

3. Material und Methoden

3.1 Wahl des Modells

Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass sich das Schaf bezüglich seiner knöchernen Dimensionen für die traumatologische und orthopädische Forschung als Versuchstier eignet (Slater *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1999; Cain u. Fraser, 1995). Trotz geometrischer und biomechanischer Unterschiede der Halswirbelsäulenform von Schaf und Mensch wird das Schaf seit Jahren als Versuchstier erfolgreich in der humanmedizinischen Grundlagenforschung verwendet. Verschiedene Autoren haben belegt, dass die ovine Halswirbelsäule anatomisch und biomechanisch zur Halswirbelsäule des Menschen große Ähnlichkeiten aufzeigt (Wilke *et al.*, 1997 a; Wilke *et al.*, 1997 b; Kandziora *et al.*, 2001). Zur Standardisierung des Versuchsvorhabens wurden nur Tiere ausgewählt, die in ihrem Körperbau und Habitus gleich entwickelt waren und deren Gesundheitszustand medizinisch als unbedenklich zu beurteilen war. Es wurden 32 zweijährige, weibliche Merinoschafe mit einem Gewicht von durchschnittlich 65 kg (\pm 10 kg) nach eingehender tierärztlicher Untersuchung in die tierexperimentelle Einrichtung der Charité eingestellt. Die Untersuchung umfasste dabei die übliche klinische Untersuchung, um Vorkrankungen auszuschließen. Es wurden nur güste Tiere in die Versuchsgruppe aufgenommen, die zusätzlich mit *PGF 2 α* (ILIREN[®], Intervet Deutschland GmbH, Unterschleissheim) behandelt wurden, um eine Trächtigkeit im Frühstadium abubrechen. Des Weiteren erhielten sie eine Paramunisierung durch das Präparat BAYPAMUNE[®], (*Parapox ovis*, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und eine Behandlung gegen Ekto- und Endoparasiten durch die Präparate IVOMECE[®] (*Ivermectin*, Merial, Deutschland) und FASINEX[®] (*Triclabendazolum*, Novartis Tiergesundheit AG, Deutschland). Das Alter der Tiere wurde anhand des Zahnstatus ermittelt. In den Versuch wurden nur weibliche Tiere aufgenommen, um das Aggressionspotential untereinander und die Belastungen in der Gruppenhaltung möglichst gering zu halten. Die Stallhaltung der Tiere erfolgte vor und direkt nach der Operation auf Einstreu und Stroh. Zwei Wochen post operationem wurden die Tiere in eine Freilandhaltung verlegt. Es wurde zweimal täglich Heu gefüttert, Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Für alle Schafe der Versuchsgruppen herrschten gleiche Haltungsbedingungen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Intervertebrale Spondylodese durch einen biodegradierbaren Cage an der Halswirbelsäule des Schafes“ (Amtliche Tierversuchsnummer G 0193/01) genehmigt und durchgeführt.

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Versuchsgruppen

Die Schafe wurden in vier Gruppen mit jeweils acht Tieren aufgeteilt (siehe Tab. 1). In den Gruppen I und III kam der mit Spongiosa augmentierte 70/30 Poly-(L, DL)-laktid-Cage als intervertebrales Implantat zum Einsatz. Die Standzeiten dieser Tiere lagen bei zwölf und 36 Wochen. Bei den Gruppen II und IV wurde die Spondylodese der Halswirbelsäule mittels einem autologen trikortikalen Beckenkammspan durchgeführt. Diese dienten als Referenzgruppen und hatten ebenfalls Standzeiten von zwölf bzw. 36 Wochen.

Tabelle 1: Darstellung der Gruppengrößen, der verwendeten Implantate und der jeweiligen Standzeiten

Gruppe	Verfahren	Standzeit
I n = 8	PLDLLA-Cage + autologe Spongiosa	12 Wochen
II n = 8	autologer trikortikaler Beckenkammspan	12 Wochen
III n = 8	PLDLLA-Cage + autologe Spongiosa	36 Wochen
IV n = 8	autologer trikortikaler Beckenkammspan	36 Wochen

3.2.2 Implantate

Als Bandscheibenersatz diente der von der Firma *Biovision GmbH Ilmenau, Germany* hergestellte Cage. Er besteht aus Poly-(L, DL)-laktid in einem Verhältnis von 70 zu 30 und ist in einem keilförmigen Zylinderdesign gestaltet (Abb. 12 a). Zur besseren Verankerung im Bandscheibenfach besitzt er auf der planen Ober- und Unterseite acht Spikes. Als zweites Interponat wurde jeweils ein autologer trikortikaler Beckenkammspan verwendet (Abb. 12 b). Die Abmessungen beider Implantate sind der Tabelle 2 zu entnehmen.



Abb. 12 a und b: Die verwendeten Implantate: a) bioresorbierbarer 70/30-PLDLLA-Cage, b) autologer trikortikaler Beckenkammspan; Abmessungen der Implantate siehe Tabelle 2

Tabelle 2: Zusammenstellung der Abmessungen der verwendeten Implantate

Implantat	ventrale Höhe	dorsale Höhe	Länge bzw. Ø	Breite
PLDLLA-Cage	5 mm	7 mm	16 mm	-
Beckenkammspan	5 mm	7 mm	15 mm	10mm

3.2.3 Operation

Vorbereitungen

Die zu operierenden Tiere wurden am Tag vor dem Eingriff in einem Auslauf ohne Futter untergebracht, um eine 24-stündige Futterkarenz zu erzielen. Wasser stand den Tieren bis zum Morgen des Operationstages zur freien Verfügung. Als Prämedikation erhielt jedes Tier 2 g *Amoxicillin* i. v. (Augmentan[®] i. v., SmithKline Beecham Pharma, München Deutschland) über einen venösen Zugang in der Vena cephalica. Die Narkoseeinleitung erfolgte gewichtsadaptiert mit 0,5 bis 1,5 g *Thiopenthal-Natrium* (Trapanal[®], Altana Pharma, Konstanz, Deutschland) und 0,1 mg *Fentanylhydrogencitrat* (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland), welche nach Wirkung unter Reflexkontrolle bis zum Erreichen der Intubationsfähigkeit injiziert wurden. Anschließend erfolgte die Intubation mit einem Endotrachealtubus (Mallinckrodt, Irland, Ø 8 – 9 mm) und das Legen einer Magensonde (Rüsch, Deutschland, Ø 14 mm), um eine etwaige Pansentympanie zu vermeiden. Zeitgleich wurde das Tier an das Monitorgerät für die Kontrolle der O₂-Sättigung, des CO₂-Gehaltes, der Herzfrequenz und zur Darstellung des EKG (Anästhesie Sulla 800V, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) angeschlossen. Nach der Positionierung des Schafes in rechter Seitenlage wurde der Operationsbereich gereinigt und rasiert. Die Erhaltungsnarkose wurde als Inhalationsnarkose mit *Isofluran* (Isofluran-Lilly[®], Lilly, Bad Homburg, Deutschland) und einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch im Verhältnis 60 zu 40 durchgeführt. Als analgetische Komponente wurden 0,2 mg *Fentanylhydrogencitrat* (s. o.) i. v. verabreicht.

Beckenkammspan- bzw. Spongiosaentnahme

Die Präparation des trikortikalen Beckenkammspanns bzw. der Spongiosa, welche als autologe Transplantate verwendet wurden, geschah jeweils in der gleichen Weise. Zunächst wurde die Haut über den dorsalen Abschnitten des linken Beckenkammes inzidiert, anschließend die Subcutis durchtrennt und lateral und medial der Spina iliaca die Iliacus- und Glutaealmuskulatur subperiostal mit Hilfe eines Elektrotoms mobilisiert. Mittels Meißel wurde die freiliegende Crista iliaca auf einer Länge von 15 mm und einer Tiefe von 10 mm osteotomiert und der trikortikale Span entnommen. Bei alleiniger Spongiosagewinnung wurde der Beckenkamm lediglich auf einer Fläche eröffnet und die Spongiosa mit dem scharfen Löffel entnommen. Die gewonnene Spongiosa wurde anschließend in die Pore des Cages „press-fit“ eingegeben (Abb. 13).

Letztlich erfolgte der schichtweise Wundverschluss mit Einzelknopfnähten. Die Transplantate wurden bis zur Implantation in einer mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchteten Kompresse aufbewahrt.



Abb. 13: PLDLLA-Cage mit Spongiosaaugmentation

Spondylodese

Der ventrale Zugang zur Halswirbelsäule erfolgte über einen ca. 12 cm langen Hautschnitt entlang des Vorderrandes des M. sternocleidomastoideus der linken Halsseite, wodurch dieser nach Durchtrennung des subkutanen Fettgewebes und der oberflächlichen Halsfaszie dargestellt werden konnte (Abb.14). Anschließend wurde der M. sternocleidomastoideus angehoben und mittels Langenbeckhaken dorsolateral retrahiert (Abb. 15). An diesem vorbei konnte nun durch stumpfe Präparation die ventrale Halsmuskulatur des zu operierenden Wirbelsäulensegmentes dargestellt werden. Die Trachea und der Ösophagus, die beiderseits von der A. carotis communis und der V. jugularis interna und dem Truncus vagosymphathicus begleitet werden, konnten leicht zur Seite geschoben werden. Nach der Darstellung der prävertebralen Muskulatur (M. longus colli) wurde der Bandscheibenraum des Bewegungs-

segmentes C 3 / C 4 mit einem Kirschner-Draht markiert und mittels Bildverstärker (BV 25, Phillips) röntgenologisch kontrolliert (Abb. 16) Des Weiteren erfolgte die longitudinale Spaltung des M longus colli. Das ventrale Wirbelsäulenlängsband (Lig. longitudinale ventrale) wurde auf der Höhe der Bandscheibe dargestellt und horizontal durchtrennt (Abb.17). Anschließend wurde die Bandscheibe mittels eines Luers, eines scharfen Löffels sowie einer Fräse entfernt und die Deck- und Bodenplatten der angrenzenden Wirbelkörper bis zum Auftreten petechialer Blutungen angefräst. In das so vorbereitete Bandscheibenfach wurde unter Distraction der Halswirbelsäule mittels Steinmann-Nägeln das jeweilige Implantat eingebracht und standardisiert 2 mm hinter der Wirbelkörpervorderkante der Bodenplatte C 4 positioniert (Abb. 18). Die ventrale Stabilisierung der Implantation erfolgte durch eine Dreilochdrittelrohrplatte, die mittels zwei 3,5 mm starken Spongiosaschrauben befestigte wurde (Abb. 19). Abschließend wurde die Wunde gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und durch einen schichtweisen Wundverschluss, der eine Muskulatur-, Faszien-, Subkutan- und eine Hautnaht beinhaltete, verschlossen. Nach Anlegen eines sterilen Verbandes erfolgte die Narkoseausleitung. Unter tierärztlicher Aufsicht wurden die Schafe nach Extubation bis zum vollständigen Erwachen und Aufstehen in ihrem Stall beobachtet. Alle Schafe erholten sich ohne Komplikationen von der Operation. Direkt nach dem Erwachen aus der Narkose stand ihnen Futter, Wasser und Bewegung ad libitum zur Verfügung.

Für fünf Tage post operationem erhielten die Tiere eine Analgesie mit 0,5 g Metamizol-*Natrium* i. m. (Novalminsulfon[®], Lichtenstein). Der Verband wurde täglich gewechselt und anschließend durch einen Sprühverband ersetzt. Die Fäden der Wundnaht wurden nach 14 Tagen entfernt. Begleitend wurde die Körperinnentemperatur, das Gewicht sowie der Allgemeinzustand der Tiere kontrolliert.



Abb. 14: Darstellung des Musculus sternocleidomastoideus nach Durchtrennung von Haut, Fettgewebe und Halsfaszie

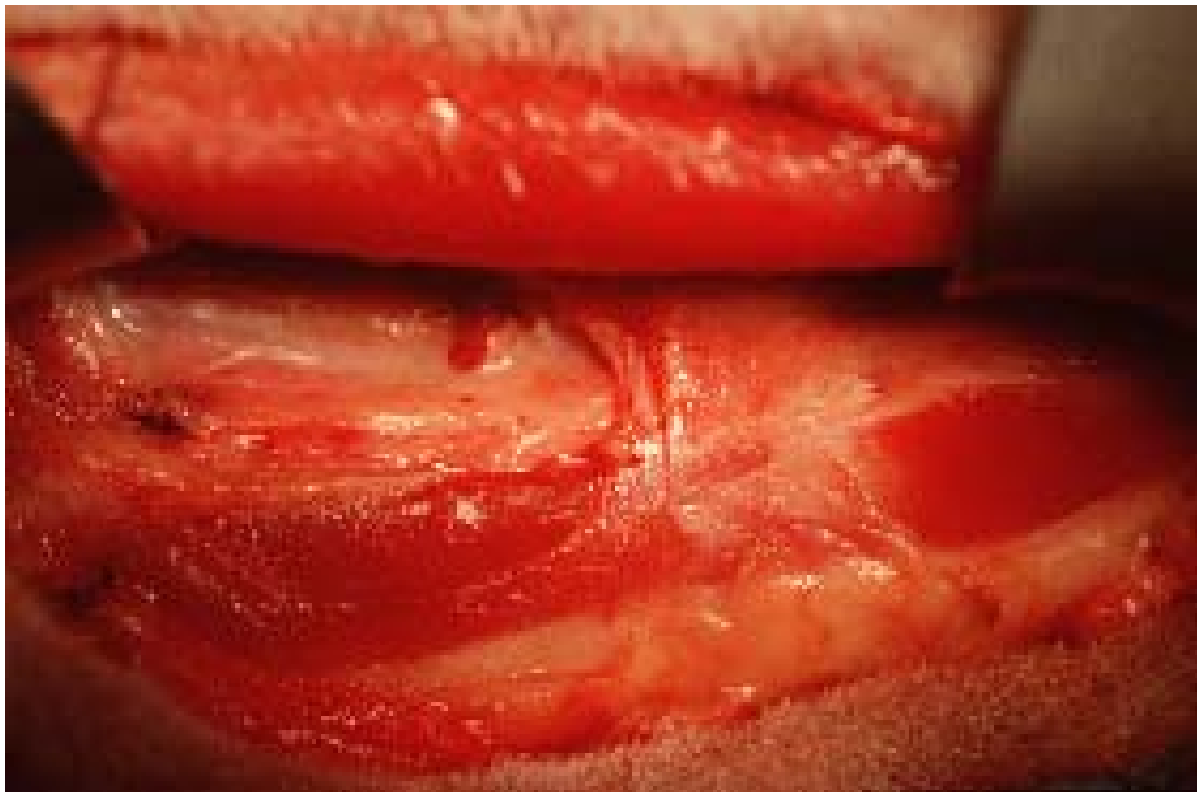


Abb. 15: Mobilisierung des Musculus sternocleidomastoideus und seine Retrahierung



Abb. 16: Darstellung des M. longus colli und Markierung des Intervertebralraums C 3 / C 4



Abb. 17: Darstellung und Diskektomie der Bandscheibe



Abb. 18: Implantiertes PLDLLA-Cage im Bandscheibenfach C 3 / C 4

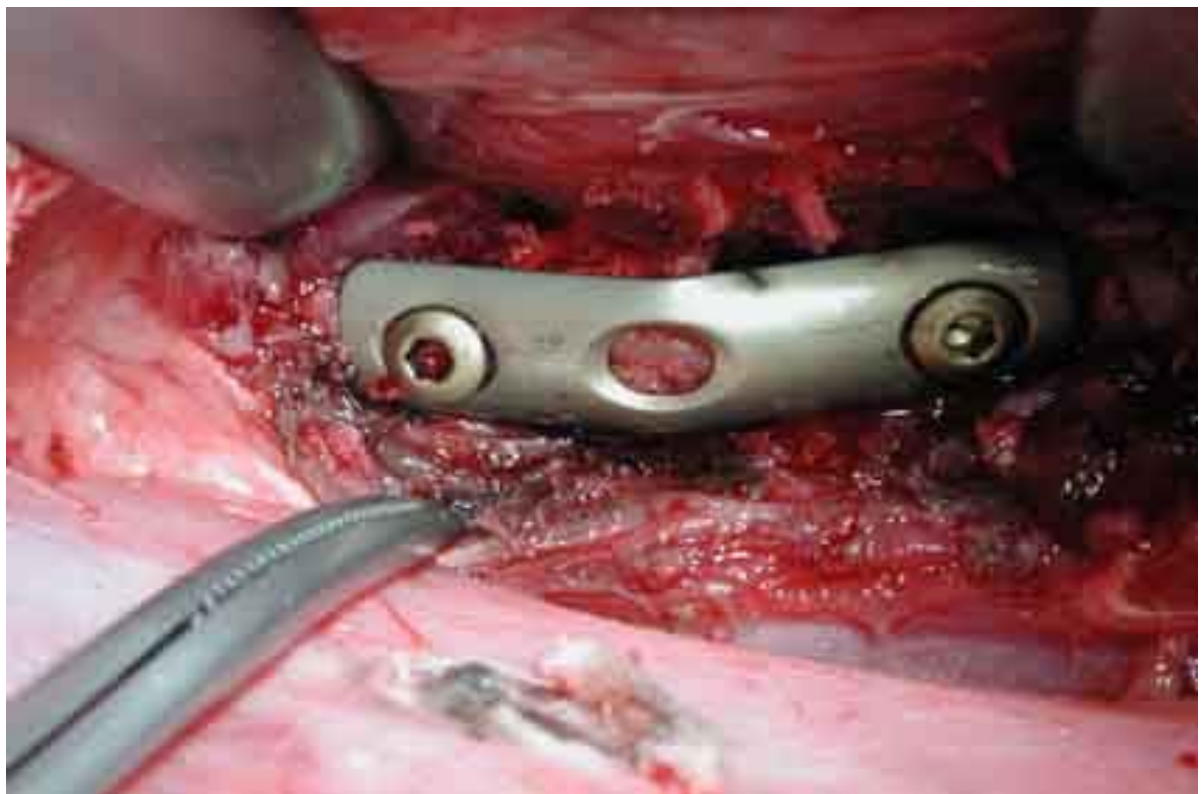


Abb. 19: Ventrale Stabilisierung der Implantation mittels Dreilochdrittelrohrplatte

3.3 Probenentnahme und Aufbereitung der Halswirbelsäule

3.3.1 Euthanasie und Entnahme des Halswirbelsegmentes

Nach Ablauf der Standzeit von jeweils zwölf bzw. 36 Wochen post operationem erfolgte die Euthanasie der Tiere. Hierbei wurden 1,0 g *Thiopental- Natrium* (s. o.) und 0,1 mg *Fentanylhydrogencitrat* (s. o.) zu Sedation und Analgesie verwandt und anschließend *Kaliumchlorid* (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Deutschland) bis zum Eintritt des Todes i. v. injiziert. Der Tod wurde auskultatorisch festgestellt. An dem sich in Seitenlage befindenden Tier wurde nun die Halswirbelsäule entnommen. Dazu wurde nach Entfernung der Halsweichteile die Wirbelsäule vom Hinterhaupt bis zum ersten Brustwirbel mittels oszillierender Säge (Aesculap Typ G-6100-05) abgesetzt.

3.3.2 Präparation

Die nach der Euthanasie der Schafe entnommenen Halswirbelsäulen wurden zuerst grob von Weichteilresten und Muskulatur befreit (Abb. 20). Anschließend wurden mittels einer oszillierenden Knochensäge (s. o.) die für die weiteren Untersuchungen nicht benötigten knöchernen Anteile der Wirbelsäule abgetrennt. Hierbei wurde ein kranialer Sägeschnitt im Zwischenwirbelraum von C 2 und C 3 und ein kaudaler Schnitt im Zwischenwirbelraum zwischen C 4 und C 5 gesetzt. Dadurch blieb das Halswirbelsäulensegment bestehend aus den Wirbelkörpern C 3 und C 4 vollständig erhalten (Abb. 21).

3.3.3 Sägen

Das Wirbelkörpersegment wurde mit einer wassergekühlten Säge (Makrotrennschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt, Deutschland) in fünf 4 mm starke Scheiben gesägt (Abb. 22). Dabei verlief die Sägerichtung sagittal also von ventral nach dorsal. Für die weitere histologische Aufarbeitung wurde das mittlere (mediane) Präparat Nr. 3 verwendet. Die übrigen Sägepräparate dienten zur Herstellung von immunhistologischen Färbungen bzw. als Ersatzpräparate.

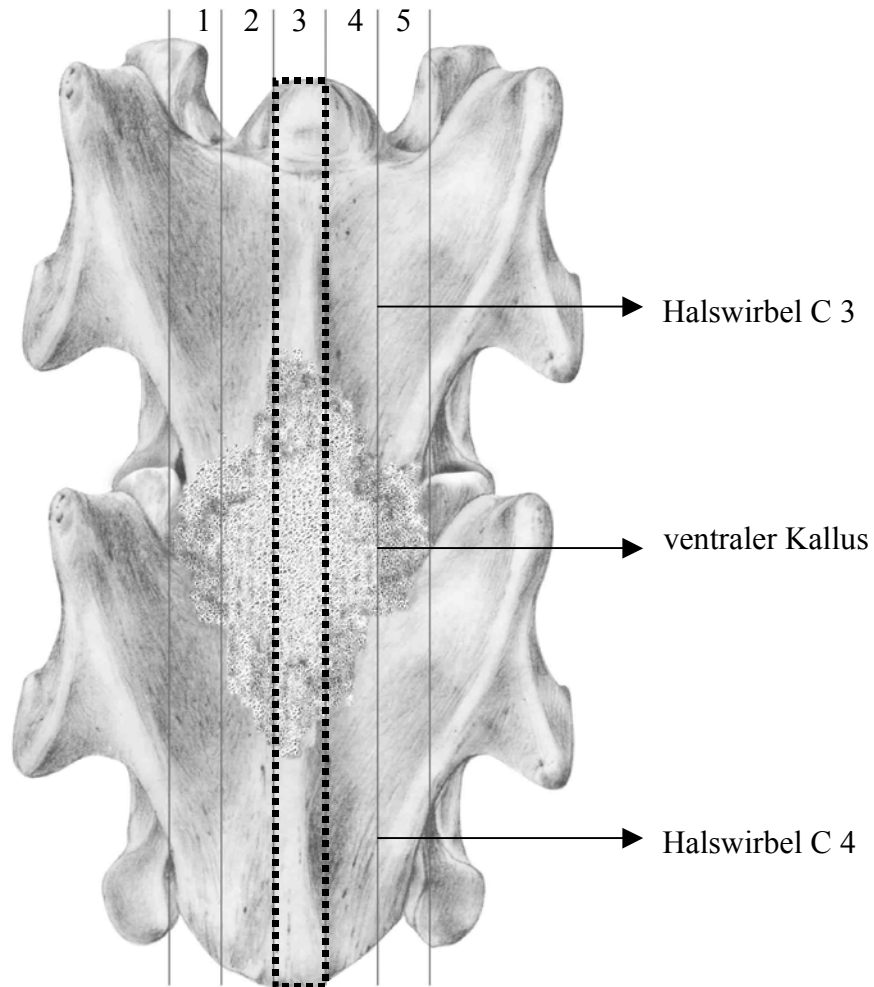


Abb. 22: Sägeschema, ventrale Ansicht. Schematische Darstellung der sagittalen Schnittführung am Bewegungssegment C 3 / C 4 und die dabei entstehenden Präparate 1 – 5; Präparat 3 (umrandet) wurde zur Herstellung aller weiteren histologischen Präparate verwendet

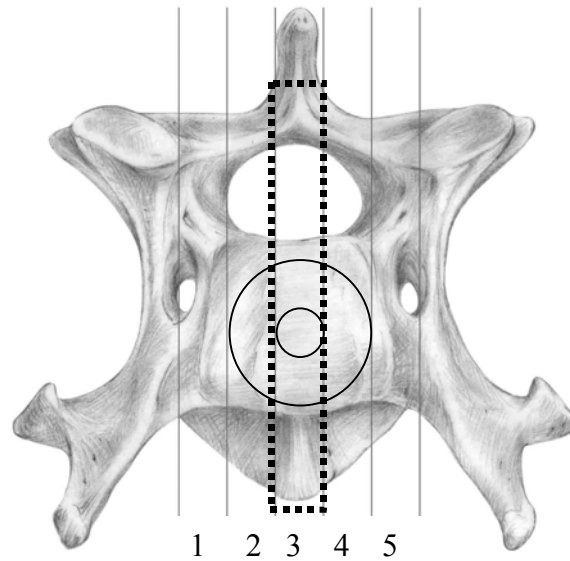


Abb. 23: Sägeschema; schematische Darstellung der Schnittführung, Ansicht von kranial auf C 4, schematische Darstellung der Position des implantierten Cages. (Abb. 22, 23: Grafikabteilung, G. Heimann, Charité, Berlin)

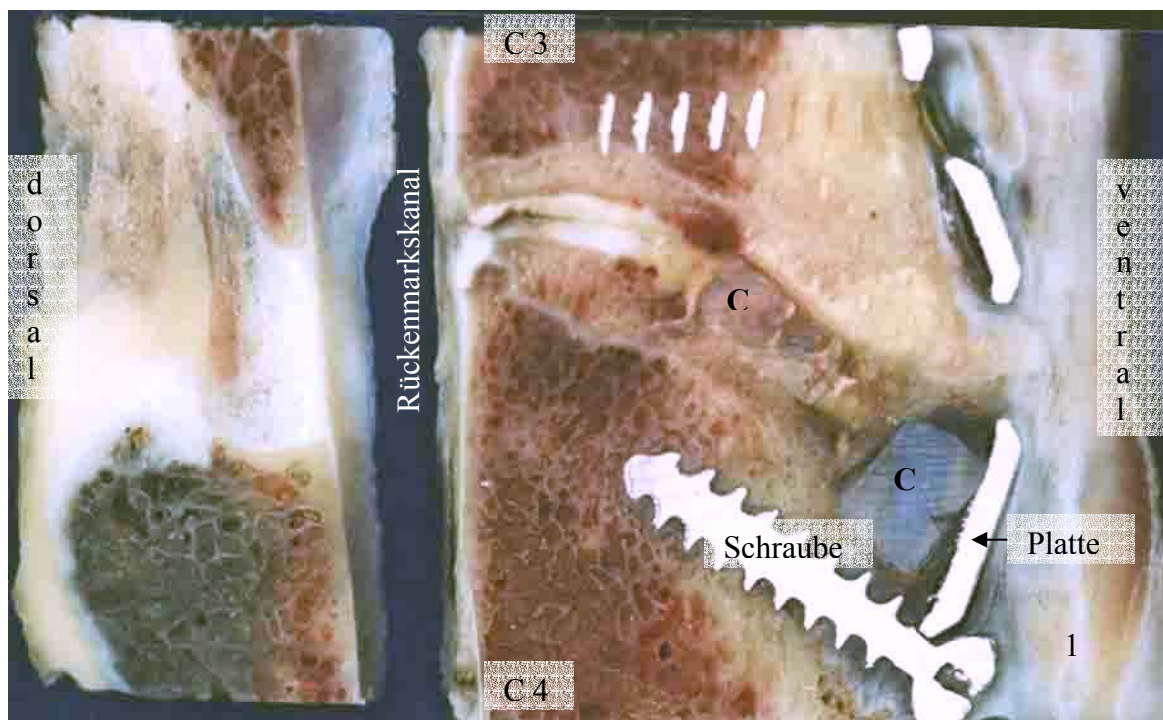


Abb. 24: Sägepräparat zur Herstellung der histologischen Präparate, C = angeschnittener Cage, 1 = Kallusgewebe

Um später die histologischen Schnitte mit einem Hartschnittmikrotom anfertigen zu können, wurden zu diesem Zeitpunkt bereits die aus Metall bestehenden noch im Knochen befindlichen Schrauben und die Platte vorsichtig entfernt.

3.3.4 Fixation und Einbetten

Unmittelbar nach der Entnahme setzt in Gewebeproben die Autolyse bzw. Heterolyse ein. Das Gewebe muss daher sofort frisch bearbeitet oder aber fixiert werden. Durch die Fixation wird die Zersetzung aufgehalten. Die Fixation erfolgte hierbei für fünf Tage in neutraler isotoner Formaldehyd-Alkohol-Lösung (Zusammensetzung: 324 ml 34 %iges Formol, 540 ml 100 %iges Ethanol, 130 ml 0,1 molarer Barbitol-Natrium-Puffer mit einem pH von 7,4 und 6 g Glukose). Anschließend wurden die Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe in lichtdichten Präparategläsern entwässert. Dabei wurde folgende Prozedur eingehalten (Tabelle 3):

Tabelle 3: Entwässerungsprozedur

Zeit	3 Tage	3 Tage	1 Woche	1 Woche	1 Woche	1 Woche	1 Woche	1 Woche
Ethanol in %	70	80	80	96	96	100	100	100

Für die optimale Infiltration der Präparate mit dem Ethanol wurden die Gläser auf einen Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik) gestellt. Zur Vorbereitung auf die Kunststoffeinbettung wurden die Präparate nun vier Stunden bei Raumtemperatur in 100 %igem Xylol entfettet. Bei dem in dieser Studie verwendeten Einbettmedium für die Hartschnitt-Technik handelte es sich um einen Kunststoff auf Methylmethacrylatbasis (Technovit 9100 neu, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim). Dieser wird aus drei Komponenten angesetzt: der Basislösung (Methylmethacrylat), dem Weichmacher und dem Aktivator. Der Kunststoff polymerisiert unter Luftabschluß bei 30° C aus. Die Anwendung dieses Kunststoffes erlaubt die Anfertigung von histologischen Schnitten ab einer Stärke von 2 µm. Der Kunststoff wurde direkt vor Gebrauch angesetzt. Zunächst wurden die Präparate für zwei Tage in die Präinfiltrationslösung verbracht. Darauf folgte eine einwöchige Infiltrationsphase bei 8° C in der Infiltrationslösung, die dazu führte, dass der Kunststoff die Präparate gänzlich durchtränkte. Für die Herstellung des Einbettmediums wurden Stammlösung A (Basislösung, PMMA-Pulver und Härter) und Stammlösung B (Basislösung und Polymerisationsregler) im Volumenverhältnis 9 zu 1 gemischt. Da der Aushärtungsprozess direkt nach Mischung der Lösungen beginnt, wurden die Präparate sofort in Einbettformen gelegt und diese mit dem Polymerisationsgemisch gänzlich gefüllt. Um etwaige Luftblasen im Kunststoff zu eliminieren, wurden die offenen Formen für zwei Minuten in eine Vakuumkammer verbracht. Für die anschließende mit Wärmeentwicklung verbundene Aushärtung stellte man die nun verschlossenen Formen in ein Eisbett. Nach 24 Stunden war der Aushärtungsprozess



Abb. 20: Präparierte Halswirbelsäule nach Entfernen von Haut und Weichteilen, ventrale Ansicht

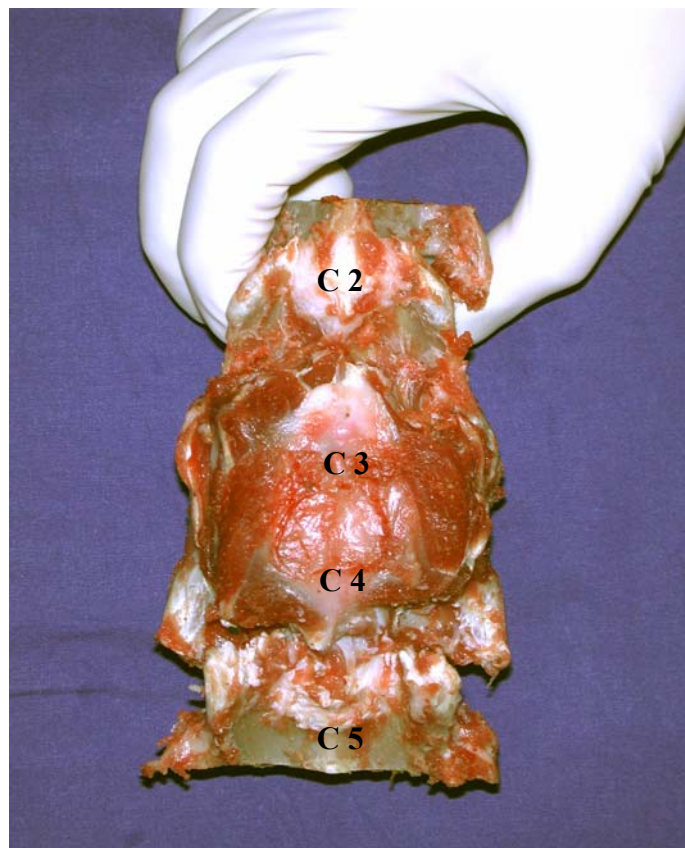


Abb. 21: Halswirbelsäulensegmente C 2 – C 5, ventrale Ansicht

abgeschlossen und die in Kunststoff eingebetteten Präparate konnten aus den Formen entnommen werden.

3.3.5 Anfertigung der histologischen Präparate

Die in Kunststoff eingebetteten Präparate wurden zunächst auf einer Tischschleifmaschine (Phoenix 3000, Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf) so angeschliffen, dass sie beim Einspannen in das Mikrotom optimalen Halt hatten. Mittels Hartschnittmikrotom (Polycut S, Fa. Cambridge Instruments, Heidelberg, Deutschland) und einem 16 cm langen Hartmetallmesser (Messerwinkel 40°) wurden anschließend 6 µm starke longitudinale Serienschnitte in der Sagittalebene der Präparate angefertigt und auf Glasobjektträger aufgebracht. Zum Aushärten wurden diese in einer Presse zwei Tage im Brutschrank bei 50°C aufbewahrt. Vor dem Färben wurden die Schnitte für dreimal 30 min in 2-Methoxyethylacetat (Merck 806061, Merck, Darmstadt) entplastet und durchliefen anschließend zur Rehydrierung eine absteigende Alkoholreihe.

3.3.6 Histologische Färbungen

3.3.6.1 Trichromfärbung nach Masson und Goldner

Die histologische Färbung nach einem standardisierten Protokoll von Masson und Goldner (1938) hebt die folgenden Zell- und Gewebeanteile hervor. Die Zellkerne färben sich bräunlich-schwarz an, während sich das Zytoplasma ziegelrot hervorhebt. Die kernlosen Erythrozyten unterscheiden sich von den kernhaltigen Zellen in ihrer orangegelben Farbe. Bindegewebe und saure Mukosubstanzen stellen sich blassgrün im Gegensatz zu mineralisiertem Knochengewebe dar, welches leuchtend grün hervorsteht. Verkalktes Knochengewebe nimmt eine hellgrüne Farbe an. Die unverkalkten Osteoidsäume werden rot gefärbt. (Färbeprotokoll im Anhang)

3.3.6.2 Safranin-Orange / Lichtgrün Färbung

Die von Geitler (1949) angegebene Färbemethode eignet sich zur spezifischen Darstellung von Knorpelgewebe. Hierbei dringt der Farbstoff Safranin-Orange in die Knorpelgrundsubstanz ein, bindet an die sauren Gruppen der Mukopolysaccharide und färbt sie intensiv rot. Osteoidsäume stellen sich ebenfalls rot dar und Zellkerne erscheinen rot. Durch die Gegenfärbung mit Lichtgrün werden Knochen- und Bindegewebe grün angefärbt. (Färbeprotokoll im Anhang)

3.3.6.3 Kombinierte Safranin-Orange / van Kossa Färbung

Zur Färbung der verschiedenen Gewebeanteile wurde ein nach van Kossa (1901) und Winiwarter (1908) modifiziertes Färbeprotokoll verwendet. Die einheitliche Schwärzung aller mineralisierten (v. a. kalziumphosphathaltigen) Gewebeanteile und die Rotfärbung anderer Anteile ergibt sehr kontrastreiche Bilder zur histomorphometrischen Analyse. Mineralisierte Knorpel- und Knochengewebe sind schwarz gefärbt, Mineralisationsfronten (z. B. unter Osteoidsäumen) schwarz granuliert hervorgehoben. Eine Kombinationsfärbung mit Safranin-Orange führt zu einer weiteren kontrastreichen speziellen Darstellung von Osteoidsäumen, Zellen und Weichteilgewebe, welche rot dargestellt werden. Das hyaline Knorpelgewebe färbt sich leicht rot an. (Färbeprotokoll im Anhang).

3.3.6.4 Astrablau Färbung

Mit dem Kupferphtalocyaninfarbstoff Astrablau lassen sich saure Mukopolysaccharide spezifisch anfärben. Diese nehmen dabei je nach Konzentration eine mehr oder weniger intensive blaue Farbe an. Die Kernfärbung erfolgt mit Kernechtrot. (Färbeprotokoll im Anhang, Romeis 1989)

3.4 Histologische Auswertung

3.4.1 Semiquantitative Methode

Die histologischen Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop (Axioscop 2 plus, Zeiss, Göttingen, Deutschland) semiquantitativ ausgewertet. Die einzelnen Parameter konnten anschließend unabhängig beurteilt und verglichen werden. Dabei wurden vor allem folgende Kriterien berücksichtigt:

1. Anzahl der relevanten Knochendefektzonen am Implantat-Knochen-Kontakt

Der Parameter „Anzahl der relevanten Knochendefektzonen“ wurde anhand der Präparate, histologisch gefärbt nach Safranin-Orange / v. Kossa, mittels digitaler Bilder bewertet. Dabei wurde jedes Areal im Wirbelknochen als Defektzone definiert, an dem – ausgehend von der Boden- bzw. Deckplatte – die trabekuläre, mineralisierte Knochenstruktur des Wirbelkörpers nicht mehr besteht und folglich das Gewebe in der verwendeten Färbung rot angefärbt ist. Die Ausdehnung der knöchernen Defektzone wurde auf den sagittalen Schnitten senkrecht zur ventrodorsalen Cageebene gemessen. Als „relevante Knochendefektzone“ wurde eine Defektzone mit einer Ausdehnung von > 3 mm definiert (siehe hierzu auch 2. *Ausdehnung der Defektzonen*).

2. *Ausdehnung der Knochendefektzonen am Implantat-Knochen-Kontakt*

Wie bereits in 1. beschrieben, wurde nun zur Evaluierung des Parameters „Ausdehnung der Knochendefektzonen“ jede Defektzone im Wirbelknochen vermessen. Es wurde immer im rechten Winkel zu den Endplatten gemessen. Dabei konnte in Anlehnung an Hoffman und Mitarbeiter (1997) eine Einteilung in folgende Gruppen definiert werden:

- Grad I: $0 \leq 1$ mm
- Grad II: $>1 \leq 3$ mm
- Grad III: > 3 mm (relevante Knochendefektzone)

Gewertet wurde pro Präparat nur die knöcherne Defektzone mit der größten Ausdehnung.

3. *Art und relativer Anteil des Gewebes im Zwischenwirbelraum bzw. in der Cagepore*

Für diese Untersuchung wurden die nach Masson und Goldner gefärbten Präparate zunächst bei fünffacher Vergrößerung betrachtet. Mit dieser Übersichtsfärbung konnten die Gewebe im Zwischenwirbelraum bzw. in der Cagepore identifiziert und zueinander in Relation gesetzt werden. In Anlehnung an Emery und Mitarbeiter (1994) wurde dabei das Gewebe im Zwischenwirbelraum bzw. in der Cagepore analysiert und der relative Anteil eines Gewebes am Gesamtgewebe bestimmt. Dabei wurde zwischen Knochen-, Knorpel- oder Bindegewebe unterschieden. Gewertet wurde pro Präparat dabei das Gewebe mit dem relativ größten Anteil am Gesamtgewebe.

4. *Implantatmigration über die ventrale Kante von C 4*

Da das Implantat standardisiert 2 mm dorsal (-2 mm) der Vorderkante der Deckplatte von C 4 eingebracht wurde, konnte jede Veränderung der Implantatlage speziell jede ventrale Migration des Implantats in Relation zu der Vorderkante der Deckplatte von C 4 gemessen werden. Trotzdem das Implantat während des histologischen Aufarbeitungsprozesses aus den Sägepräparaten herausgelöst wurde, war doch eine Identifizierung der Implantatlage in vivo möglich, da sich die Silhouette des Cages deutlich durch die Anlagerung von Bindegewebe abzeichnete, welche während der Bearbeitung der Präparate erhalten blieb.

Somit konnte mit Hilfe der digitalen Bilder der Präparate, gefärbt nach Safranin-Orange / v. Kossa, die Distanz zwischen der Vorderkante der Deckplatte von C 4 und dem Implantat vermessen werden. Dabei wurde folgende Einteilung der Migration definiert:

- keine: $-2 \text{ mm} < 0 \text{ mm}$,
- gering: $0 \text{ mm} \leq 2 \text{ mm}$,
- stark: $> 2 \text{ mm}$

Eine Bewertung der Beckenkammspanpräparate wurde im Hinblick auf diesen Parameter nicht vorgenommen, da durch die Prozesse des Knochenremodelings und der Kallusbildung, die während der Einheilung und Integration des Spans erfolgen, die eindeutige Abgrenzung des eingebrachten Gewebes von Kallusgewebe schon zum ersten Untersuchungszeitpunkt nicht mehr möglich war.

5. *Implantatdeformität*

Die Implantatdeformität wurde ebenfalls anhand der Präparate, gefärbt Safranin-Orange / v. Kossa mesoskopisch untersucht. Auch hier konnte die Form des Cages durch die bindegewebige Umschließung indirekt beschrieben und semiquantitativ in 3 Grade eingeteilt werden. Dabei wurde zwischen:

- gering: ursprüngliche rechteckige Form des Implantates weitgehend erhalten
- mäßig
- stark: vollkommen zerstörtes Implantat

deformierten Implantaten unterschieden. Die semiquantitativen Abstufungen sind in Abbildung 25 exemplarisch dargestellt.

Die Präparate der Tiere, die mit einem autologen trikortikalen Beckenkammspan versorgt wurden, wurden auch bezüglich dieses Parameters nicht bewertet, da ebenfalls durch die Prozesse des Knochenremodelings, die den Span betreffen, eine eindeutige Identifikation des ursprünglich transplantierten Gewebes bereits nach zwölf Wochen nicht mehr möglich ist.

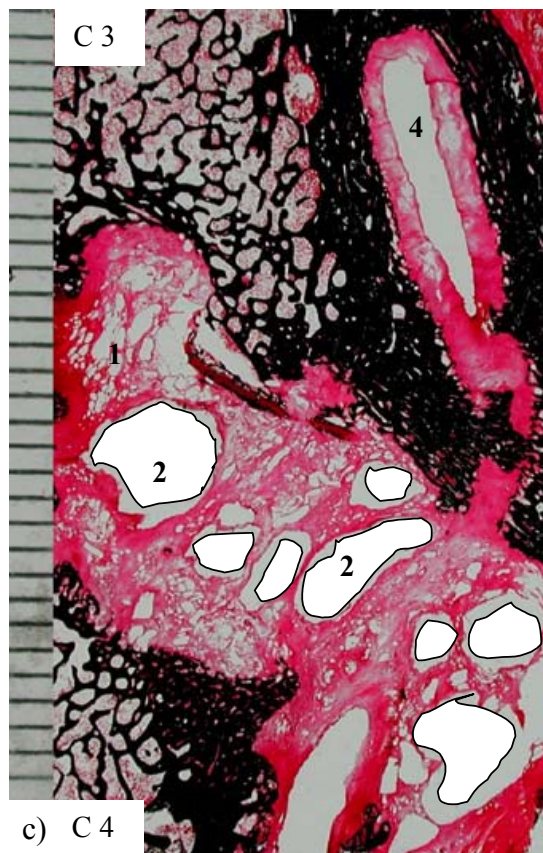
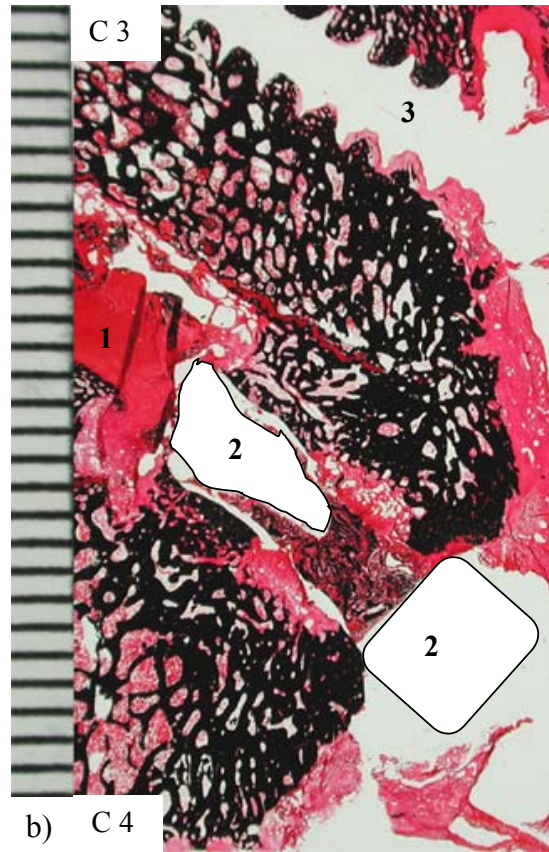
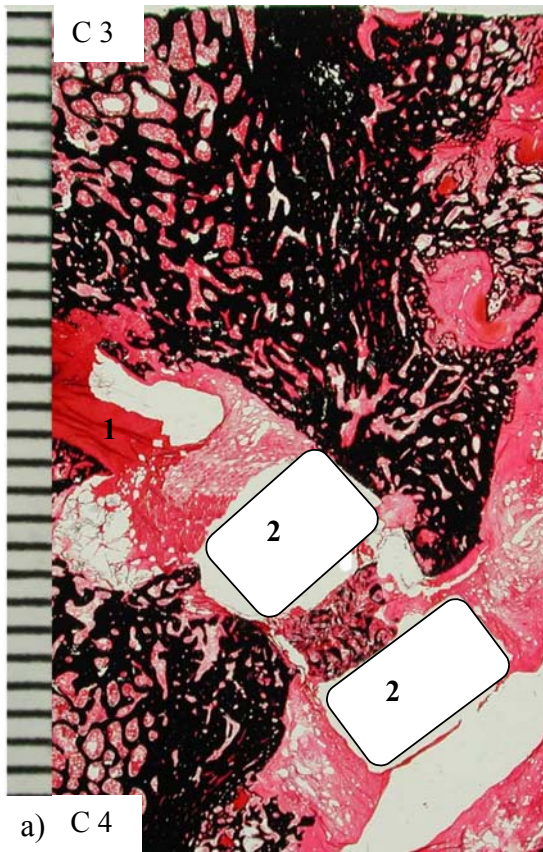


Abb. 25: Darstellung der bewerteten Deformationsstadien des Cages, Cageanschnitte weiss eingezeichnet, nicht mineralisiertes Gewebe rot angefärbt; a) gering -, b) mäßig -, c) stark deformiert

- 1 = Intervertebralraum
- 2 = Cage bzw. Cagetrümmer
- 3 = Schraubkanal
- 4 = Position der Platte

6. *Stärke der Fremdkörperreaktionen am Implantat-Knochen-Kontakt*

Das Ausmaß der Fremdkörperreaktionen (FKR) an den Implantat-Knochen-Kontaktflächen wurde bei 40-facher Vergrößerung untersucht. Fremdkörperreaktionen sind durch das Auftreten von Fremdkörperriesenzellen, Entzündungszellen, Zellanhäufungen und Hypervaskularisierung charakterisiert. Eine FKR wurde nur dann angenommen, wenn mindestens zwei dieser Merkmale nachweisbar waren. Auch hier wurde eine semiquantitative Einteilung gemäß der Ausprägung der o. g. Merkmale in Anlehnung an Gohl (2002) vorgenommen.

- stark
- mäßig
- schwach
- keine

7. *Kallus*

Die histologischen Präparate wurden auch auf etwaige kallöse Zubildungen um die ventrale Verplattung hin mikroskopisch untersucht. Verwendet wurden dazu die histologischen Schnitte, gefärbt nach Masson-Goldner und Safranin-Orange / v. Kossa. Der Kallus wurde bezüglich seines geweblichen Aufbaus beschrieben.

3.4.2 Quantitative Methode

Eine weitere Möglichkeit, um die histologischen Knochenschnitte zu analysieren und quantitativ zu beurteilen bietet ein computergestütztes Auswertungssystem. Hierbei kann eine Flächenberechnung unterschiedlicher Gewebetypen innerhalb der Präparate durchgeführt werden. Anhand dieser Werte ist es dann beispielsweise möglich, die Versuchsgruppen untereinander im Hinblick auf die angestrebte knöchernen Durchbauung des Intervertebralraums zu vergleichen. Das sog. Bildanalyse-System besteht aus einer Morphometrie-Software (KS 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching), einem Personalcomputer und einem Monitor. Die histologischen Schnittpräparate wurden per hochauflösender Digitalkamera (Nikon Superhigh-Performance 3x-Zoom, Cool Pix 990, Japan) in Verbindung mit einem Leuchttisch digitalisiert. Dabei wurde jeweils ein Millimetermaß an die Längsachse des Präparates angelegt und für die später notwendige Kalibrierung im digitalen Bild festgehalten. Mit dem eigens für die versuchsspezifischen Anforderungen festgelegten Programm ist es möglich die digitalen Bilder zu analysieren (Programmautor: Dr. Gerd Krummrey, Charité Berlin). Die problemorientierten

Programmgorithmen sind zur Identifizierung spezifischer Strukturen codiert worden und vereinfachen somit die Erfassung von Distanzen und Flächen in Abhängigkeit von deren unterschiedlicher Anfärbbarkeit. Alle Präparate wurden auf eine einheitliche Maßeinheit angeglichen indem die Millimeterangaben der digitalen Bilder in darauf folgenden Arbeitsschritten weiterhin verwendet und jedes neu eingelesene Bild mittels manueller Distanzeingabe kalibriert wurde. In einer vorher definierten „region of interest“ („ROI“) in den Schnitten, gefärbt mit Safranin-Orange / v. Kossa, Safranin-Orange / Lichtgrün und Astrablau, erfolgt mittels des Programms eine Berechnung der Fläche der unterschiedlichen Gewebetypen Knochen, Knorpel und mineralisierter Knorpel. Die ROI schließt hierbei den Intervertebralraum sowie die angrenzenden Wirbelkörperendplatten ein. Die Berechnung der ROI erfolgte für jedes neu auszuwertende Präparat und wird im Folgenden anhand eines nativen histologischen Schnittes exemplarisch beschrieben.

Ein Parameter, der zur Konstruktion der ROI nötig ist, die durchschnittliche präoperativen Bandscheibenraumhöhe (aDSH), wurde aus den radiologischen seitlichen präoperativen Aufnahmen des Wirbelkörpersegmentes C 3 / C 4 ermittelt (Abb. 26). Hierfür wurden zuvor die vordere, mittlere und hintere Bandscheibenraumhöhe vermessen. Dabei stellt die vordere Bandscheibenraumhöhe die Strecke zwischen den Vorderkanten der Bodenplatte von C 3 und der Deckplatte von C 4 (Strecke C – F) dar. Die hintere Bandscheibenraumhöhe ergibt sich aus der Distanz der Hinterkanten der Bodenplatte von C 3 und der Deckplatte von C 4 (Strecke A – D). Die Hälfte der Strecke A – F bildet den Punkt G in dem das Lot gefällt wird. Die Gerade schneidet hierbei die Deck- und Bodenplatte der Wirbelkörper in den Punkten E und B, wobei die Strecke E – B die mittlere Bandscheibenraumhöhe darstellt. Die aDSH kann nun durch die Formel $aDSH = (\text{hintere} + \text{mittlere} + \text{vordere Bandscheibenraumhöhe}) / 3$ berechnet werden. Zweiter Parameter zur computergestützten Konstruktion der ROI ist die Baseline (S). Sie wird manuell vom Untersucher im jeweiligen Präparat eingezeichnet. Die Baseline stellt hierbei die Distanz zwischen Hinter- und Vorderkante der Bodenplatte vom dritten Halswirbelkörper in der midsagittalen Ebene dar. Aus der Baseline und dem durchschnittlichen Wert der präoperativen Bandscheibenraumhöhe (aDSH) des Wirbelsegmentes C 3-C 4 wird die ROI konstruiert. Dabei wird die Baseline von den Punkten A und B begrenzt. An den Punkten A und B wird nun die aDSH senkrecht nach kranial aufgetragen. Im Anschluss wird die 2-fache aDSH an den Punkte A und B senkrecht nach kaudal angelegt. An den daraus entstehenden Punkten C und D wird die halbe Strecke S horizontal gezeichnet. Die Verbindung der daraus resultierenden Endpunkte führt zu einer hexagonalen Form, die die ROI für die histomorphometrische Untersuchung darstellt (Abb.

27). Für die Berechnung der Knochenfläche wird das digitale Bild des jeweiligen Präparates, gefärbt nach Safranin-Orange / v. Kossa, verwendet. Die ROI wird nun mittels Einzeichnen der Baseline und der aDSH festgelegt (Abb. 28). In der ROI definiert man dann das Knochengewebe, welches in den histologischen Schnitten schwarz angefärbt ist, als die zu berechnende Fläche. Das Bildanalyzesystem markiert daraufhin alle schwarzgefärbten Areale grün. In Form einer binären Maske wird ein Abbild der detektierten Farbanteile erstellt. Die Vorgabe des Programms kann noch von Hand nachbearbeitet werden, so ist es möglich, Gewebe, welches nicht optimal angefärbt wurde und somit vom Programm nicht als Zielgewebe registriert wurde, nachträglich zu markieren, und dadurch in die Berechnung mit einzubeziehen (Abb. 29). Letztlich addiert das Programm aus den markierten Einzelflächen die Gesamtknochenfläche. Für die Berechnung der Knorpelfläche werden die Präparate, gefärbt nach Safranin-Orange / Lichtgrün, analysiert, in denen sich Knorpelgewebe rot darstellt. Nach Einzeichnen der Baseline und anschließender ROI Berechnung erfolgt die Markierung von rot angefärbtem Gewebe. Dabei ist zu beachten, dass anschließend manuell die ebenfalls als Knorpel identifizierten Bandscheibenreste, so sie vorhanden waren, aus der Berechnung ausgeschlossen werden muss. Die mineralisierten Knorpelanteile in den Präparaten färben sich in der Astrablaufärbung dunkelblau an. Diese dunkelblauen Areale wurden ebenfalls markiert und daraufhin vom Bildanalyzesystem zu einer Gesamtfläche addiert. Da das mediane Sägepräparat (Abb. 22) zur Herstellung der histologischen Präparate verwendet wurde, war mitunter das Herauspräparieren der ventralen Stabilisierung speziell der Schrauben nötig. Die dabei entstandenen gewebefreien Bereiche im histologischen Präparat wurden markiert und von der standardmäßig berechneten ROI subtrahiert. So konnte gewährleistet werden, dass die Schäden im Präparat keinen Einfluss auf die Relation zwischen der Fläche der ROI und der Fläche des zu bestimmenden Gewebes nahmen und somit die Ergebnisse verfälschten.

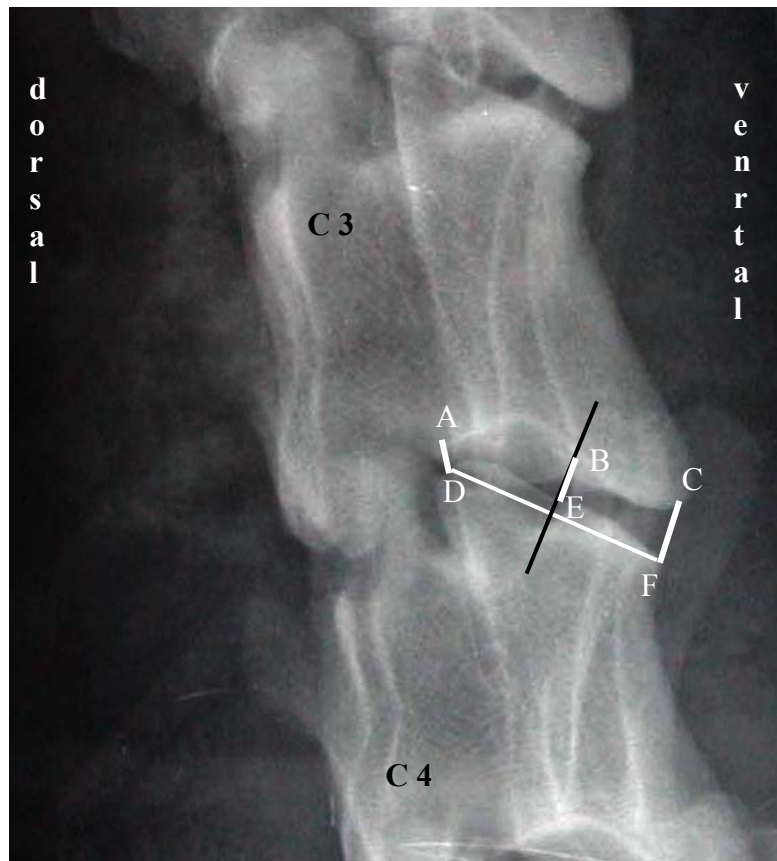


Abb. 26: Seitliche radiologische Aufnahme des Wirbelsegmentes C 3 / C 4. Schematische Darstellung der Ermittlung der durchschnittlichen präoperativen Bandscheibenraumhöhe. A – E = hintere Bandscheibenraumhöhe, B – E = mittlere Bandscheibenraumhöhe, C – F = vordere Bandscheibenraumhöhe

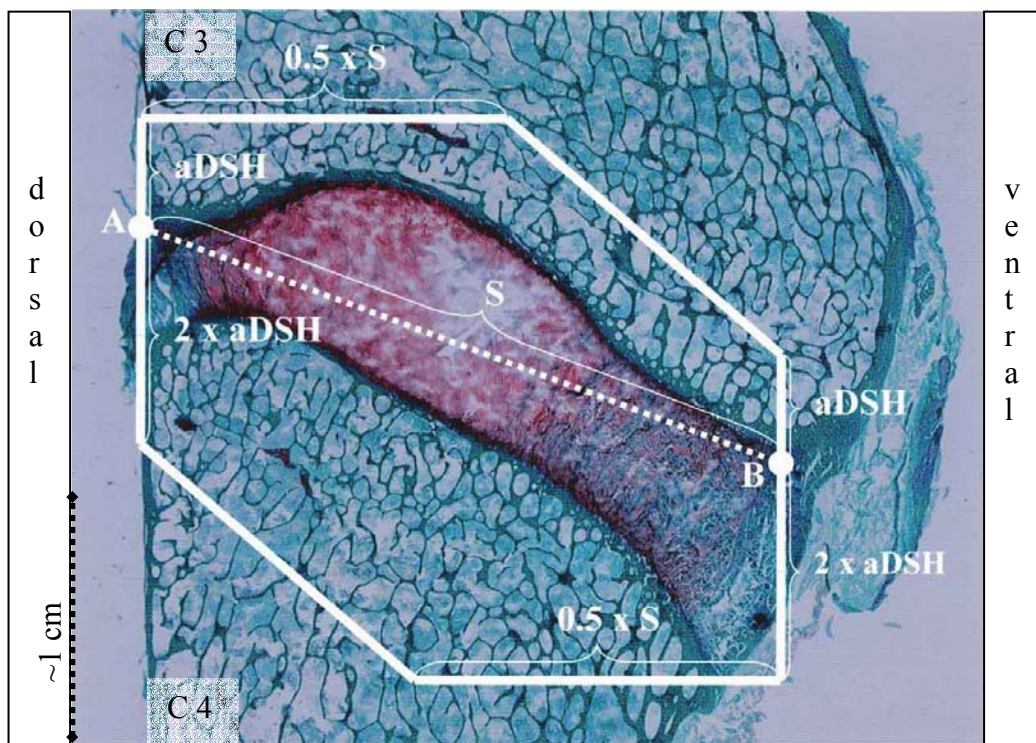


Abb. 27: Schematische Darstellung der Konstruktion der Region Of Interest (ROI) im histologischen Präparat, C 3 / C 4, Schaf, Trichromfärbung nach Masson und Goldner

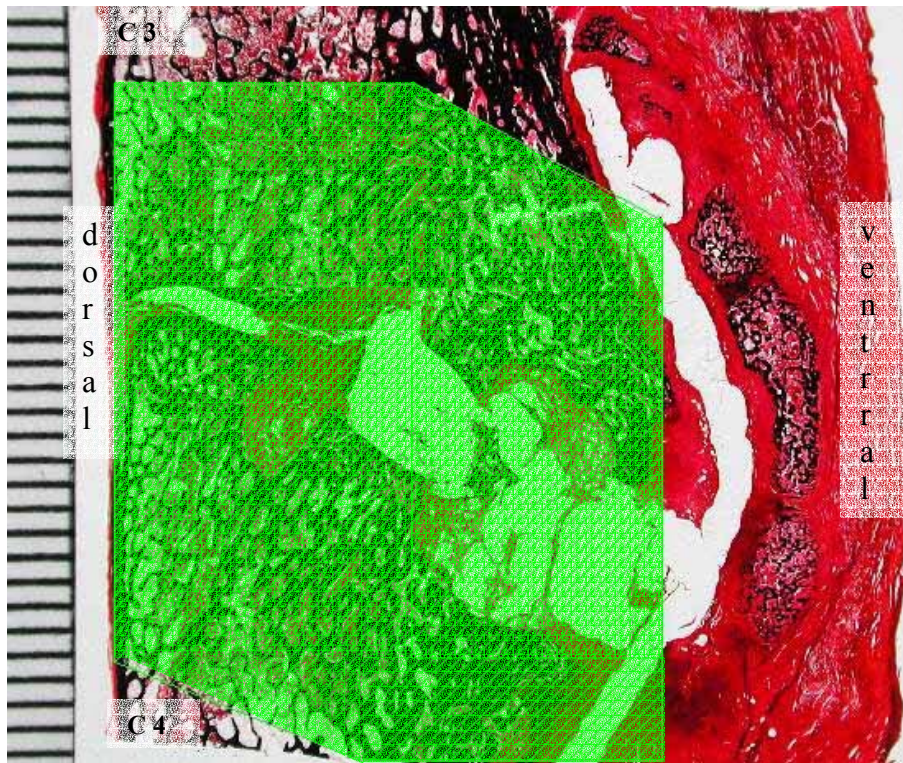


Abb. 28: Beispiel für die Konstruktion der Region Of Interest (ROI; grün schraffiert) im histologischen Längsschnitt eines PLDLLA-Cage Präparates, Safranin-Orange / v. Kossa

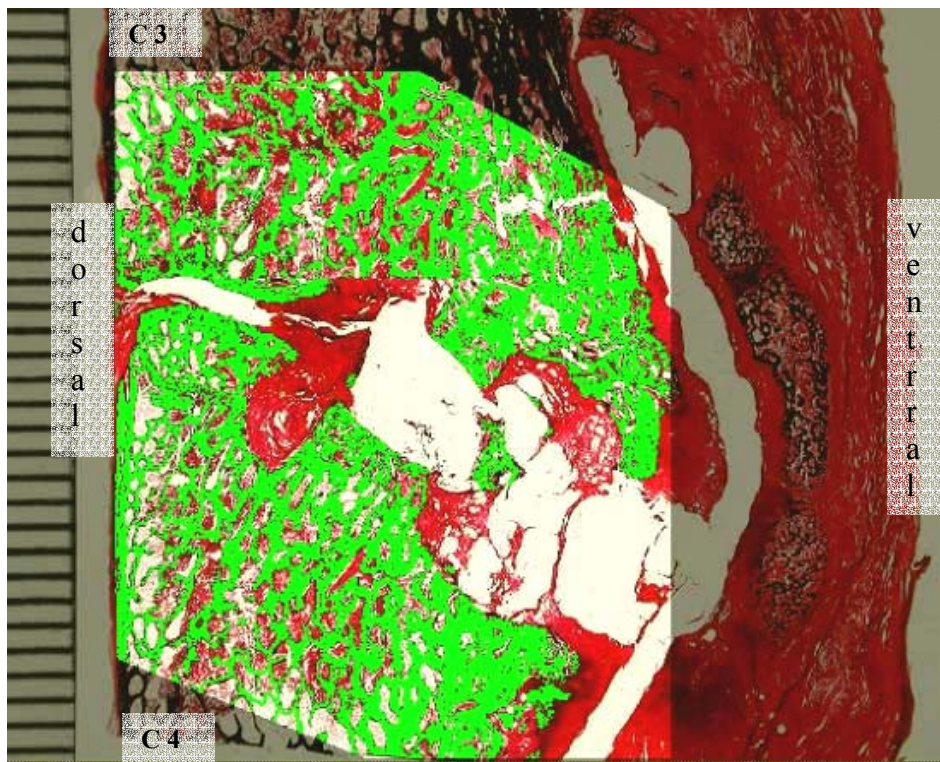


Abb. 29: Beispielhafte Markierung des mineralisierten Gewebes (grün dargestellt) in der Region Of Interest im histologischen Längsschnitt eines PLDLLA-Cage Präparates, Safranin-Orange / v. Kossa

3.5 Statistik

Die berechneten Werte der Analysen wurden, abgesehen von der Autorin, von einer weiteren Person gegengemessen, um einen individuelle Messwertfehler auszuschließen. Bei allen Zweifach-Messwerten wurde der Mittelwert berechnet. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die histomorphometrischen Daten in das Datenverarbeitungsprogramm SPSS für Windows 10.0 (SPSS Deutschland GmbH, München) übertragen. Die histomorphometrischen Ergebnisse wurden mittels Boxplots dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte über den U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon. Dieser ist ein nichtparametrischer Zwei-Stichproben-Test für zwei unabhängige Stichproben. Er setzt für die Messgröße keine Normalverteilung voraus. Falls die Verteilungen der beiden Messgrößen annähernd gleiche Wölbungen aufweisen ist der Test relativ trennscharf. Die Nullhypothese entspricht der des t-Tests für unverbundene Stichproben. Die angegebenen p-Werte zeigen die signifikanten Unterschiede der untersuchten Präparatgruppen bei einem festgelegten Signifikanzniveau (p) von 0,05 (= Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %) an. Diese Unterschiede charakterisieren die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben und stellen keine allgemein gültigen Aussagen dar. Für die Ergebnisse der übrigen Analysen wurden Tabellen und Diagramme in dem Programm EXCEL 97 für Windows erstellt.

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung wurden aufgrund der geringen Fallzahlen pro Gruppe und der daher nicht zu erwartenden Normalverteilung der Werte als Mediane dargestellt. Sämtliche Ergebnisse werden zudem als Boxplots dargestellt (Abb. 30). Die Boxplotdarstellung enthält folgende Parameter: den Median (auch 50-Prozentquartil genannt), das 25- und 75-Prozentquartil sowie 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.

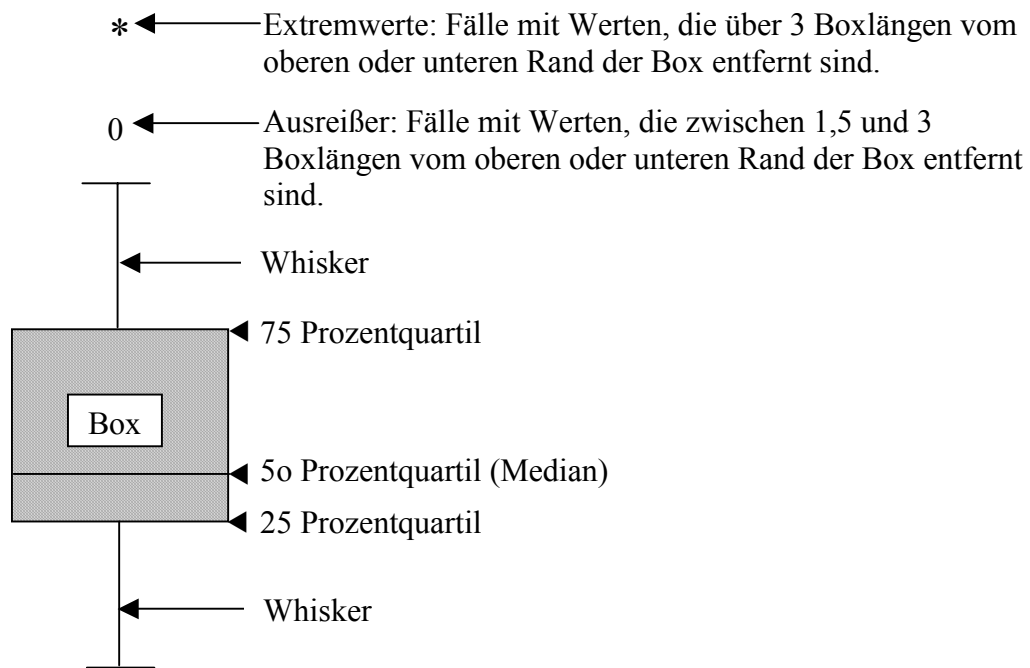


Abb. 30: Darstellung eines Boxplots und dessen Interpretation