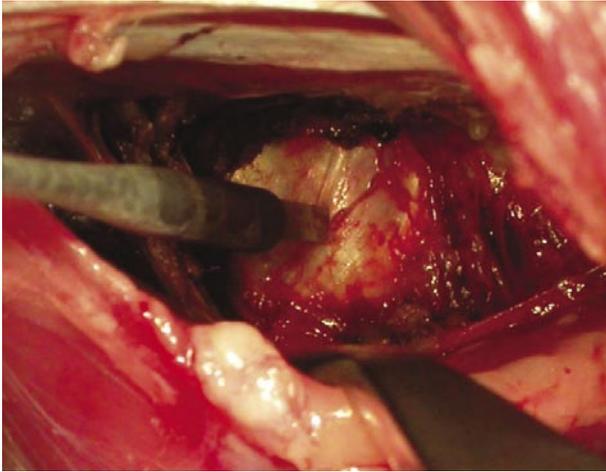


Abb. 9: Blick auf das Bandscheibenfach L3-L4 bei retroperitonealem Operationszugang

4.2.3.3 Einsatz des posterioren dynamischen Systems

Das posteriore dynamische Stabilisationssystem wurde randomisiert bei der Hälfte der Schafe eingesetzt. Die Operationsvorbereitungen und Anästhesie entsprachen denen der Nukleotomie.

Zu Beginn wurde das ebenfalls in Bauchlage fixierte Tier erneut in zwei Ebenen durchleuchtet und die Höhe des Bandscheibenfachs L3-L4 mittels einer 1er Kanüle interspinös markiert. Für diesen Eingriff wurde ein dorsaler Operationszugang genutzt. Der etwa 12 cm lange Hautschnitt erfolgte entlang der Dornfortsätze L2-L5. Nach Durchtrennung der Subkutis und der Faszie wurde die autochthone Muskulatur von dem Processus spinosus, der Lamina arcus vertebrae bis zum Processus transversus abpräpariert. Nach schonender Freilegung des vollständigen Segmentes waren die posterioren Knochenelemente der Wirbelkörper L3 und L4 inklusive ihrer Facettengelenke, einsehbar. Unter intermittierender Röntgenkontrolle mittels Bildverstärker (BV 25, Phillips, Deutschland) wurden nun mit einem Pfriem die Knochenkortikalis eröffnet, mit einem handgeführten Bohrer ein Kanal in die Pedikel gebohrt und pro Wirbel zwei Titanschrauben (\varnothing 5.2 mm, Länge 30-35 mm) eingebracht. Die auch beim Menschen Anwendung findenden Schrauben dienten der Verankerung des dynamischen Stabilisationssystems. Die Länge des Stabs mit dem das Implantat letztendlich individuell angepasst montiert wurde, konnte intraoperativ mit einem beweglichen Maß ermittelt werden (Abb. 10). Links und rechts des Dornfortsatzes wurde dann je eine Längsverbindung mit dem dynamischen Element montiert (Abb. 11). Vor dem schichtweisen Wundverschluss wurde die Wunde gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Zur abschließenden Kontrolle wurde nach dem Auftragen eines Sprühpflasterverbandes und eines analgetischen Hautpflasters (Fentanyl 75 mg, Durogesic[®], Janssen-Cilag Pharma GmbH, Deutschland) die LWS in 2 Ebenen geröntgt (Abb. 12 A und B).

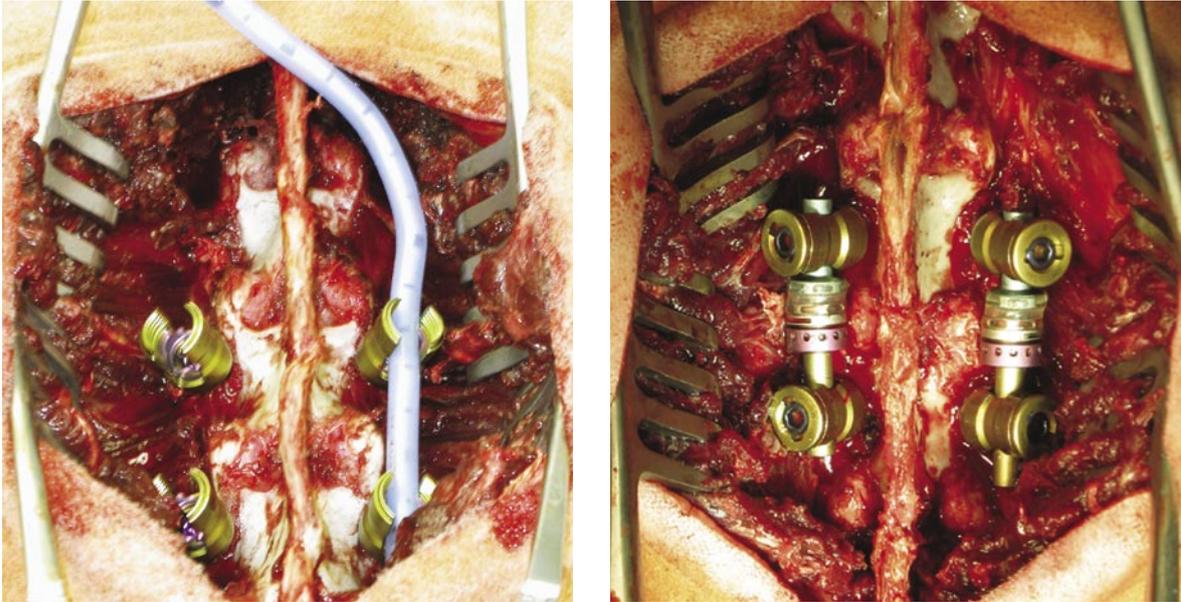


Abb. 10: Blick auf das Operationsfeld bei dorsalem Operationszugang, während der Abmessung der notwendigen Stablänge für das dynamische Element; das Click'X-System ist bereits montiert

Abb. 11: Operationsfeld bei vollständig implantierten dynamischen System

4.2.3.4 Postoperativer Zeitraum

Unmittelbar postoperativ von der Extubation bis zum vollständigen Erwachen und Aufstehen befanden sich die Tiere unter tierärztlicher Aufsicht. Es stand den Schafen sofort Wasser, Futter und Auslauf in den Stallungen der tierexperimentellen Einrichtung der Charité zur Verfügung. Für fünf Tage post operationem wurde den Tieren einmal täglich 0,5 g Metamizol-Natrium i.m. (Novalminsulfon-ratiopharm[®], Ratiopharm GmbH, Deutschland) als Analgetikum verabreicht. Die Inspektion der Wunde erfolgte täglich. Die Fäden wurden nach 14 Tagen gezogen. Im Rahmen der Operationsnachsorge wurden weiterhin die Körpertemperatur, das Gewicht und der Allgemeinzustand der Tiere kontrolliert.

Je nach Standzeiten wurden die Schafe in festgelegten Abständen in den zwei Standard-Ebenen geröntgt. Die seitliche und anterior-posteriore Aufnahme der LWS diente dem Monitoring des Bandscheibenfaches L3-L4, der dazugehörigen Wirbelkörper sowie der angrenzenden Segmente L2-L3 und L4-L5 (Abb. 12 A und B).

Ebenfalls wurde in regelmäßigen Abständen eine Magnetresonanztomographie der Lendenwirbelsäule durchgeführt.

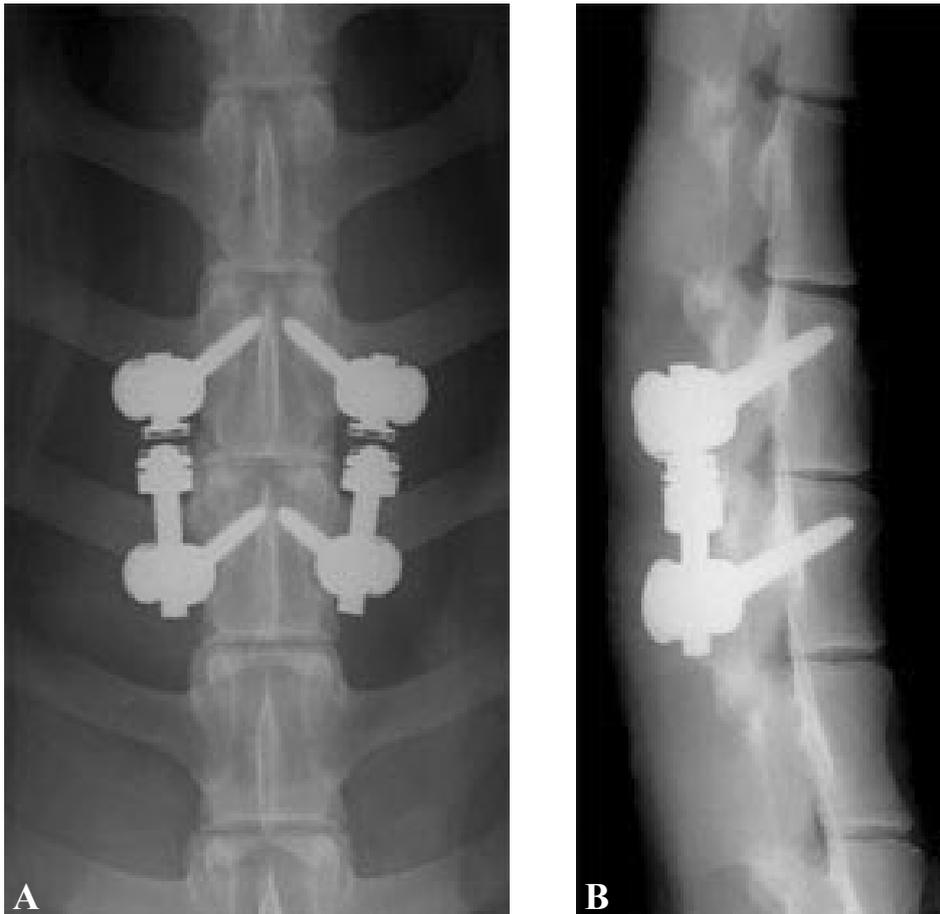


Abb. 12: Röntgenaufnahmen des Segmentes L3-L4 der Implantatgruppe zum Zeitpunkt 4 Wochen: a.p. (A) und seitlich (B)

4.3 Probenentnahme und Aufbereitung der Lendenwirbelsäule

4.3.1 Euthanasie und Entnahme des Lendenwirbelsegments

Nach Ablauf der Standzeit von jeweils 12 und 48 Wochen erfolgte die Tötung der Tiere. Zur Sedierung und Analgesie wurden 1 g Thiopental-Natrium und 0,1 mg Fentanylhydrogencitrat eingesetzt. Bis zum Eintritt des Todes durch Herzstillstand wurde anschließend Kaliumchlorid i.v. injiziert. Der Tod wurde durch Auskultation festgestellt. Die Entnahme der Lendenwirbelsäule erfolgte in Seitenlage, nachdem palpatorisch der zu entnehmende Abschnitt identifiziert wurde. Mittels oszillierender Säge (Aesculap Typ G-6100-05) wurde nach Entfernung der Weichteile die Wirbelsäule vom 12. Brustwirbel bis zum letzten Lendenwirbel abgesetzt. Vor der weiteren Aufarbeitung der Lendenwirbelsäule zum histologischen Präparat erfolgte die biomechanische Testung sowie die radiologische post mortem Analyse. Es wurden Röntgenbilder in den zwei Standardebenen und in Extensions- und Flexionsstellung als Funktionsaufnahmen erstellt. Weiterhin wurde eine Computertomographie am Tötungstag durchgeführt.

Die histologischen Arbeitsschritte umfassten die Präparation des Wirbelsegmentes L3-L4 inklusive des kompletten Implantates, das Zusägen, die Fixation des Gewebes, die Entwässerung, die Entfettung und das Einbetten der Präparate in Kunststoff. Abschließend wurden 6 µm dünne Schnitte angefertigt und histologisch angefärbt.

4.3.2 Präparation

Der entnommene Wirbelsäulenabschnitt wurde zuerst grob von umgebenden Weichteilresten und Muskulatur befreit. Die für die weitere Aufbereitung nicht benötigten knöchernen Anteile wurden dann mit einer oszillierenden Knochensäge abgetrennt. Es wurde ein kranialer Sägeschnitt durch den Wirbelkörper L3 und ein kaudaler Schnitt durch den Wirbelkörper L4 vorgenommen. Hierbei erhielt man das vollständig erhaltene Bandscheibenfach L3-L4 mit seinen angrenzenden knöchernen Anteilen (Abb. 13 A). Die Lendenwirbelsegmente der Implantatgruppe wurden zusätzlich mit einem kranialen sowie kaudalen Schnitt in drei Teile getrennt, um den Schraubenkanal als isoliertes Präparat zu gewinnen (Abb. 13 B).

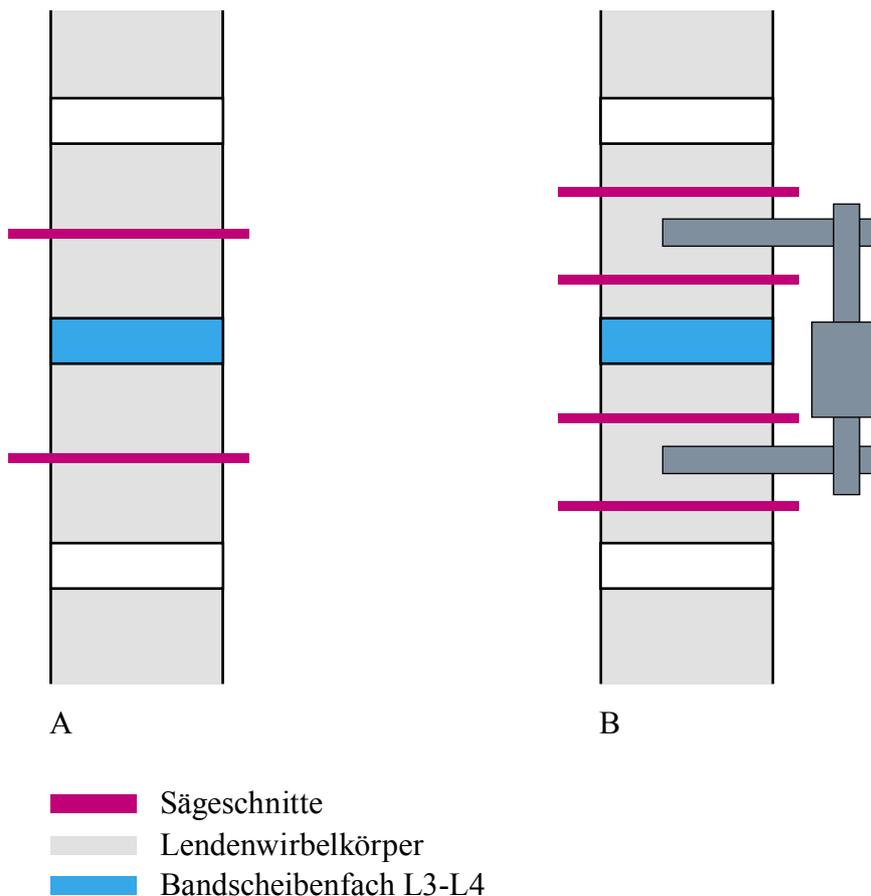


Abb. 13: Schematische Darstellung des Segments L3-L4 der Kontrollgruppe (A) und der Implantatgruppe (B) unter Kennzeichnung der zur Präparation notwendigen Sägeschnittführung; Blickrichtung von lateral

4.3.3 Sägen

Das Wirbelkörpersegment L3-L4 der Tiere der Referenzgruppe ohne Implantat wurde mit einem wassergekühlten Makrotrennschleifsystem (Exakt[®], Apparaturbau GmbH Norderstedt, Deutschland) vollständig in der Frontalebene von links lateral nach rechts lateral in vier 4 mm starke Scheiben gesägt (Abb. 14). Diese Ebene wurde gewählt, um in den Schnittpräparaten einen vollständigen Querschnitt der Bandscheibe, inklusive der Läsionsstelle am links-lateralen Rand, zu erhalten. Für die weiteren Arbeitsschritte verwendete man das Präparat mit der Bezeichnung H3 (H = Histologie). Die Scheibe H1 diente als Ersatz und die Scheiben IH2 und IH4 wurden für die immunhistologische Auswertung verwendet (IH = Immunhistologie). Für die Darstellung der Wirbelbogengelenke wurde ebenfalls ein Sägeschnitt in Frontalebene gewählt und jeweils das linke Facettengelenk histologisch aufgearbeitet. Die Segmente der Tiere mit Implantat wurden zusätzlich mit einem kranialen sowie kaudalen Schnitt in drei Teile getrennt.

Das mittlere Element, die Bandscheibe L3-L4 und die angrenzende knöcherne Endplatte enthaltend, wurde aus selbigen Gründen wie oben in Frontalebene gesägt. Der kraniale Anteil L3 und kaudale Anteil L4 enthielten jeweils metallene Reste der Pedikelschrauben, die während des Sägens im Präparat verblieben.

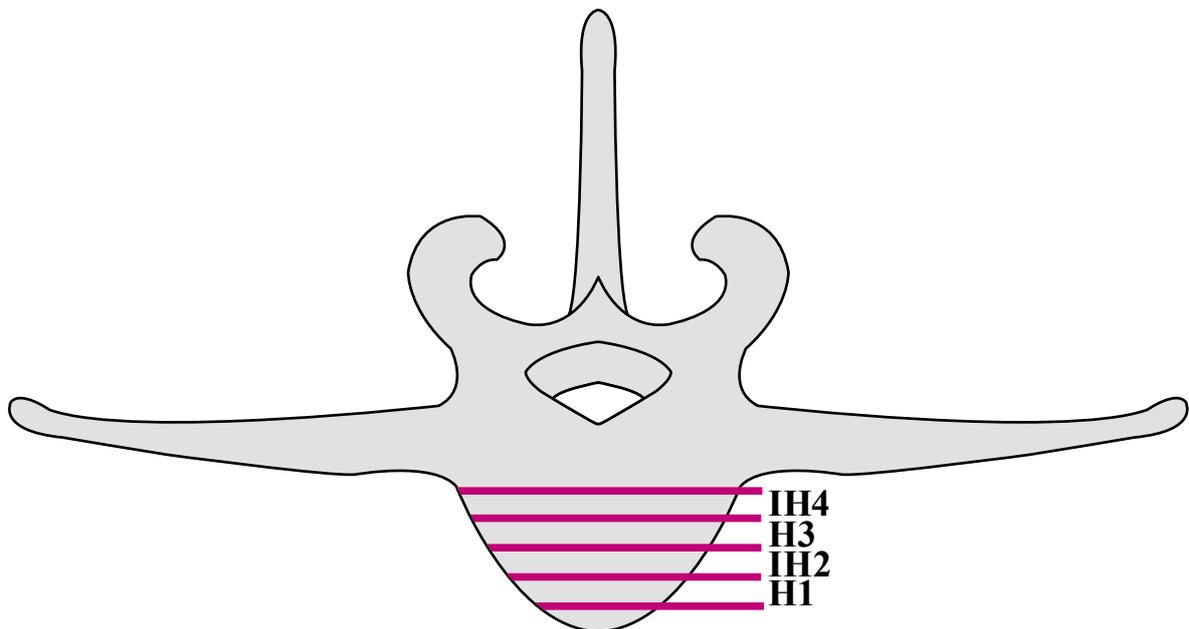


Abb. 14: Schematische Darstellung der Sägeschnittführung in Frontalebene am LWK 3: Histologiepräparate (H), Immunhistologiepräparate (IH); Blickrichtung von kranial

4.3.4 Fixation und Einbettung

Unmittelbar nach der Probenentnahme beginnt der Abbau von Proteinen durch freigewordene Zellenzyme. Aus diesem Grund muss das Gewebe sofort frisch verarbeitet oder aber fixiert werden. Die Fixation des Knochengewebes erfolgte hierbei für 7 Tage in neutraler isotoner Formaldehyd- Alkohol-Lösung (Zusammensetzung: 324 ml Formol 36 %ig, 540 ml Äthylalkohol 100 %ig, 130 ml 0,1 molarer Barbitol-Natrium-Puffer pH 7,4 sowie 6 g Glukose). Durch diesen Vorgang wird die Autolyse bzw. Heterolyse aufgehalten. Nach Ablauf der Woche wurde das Präparat unter fließendem Wasser formalinfrei gewaschen und mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Beginnend mit 70 %iger Alkohollösung erfolgte die Prozedur für die Wirbelkörperpräparate in Präparategläsern auf einem Schüttler (HS 501, KIKA Labortechnik, Deutschland). Auf diese Weise kommt es zur optimalen Infiltration des Gewebes.

Zeit	5 Tage	5 Tage	7 Tage					
Ethanol in %	70	80	80	96	96	100	100	100

Tab. 4: Entwässerungsprozedur des Knochengewebes

Der Entwässerung folgend wurden die Präparate vier Stunden bei Raumtemperatur in 100 %igem Xylol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) entfettet.

Zur Einbettung der Proben wurde Technovit® 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH&Co, Wehrheim, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis, der aus 5 Komponenten besteht: die Basislösung, der PMMA-Puffer, Härter 1 und 2 sowie der Regler. Das Technovit® 9100 NEU polymerisiert bei ca. 0 °C unter Luftausschluss aus. Laut Hersteller erlaubt die Anwendung dieses Kunststoffes Schnitthanfertigungen ab 2 µm. Die benutzten Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch angesetzt. Begonnen wurde mit der Präinfiltration der Präparate für zwei Tage bei Raumtemperatur. Darauf folgte eine zweiwöchige Infiltrationsphase, wobei die Proben bei 4 °C im Kühlschrank verwahrt wurden. Das Einbringen in die Infiltrationslösung führte zur vollständigen Durchtränkung des Gewebes mit Kunststoff. Für die Herstellung des Einbettmediums wurden Stammlösung A und Stammlösung B in einem Volumenverhältnis von 9:1 gut gemischt. Die Polymerisation beginnt unmittelbar nach dem Zusammenbringen der Lösungen. Daher wurden die Präparate direkt im Anschluss einzeln aus der Infiltrationslösung entnommen, in die Einbettform gelegt und diese mit dem Polymerisationsgemisch gänzlich aufgefüllt. Um etwaige Luftblasen im Kunststoff zu vermeiden, wurden die offenen Gefäße für zwei Minuten in eine Vakuumkammer verbracht. Die mit Wärmeentwicklung verbundene Aushärtung erfolgte unter Sauerstoffausschluss bei ca. 0 °C auf einem Eisbett.

Die vollständige Polymerisation war nach 24 Stunden abgeschlossen und die in Kunststoff eingebetteten Gewebescheiben konnten aus der Form entnommen werden. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist aus der Tabelle 5 zu entnehmen:

Arbeitsschritt	Zusammensetzung der Lösung	Zeitdauer	Temperatur
Präinfiltration	Basislösung Härter 1	2 Tage	Raumtemperatur
Infiltration	Basislösung PMMA Härter 1	2 Wochen	4 °C im Kühlschranks
Polymerisation	Stammlösung A · Basislösung · PMMA-Pulver · Härter 1 Stammlösung B · Basislösung · Härter 2 · Regler	1 Tag	0 °C auf Eis

Tab. 5: Prozedur der Einbettung in Technovit® 9100 Neu

4.3.5 Anfertigung der histologischen Schnitte

Um die Kunststoffblöcke im Hart- und Großschnittmikrotom (Polycut-S®, Leica Mikrosystems Nussloch GmbH, Deutschland) optimal positionieren zu können, wurden die auspolymerisierten Präparate auf einer Tischschleifmaschine (Phoenix 3000®, Düsseldorf, Deutschland) geschliffen. Mittels Hartschnittmikrotom und einem 16 cm 40° Hartmetallmesser erfolgte nach sorgfältiger Geräteeinstellung die Herstellung der Schnittpräparate. Es wurden 6 µm starke longitudinale Serienschnitte in der Frontalebene angefertigt und auf Objektträger, die mit 70 %igem Alkohol befeuchtet waren, aufgebracht. Der Schnitt wurde mit einer Streckflüssigkeit (Zusammensetzung: 30 ml Butoxyethyl-Acetat, 70 ml Ethanol 70 %ig) überschichtet. Es sollten möglichst wenig Falten entstehen. Eine Presse mit den Schnitten wurde für 2 Tage im Brutschrank bei 50 C° zur Aushärtung und Trocknung aufbewahrt. Vor dem Färbevorgang wurden die Gewebeschnitte für 3 × 30 Minuten in MEA (2-Methoxyethyl- acetat) entplastet. Anschließend durchliefen sie zur Rehydrierung die absteigende Alkoholreihe, beginnend bei 100 %igem Ethanol.

4.3.6 Histologische Färbungen

4.3.6.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Die Übersichtsfärbung nach einem standardisierten Protokoll nach Masson-Goldner (1938) dient in dieser Arbeit der histomorphologischen Analyse.

Ein Schnitt in Trichromfärbung bietet folgendes Bild: Die Zellkerne färben sich braunschwarz, das Zytoplasma wird Ziegelrot hervorgehoben. Die kernlosen Erythrozyten differenzieren sich durch ihre orangegelbe Farbe von den kernhaltigen Zellen. Mineralisiertes Knorpelgewebe stellt sich leuchtend grün im Gegensatz zu dem hellgrünen verkalkten Knorpelgewebe dar. Die unverkalkten Osteoidsäume grenzen sich rot ab. Bindegewebe und saure Mukosubstanzen färben sich blassgrün (Färbeprotokoll 1 siehe Anhang; Abb. 15).

4.3.6.2 Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung

Die nach Geitler (1949) erfolgende Färbung eignet sich spezifisch zur Darstellung von Knorpelgewebe. Der Farbstoff dringt in die Knorpelgrundsubstanz, bindet an die sauren Gruppen der Mukopolysaccharide und färbt sie intensiv rot. Osteoidsäume erscheinen wie auch die Zellkerne rot. Durch die Gegenfärbung mit Lichtgrün heben sich Knochen- und Bindegewebe grün ab (Färbeprotokoll 2 siehe Anhang; Abb. 16).

4.3.6.3 Safranin-Orange/von Kossa-Färbung

Diese Färbung, nach einem modifizierten Färbeprotokoll nach von Kossa (1901) und Winwarter (1908), eignet sich zur histomorphometrischen Analyse. Es erfolgt eine einheitliche Schwärzung aller mineralisierten, vor allem kalziumphosphathaltigen Gewebeanteile und die Rotfärbung anderer Bereiche, was zu kontrastreichen Bildern führt.

Mineralisiertes Knorpel- und Knorpelgewebe färbt sich schwarz, Mineralisierungsfronten werden schwarz granuliert hervorgehoben. Zu einer kontrastreichen Darstellung von Osteoidsäumen, Zellen und Bindegewebe kommt es durch die kombinierte Färbung mit Safranin-Orange. Die genannten Strukturen färben sich rot. Hyalines Knorpelgewebe ergibt ein intensiv rotes Bild (Färbeprotokoll 3 siehe Anhang; Abb. 17).

4.3.6.4 Alcianblau/Kernechtrot-Färbung

Alcianblau wurde von Steedman (1950) zur selektiven Färbung von sauren Mukopolysacchariden eingeführt. Diese nehmen konzentrationsabhängig eine mehr oder weniger intensive blaue Farbe an. Zellkerne werden von Alcianblau nicht angefärbt. Sie können mit Kernechtrot gegengefärbt werden und erhalten dann eine hellrote Farbe (Färbeprotokoll 4 siehe Anhang; Abb. 18).

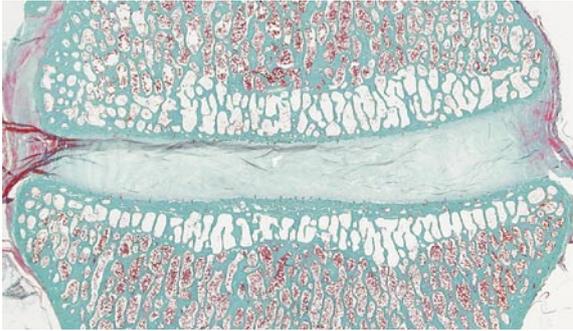


Abb. 15



Abb. 16



Abb. 17

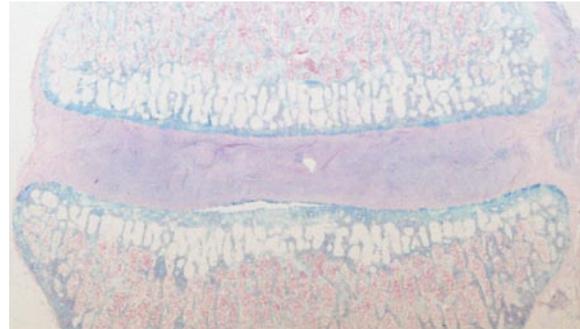


Abb. 18

Abb. 15: Trichromfärbung nach Masson-Goldner, Segment L3-L4

Abb. 16: Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, Segment L3-L4

Abb. 17: Safranin-Orange/von Kossa-Färbung, Segment L3-L4

Abb. 18: Alcianblau/Kernechtrot-Färbung, Segment L3-L4

4.3.6.5 Eindecken der gefärbten Schnitte

Um sie vor dem Austrocknen zu schützen, werden die gefärbten Schnitte vorübergehend in 100% Xylol gelagert und anschließend unter Verwendung von Vitroclud® (Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) und Deckgläschen eingedeckt.

4.4 Histologische Auswertung

4.4.1 Semiquantitative Auswertung

Die aufgearbeiteten histologischen Präparate wurden makroskopisch sowie unter dem Lichtmikroskop (Axioskop 2[®], Carl Zeiss, Jena, Deutschland) semiquantitativ ausgewertet. Die verwendeten Klassifizierungen für die einzelnen Parameter werden in den zugehörigen Abschnitten aufgeführt.

4.4.1.1 Makroskopische Auswertung

Die makroskopische Auswertung erfolgte anhand der Sägepräparate (Dicke: 4 mm) durch zwei unabhängige Beobachter. Die nachstehenden Schwerpunkte und deren Einteilung wurden berücksichtigt:

1. Morphologische Veränderungen der Bandscheibe

Bereits ohne Hilfsmittel erkennbare Veränderungen der Bandscheibe konnten in 3 Grade unterschieden werden. Bei der Definition eines Grading-Score musste berücksichtigt werden, dass es sowohl Präparate mit künstlich gesetztem Defekt (d=Defekt) als auch Nativpräparate (0=kein Defekt gesetzt) zu beurteilen galt. Es wurden neben den beiden von Nachemson und Mitarbeitern einbezogenen Kriterien zusätzlich Einblutungen in die Bandscheibe evaluiert, welche als Farbveränderungen in makroskopischer Ansicht sichtbar wurden. Unter Beachtung dessen, konnte in Anlehnung an Nachemson folgende Klassifikation festgelegt werden (160; Tab. 6)

Grad	Parameter
Grad 0 ₀	<ul style="list-style-type: none">· Klare Trennung beider Strukturen· Bandscheibe ohne makroskopisch sichtbare Veränderungen
Grad I _{0/d}	<ul style="list-style-type: none">· Klare Trennung von Anulus und Nukleus weniger deutlich· Geringe Fissuren im Anulus u./o. Nukleus sichtbar· Geringe Farbveränderungen im Anulus u./o. Nukleus(rest)
Grad II _{0/d}	<ul style="list-style-type: none">· Keine klare Trennung der beiden Strukturen möglich· Moderate Fissuren im Anulus u./o. Nukleus(rest) sichtbar· Deutliche Farbveränderungen im Anulus u./o. Nukleus(rest) sichtbar
Grad III _{0/d}	<ul style="list-style-type: none">· Abgrenzung von Nukleus(rest) und Anulus nicht möglich· Ausgeprägte Fissuren und Kavernen im Anulus u./o. Nukleus(rest) sichtbar· Starke Farbveränderungen im Anulus u./o. Nukleus(rest) sichtbar

Tab. 6: Grading-Score für makroskopisch sichtbare Veränderungen der Bandscheibenmorphologie modifiziert nach Nachemson (160)

2. Spondylophytenbildung

Die Sägepräparate wurden ebenfalls auf das Vorhandensein von makroskopisch sichtbaren Spondylophyten untersucht. Dabei konnte nachstehende Einteilung unterschieden werden:

- Spondylophyt:
- nicht sichtbar
 - sichtbar

Als Spondylophyt wurden hier nur eindeutig ohne Hilfsmittel sichtbare Knochenanbauten gewertet.

4.4.1.2 Mikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Bandscheibe, der knorpeligen Endplatte und des subchondralen Knochens wurden anhand der Schnitte in Trichromfärbung nach Masson-Goldner und der Alcianblau/Kernechtrot-Färbung nach Steedmann evaluiert. Die Auswertung erfolgte auch hier durch zwei unabhängige Beobachter. Zunächst wurden die Präparate für die orientierende Untersuchung bei 5facher Vergrößerung durchgemustert. Für die Beurteilung zellulärer Veränderungen war die Betrachtung bei 20 bzw. 40facher Vergrößerung notwendig.

1. Morphologische Veränderungen der Bandscheibe

Die Auswertung pathologischer Veränderungen des Anulus fibrosus und des Nucleus pulposus erfolgte mit einem in Anlehnung an Collins und Lewin sowie Boos und Weiler modifizierten Grading-Score (48, 59, 161; Tab. 7). Unter Beachtung, dass auch hier sowohl Präparate mit artifiziell gesetztem Defekt als auch Nativpräparate ausgewertet wurden, fanden folgende Einzelkriterien Berücksichtigung:

- Abgrenzbarkeit von Anulus fibrosus und Nucleus pulposus
- Lamellendesorganisation
- Anulusfissuren
- Anuluskavernen
- Nucleusfissuren
- Nucleuskavernen bis Nucleusverlust
- Nachweis von reparativen Bindegewebe (Fibrozyteneinwanderung/Gefäßeinsprossung)
- Chondrozytenzahlerhöhung/Chondronenbildung

Grad	Parameter
Grad 0 ₀	<ul style="list-style-type: none"> · Klare Abgrenzbarkeit von Nukleus und Anulus · Regelrechte Anuluslamellen · Homogener Nukleus ohne Fissuren
Grad I _{0/d}	<ul style="list-style-type: none"> · Grenze zwischen Nukleus(rest) und Anulus weniger deutlich · Geringe Fissuren der Anuluslamellen · Geringe Desorganisation der Lamellenanordnung · Geringe Fissuren im Nukleus(rest) · Steigende Zelldichte der Chondrozyten
Grad II _{0/d}	<ul style="list-style-type: none"> · Grenze zwischen Nukleus(rest) und Anulus weitgehend aufgehoben · Moderate Anulusfissuren · Moderate Lamellendesorganisation mit geringem Nachweis von reparativem Bindegewebe · Moderate Fissuren des Nukleus(rest) · Moderate Chondronenbildung (3-15 Zellen)
Grad III _{0/d}	<ul style="list-style-type: none"> · Grenze zwischen Nukleus(rest) und Anulus vollständig aufgehoben · Markante Anulusfissuren mit Kavernenbildung · Markante Lamellendesorganisation mit deutlichem Nachweis von reparativem Bindegewebe · Kavernenbildung des Nukleus(rest) bis zum kompletten Nukleusverlust · Markante Chondronenbildung (> 15 Zellen)

Tab. 7: Histologischer Grading-Score für Veränderungen der Bandscheibe modifiziert nach Collins (161), Lewin (59), Boos und Weiler (48)

2. Morphologische Veränderungen der knorpeligen Endplatte und des subchondralen Knochens

Eine Analyse von Veränderungen der knorpeligen Endplatte und des subchondralen Knochens der Wirbelkörper erfolgte je mit Hilfe eines Grading-Scores nach Gries (62). Diese umfassen 3 Grade der Degeneration. Die bewerteten Einzelkriterien sind im einzelnen den Tabellen 8 und 9 zu entnehmen.

Grad	Parameter
Grad 0	<ul style="list-style-type: none"> · Uniforme Dicke · Intakte Verbindung zum Knochen · Uniforme Kalzifizierung <1/5 der knorpeligen Endplatte (CEP) · Uniforme Zellverteilung
Grad I	<ul style="list-style-type: none"> · Geringe Knorpelverschmälung · Schmale transverse Fissuren · Irreguläre Dicke der kalzifizierten Zone · Einsprossen einiger Gefäßkanäle · Schmale Chondronen
Grad II	<ul style="list-style-type: none"> · Markante Knorpelverschmälung · Markante Verdickung der kalzifizierten Zone · Viele transverse Fissuren · Viele Gefäßkanäle · Viele Chondronen
Grad III	<ul style="list-style-type: none"> · Totaler Knorpelverlust · Kalzifikation des Restknorpels · Weitgreifende Fissuren

Tab. 8: Histologischer Score für morphologische Veränderungen der knorpeligen Endplatte nach Gries (62)

Grad	Parameter
Grad 0	<ul style="list-style-type: none"> · Gleichmäßige Dicke der knöchernen Endplatte (KEP) · Nur Lamellenknochen · Deutliche Verbindung mit CEP · Einige Gefäßeinsprossungen in CEP
Grad I	<ul style="list-style-type: none"> · Geringfügig unebene KEP · Minimaler Umbau der KEP
Grad II	<ul style="list-style-type: none"> · Moderat unebene KEP · Moderate Trabekelverdickung · Defekte der Knochenlamellen · Minimale Fibrotisierung im Markspalt
Grad III	<ul style="list-style-type: none"> · Markant unebene KEP · Markante Trabekelverdickung · Markante Fibrotisierung des Markraums · Knorpelbildung

Tab. 9: Histologischer Score für morphologische Veränderungen des subchondralen Knorpels nach Gries (62)

3. Spondylophytenbildung

Das Ausmaß der Knochenanbauten an den Wirbelkörperendleisten wurde lichtmikroskopisch mittels der Schnitte in Safranin-Orange/von Kossa-Färbung sowie der Trichromfärbung nach Masson-Goldner untersucht. Die Einteilung erfolgte in drei Grade (Tab. 10). Die Größenabmessung der Spondylophyten wurde parallel zur knöchernen Endplatte mit Hilfe eines Millimetermaßstabes bei kleinster Vergrößerung (1,6fach) vorgenommen.

Grad	Parameter
Grad 0	· Keine
Grad Ia	· Schmal auf kranial oder kaudal beschränkt (< 2 mm)
Ib	· Schmal kranial und kaudal (< 2 mm)
Grad II	· Mittelgroß mit beginnender Spangenbildung (2 mm-6 mm)
Grad III	· Groß mit knöcherner Spangenbildung / Spontanfusion (> 6 mm)

Tab. 10: Histologischer Score für die mikroskopisch sichtbare Spondylophytenbildung

4. Veränderungen an den Facettengelenken

Die Facettengelenke wurden auf Veränderungen an dem Gelenkknorpel, der osteochondralen Verbindung und dem subchondralen Knochen untersucht. Die Schnitte der Trichromfärbung nach Masson-Goldner und der Alcianblau/Kernechtrot-Färbung wurden mit einem Grading-Score nach Moore ausgewertet (162). Die berücksichtigten Parameter sind den Tabellen 11-13 zu entnehmen.

Grad	Parameter
Grad 0	· Glatte intakte Oberfläche · Regelrechte Chondrozytenverteilung
Grad I	· Geringe transverse Oberflächenaufrauung · Minimale Chondrozytennekrose · Einige Chondrone
Grad II	· Fissuren < 1/2 der CEP tief · Knorpelverlust < 1/2 der Tiefe · Moderate Chondrozytennekrose · Viele Chondronen
Grad III	· Tiefe Fissuren · Zonen mit totalem Knorpelverlust · Extensive Chondrozytennekrose

Tab. 11: Histologischer Score für morphologische Veränderungen des Facettengelenkknorpels nach Moore (162)

Grad	Parameter
Grad 0	· Gleichmäßige Grenzzone · Kalzifikation < 1/5 der Knorpeldicke
Grad I	· Minimale Irregularität an der Grenzzone · Kalzifikation 1/5 – 1/4 der Knorpeldicke
Grad II	· Moderate Irregularität an der Grenzzone · Kalzifikation 1/4 - 1/2 der Knorpeldicke
Grad III	· Kalzifikation > 1/2 der Knorpeldicke

Tab. 12: Histologischer Score für morphologische Veränderungen der osteochondralen Verbindung der Facettengelenke nach Moore (162)

Grad	Parameter
Grad 0	· Regelrechter Lamellenknochen · Regelrechte Vaskularisierung des Knochens
Grad I	· Geringe Trabekelverdickung · Schmale Fissuren an der Knorpel-Knochengrenze · Gelegentlich Bindegewebsformation
Grad II	· Moderate Trabekelverdickung · Geflechtknochenbildung · Moderate Bindegewebsformation
Grad III	· Sklerosierung des Knochens · Zystenbildung · Extensive Fibrosierung

Tab. 13: Histologischer Score für morphologische Veränderungen des subchondralen Knochens der Facettengelenke nach Moore (162)

4.4.2 Quantitative Auswertung

Eine weitere Möglichkeit die histologischen Schnitte zu analysieren und quantitativ zu beurteilen bietet ein computergestütztes Auswertungssystem. Das Bildanalyse-System setzt sich aus Morphometrie-Software (KS 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland), einem Personalcomputer und einem Monitor zusammen. Mittels eines Leuchttisches und einer hochauflösenden Digitalkamera (Nikon Superhigh-Performance, 3 x-Zoom, Cool Pix 990, Japan) wurden die histologischen Schnittpräparate digitalisiert (Einstellungen: Portrait, Blitz aus, 5,3-5,9 F, P1:125, Fine 8)). Währenddessen wurde ein Millimetermaß an die Längsachse der Präparate angelegt und für die später notwendige Kalibrierung im Bild festgehalten. Mit der eigens an diese Studie adaptierten Software war es möglich die digitalen Aufnahmen zu analysieren (Programmautor: Martin Wolny, Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland).

Die problemorientierten Programmalgorithmen wurden zur Identifizierung spezifischer Strukturen codiert und ermöglichten so die Erfassung von Zahlen, Distanzen und Flächen in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen Anfärbung.

Zu Beginn der histomorphometrischen Auswertung erfolgte die Kalibrierung der Bilder. Das Programm glich unter Zuhilfenahme der im digitalen Bild befindlichen Millimeterskala und der manuellen Distanzeingabe die Präparate auf eine einheitliche Maßeinheit an. Zur Vermessung der histomorphometrischen Parameter wurde der Fragestellung entsprechend neun „regions of interest“ (ROI) definiert. Mit Hilfe des Programms kam es dann zur Berechnung folgender struktureller Parameter:

- Knochenfläche/Gesamtfläche der ROI (%) (B.Ar/T.Ar)
- Knochendichte (%) (BDn)
- Trabekeldicke (μm) (Tb.Wi) (Abb. 19)
- Trabekelanzahl (/mm) (Tb.N)
- Trabekelseparation (μm) (Tb.Sp) (Abb. 20)
- Anzahl der Trabekelverzweigungen/ROI (Abb. 21)
- Knorpelfläche/Gesamtfläche der ROI (%) (Cg.Ar/T.Ar)



Abb. 19: Trabekeldicke (μm) (Tb.Wi)



Abb. 20: Trabekelseparation (μm) (Tb.Sp)

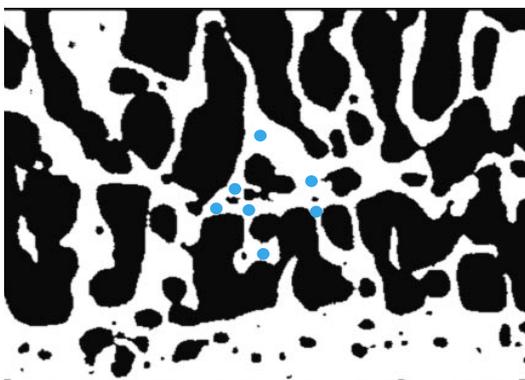


Abb. 21: Trabekelverzweigungen/ROI

Die gewonnenen Werte machen es beispielsweise möglich, die Versuchsgruppen im Hinblick auf knöcherne Umbauvorgänge oder Fibrosierung der Restbandscheibe untereinander zu vergleichen. Insbesondere für die Bildanalyse eignen sich die Schnitte mit den Färbungen Safranin-Orange/von Kossa und Safranin-Orange/Lichtgrün.

Generell wurden drei verschiedene ROIs festgelegt (Abb. 22). Die obere ROI beinhaltet Anteile des kranialen Wirbelkörpers L3 und die untere des kaudalen Wirbelkörpers L4. Die mittlere ROI enthält die Bandscheibenfläche des Wirbelsäulensegmentes L3-L4. Unterteilt man diese ROIs jeweils in drei gleich große Anteile, erhält man die in den Abbildungen 23 und 26 gezeigten neun Regionen.

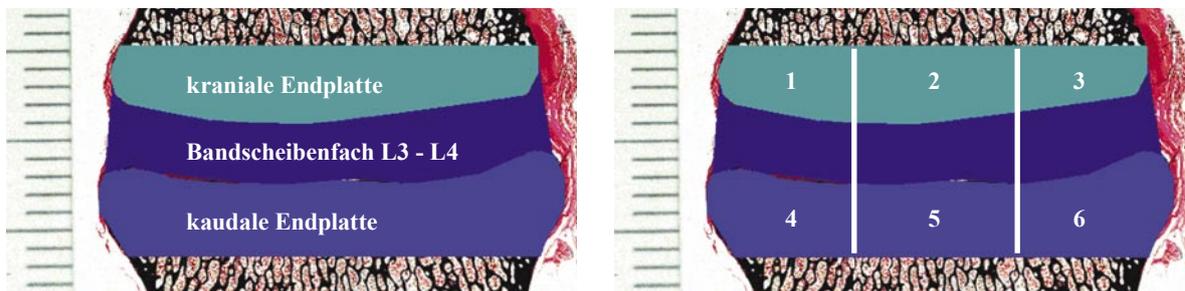


Abb. 22: Darstellung der drei ROIs; Safranin-Orange/von Kossa-Färbung

Abb. 23: Unterteilung der kranialen (1-3) und kaudalen Endplatte (4-6) in jeweils drei ROIs; Safranin-Orange/von Kossa-Färbung

Das nachstehende Beispiel erklärt die Berechnung der ROIs für jedes neu auszuwertende Präparat: Um die obere ROI zu erhalten, wird manuell die maximale Breite der knöchernen Endplatte des Wirbelkörpers L3 eingezeichnet (krEPB) und diese dann auf den untersten, mittig liegenden Punkt (M1) der Deckplatte parallel verschoben. Von Punkt M1 ausgehend, wird nun computergestützt $1/6$ der Strecke krEPB senkrecht nach kranial aufgetragen. Auf gleiche Weise verfährt man bei der Erstellung der unteren ROI am Wirbelkörper L4. Ausgehend von der manuell eingezeichneten maximalen Breite der knöchernen Endplatte L4 (kEPB) und Punkt M2, wird die untere ROI konstruiert. Der Punkt M2 ist hier als höchster, mittig liegender Punkt der kaudalen Deckplatte und die Höhe des Rechtecks ist als ein $1/6$ der kEPB definiert. Um die Ausziehungen der knöchernen Randleiste in die Berechnung mit einzubeziehen, wird das entstehende Rechteck nach kranial entsprechend erweitert (Abb. 24). Durch das Dreiteilen der krEPB bzw. der kEPB erhält man je Wirbelkörper drei ROIs (Abb. 23).

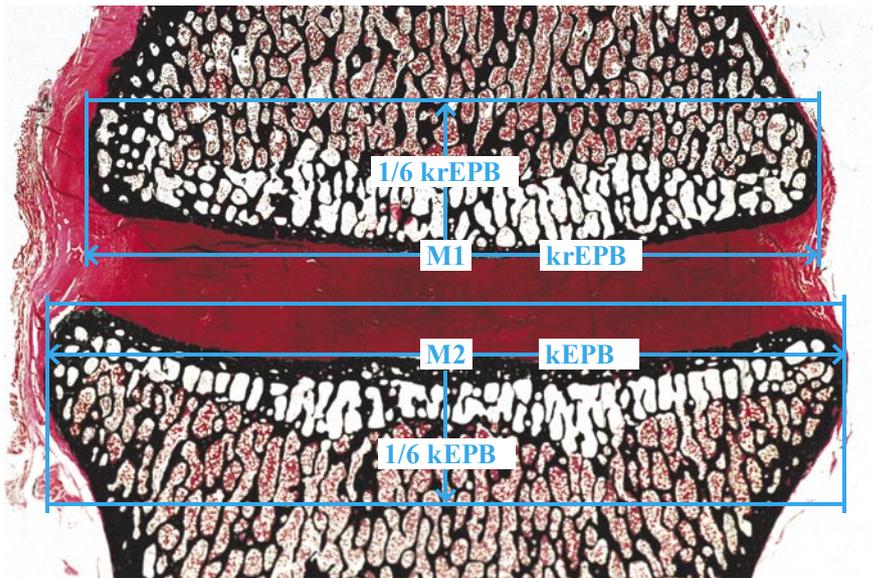


Abb. 24: Schematische Darstellung der Konstruktion der oberen und unteren ROI; Safranin Orange/von Kossa-Färbung

Für die Berechnung der Knochenfläche, Trabekeldicke, Trabekelanzahl, Trabekelseparation und Trabekelverzweigung wurden die digitalen Bilder der jeweils mit Safranin-Orange/von Kossa gefärbten Schnitte verwendet. In diesen sind alle mineralisierten Gewebeanteile schwarz gefärbt. Die verbleibenden Bereiche erscheinen gut abgrenzbar intensiv rot. Um die Knochenfläche der jeweiligen ROI zu erhalten, werden die schwarz gefärbten Anteile als die zu berechnende Fläche definiert. Diese werden nun in Form einer binären Maske vom Bildanalyseprogramm grün markiert. Zudem kann die Vorgabe des Programms noch manuell nachgearbeitet werden. Auf diese Weise kann man nicht optimal gefärbtes Gewebe nachträglich markieren und bei der Berechnung mit berücksichtigen. Trabekeldicke, Trabekelanzahl und Trabekelseparation werden automatisch vom Bildanalyseprogramm errechnet. Die Anzahl der Trabekelverzweigungen werden manuell anhand der digitalen Bilder als Punkte gekennzeichnet und im Anschluss vom Programm addiert. Nur Verzweigungen von mindestens drei Trabekeln wurden als solche markiert und gezählt.

Um die die Bandscheibenfläche enthaltende mittlere ROI zu konstruieren, wird jeweils links lateral (A) und rechts lateral (B) der äußere untere Punkt der kranialen Deckplatte L3 markiert. An der kaudalen Deckplatte L4 zeichnet man gleichermaßen links (C) und rechts (D) den äußeren oberen Punkt ein. Verbindet man nun die Punkte A und C sowie B und D miteinander, erhält man die lateralen Ränder der mittleren ROI. Vervollständigt wird diese durch das manuelle Einzeichnen der oberen und unteren Bandscheibengrenzen (Abb. 25). Durch Dreiteilen der jeweiligen Bandscheibenbreite erhält man drei ROIs (Abb. 26).



Abb. 25: Schematische Darstellung der Konstruktion der mittleren ROI; Safranin-Orange/ von Kossa-Färbung

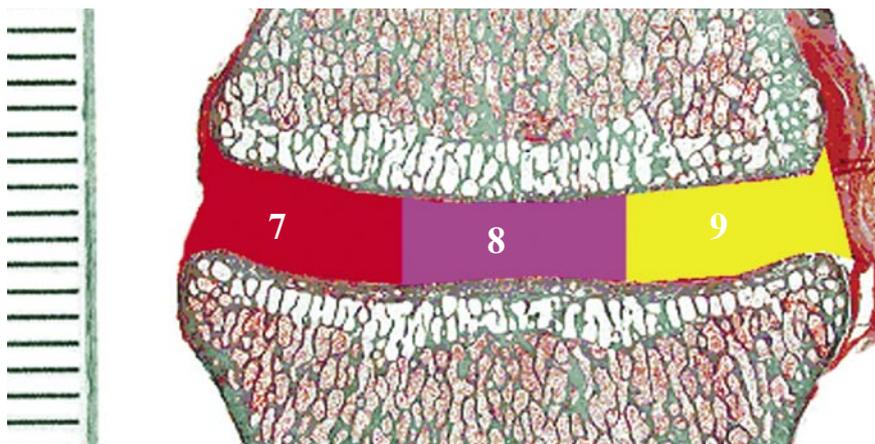


Abb. 26: Unterteilung des Bandscheibenfaches in drei Regionen (7-9); Safranin-Orange/ Lichtgrün-Färbung

Es wurden die Bilder der mit Safranin-Orange/Lichtgrün gefärbten Schnitte für die Berechnung der Knorpelfläche genutzt. Hier kommt es zur spezifischen Darstellung des Knorpelgewebes, welches durch seine intensive Rotfärbung gut von Bindegewebe (grün) abgrenzbar wird. Als zu berechnende Fläche wird nun das rote Gewebe markiert und anschließend vom Bildanalyzesystem als Gesamtknorpelfläche addiert.

Gewebefreie Flächen innerhalb der ROIs wurden markiert und von der standardmäßig definierten ROI subtrahiert. Auf diese Weise konnte verhindert werden, dass Schäden im Präparat Einfluss auf die Flächenberechnung hatten und die Ergebnisse verfälschten.

Die Berechnung der Parameter wurde neben der Autorin von einer zweiten Person durchgeführt und der Mittelwert aus den errechneten Zahlen gebildet.

4.4.3 Statistik

Sowohl die semiquantitative als auch die quantitative Auswertung wurde neben der Autorin von einer zweiten Person durchgeführt und bei Abweichungen der Mittelwert der gewonnenen Daten gebildet. Auf diese Weise konnten individuelle Messwertfehler möglichst gering gehalten werden.

Die statistische Auswertung aller Daten wurde mit dem Datenverarbeitungsprogramm SPSS 12.01 für Windows. (SPSS Deutschland GmbH, München) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die im Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL für Windows 2002 (Microsoft Cooperation, USA) archivierten Daten importiert. Die statistische Berechnung der histomorphologischen Ergebnisse erfolgte über den Chi-Quadrat-Test bzw. Fishers exakten Test, ein Test für zwei oder mehr unabhängige Stichproben. Die histomorphometrischen Daten der Bildanalyse wurden gleichermaßen in das SPSS-Programm übertragen und die statistische Auswertung mit dem U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon durchgeführt.

Dieser ist ein nichtparametrischer Test für zwei unabhängige Stichproben, welcher für die Messgröße keine Normalverteilung voraussetzt. Weisen beide Stichproben eine annähernd gleiche Wölbung auf, so ist der Test relativ trennscharf. Die Nullhypothese entspricht der des t-Tests für unverbundene Stichproben. Bei einem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 (= Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %), das heißt einem p -Wert $\leq 0,05$ wurde von einem signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen ausgegangen. Die festgestellten Unterschiede charakterisieren die im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Proben und stellen keine allgemeingültigen Aussagen dar.

Graphisch wurden die semiquantitativen Ergebnisse in Säulen- oder Balkendiagrammen dargestellt. Die Veranschaulichung der quantitativen Resultate erfolgte als Boxplots. In diesen Graphiken wird sowohl die Lage als auch die Streuung der Messwerte deutlich (Abb. 27). Eine Boxplotdarstellung und die enthaltenen Parameter werden wie folgt interpretiert: Der Median, auch 50-Prozentquartil genannt, liegt innerhalb der Box. Zwischen der 25- und 50-Prozentquartile sind 50 Prozent der gemessenen Werte angesiedelt. Die Whisker (T-förmige Markierung) können maximal die 1,5-fache Länge der Box betragen und enthalten jeweils die Werte unterhalb des 25-Prozentquartils bzw. oberhalb des 75-Prozentquartils. Ausreißer und Extremwerte sind in Form von Kreisen und Sternen markiert.

* ← 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.

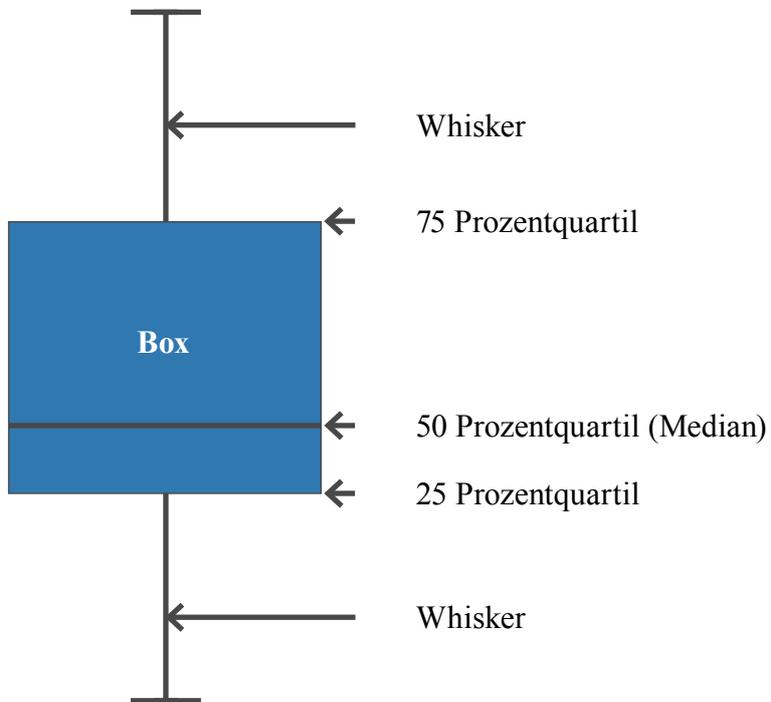


Abb. 27: Darstellung eines Boxplots