

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Studiendesign

Bei diesem Projekt wurden 59 Merinomixschafe mit einem Mindestalter von zwei Jahren einer offenen Arthrotomie unterzogen und das Kreuzband durch ein freies Sehnentransplantat ersetzt. Von den operierten Tieren gingen 54 Tiere in den Versuch ein. Als Transplantat diente die Sehne des Musculus flexor digitalis superficialis, die bei jedem Tier vor Eröffnung des Kniegelenkes unter sterilen Kautheilen entnommen wurde.

Dabei erhielt die Hälfte der in den Versuch aufgenommenen Tiere ein autologes Transplantat, die andere Hälfte wurde mit einem allogenen Sehnentransplantat versorgt, wobei bereits vorher operierte Tiere als Spender dienten. Die so gewonnenen allogenen Transplantate wurden nach ihrer sterilen Entnahme in mit NaCl¹ getränkte Tücher verbracht, bei -80°C gefroren, steril für maximal 1 Woche aufbewahrt und ca. eine Stunde vor der Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut.

Nach der Operation wurden Röntgenaufnahmen zur Überprüfung der korrekten Platzierung der Knochentunnel angefertigt, und es erfolgten röntgenologische Verlaufskontrollen nach 3, 6 und 9 Monaten sowie nach der Tötung. Die Röntgenbilder wurden im Rahmen einer anderen Dissertation zur Untersuchung der Knochen- Bandheilung ausgewertet. Weiterhin wurden in vivo Fluoreszenzmarkierungen zur Darstellung der verschiedenen Phasen der Knochen-Bandheilung vorgenommen. Die Tiere verblieben bis zur vollständigen Abheilung in der tierexperimentellen Einrichtung der Charite und wurden nach 2-3 Wochen bei freiem Auslauf auf dem Außengelände des Institutes für Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität Berlin untergebracht.

Nach der Tötung der Tiere und der Explantation der Kniegelenke wurden bei jeweils sieben Tieren biomechanische Testungen durchgeführt, bevor die Proben für die histologischen Untersuchungen entnommen wurden. Zwei Tiere standen für rein histologische Untersuchungen zur Verfügung, hier wurden die Proben direkt nach der Tötung entnommen.

¹

[¹] NaCl 0,9 % Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

Parallel zu dieser Arbeit wurden von meinen Mitdoktoranden Arbeiten zu biomechanischen Fragestellungen sowie zur Knochen- Sehnen- Einheilung und zu weiteren Aspekten des intraligamentären Remodellings angefertigt.

Die Studie wurde mit Genehmigung der staatlichen Tierversuchskommission Antragsnummer G 0073-02 durchgeführt.

Während des gesamten Versuchszeitraumes befanden sich die Tiere unter tierärztlicher und tierpflegerischer Kontrolle der tierexperimentellen Abteilung der Charité / Campus Virchow.

3.2. Material

3.2.1. Tierausswahl und Standzeiten

In dieser Studie wurden ausgewachsene, weibliche Merino-Mix Schafe mit einem Alter von zwei bis drei Jahren und einem durchschnittlichen Gewicht von 65,5 kg verwendet. Die Tiere wurden von zwei eingetragenen Züchtern erworben und vor ihrer Aufnahme in den Versuch in einer Quarantänestation einer klinischen allgemeinen Untersuchung sowie einer Ultraschalluntersuchung zum Ausschluß einer Trächtigkeit durch einen Tierarzt unterzogen. Tiere mit Störungen des Allgemeinbefindens, trächtige Tiere sowie Tiere, die anhand des Zahnalters jünger als zwei beziehungsweise älter als drei Jahre eingestuft wurden, wurden vom Versuch ausgeschlossen. Tiere, die in den Versuch aufgenommen wurden, wurden mittels einer Ohrmarke markiert, und es wurde ihnen ein Antiparasitikum², ein Immunstimulanz³ sowie ein Prostaglandin- Analogon⁴ zur Unterbrechung einer evtl. bestehenden, sehr frühen Trächtigkeit verabreicht.

Die Tiere wurden in zwei große Gruppen unterteilt, eine Autogruppe sowie eine Allogruppe. Beide Transplantatarten wurden zu drei Zeitpunkten nämlich 6, 12, und 52 Wochen nach der Operation untersucht (siehe Tabelle 1). In jeder Gruppe standen sieben Tiere sowohl für die biomechanische Testung als auch für histologische Untersuchungen zur Verfügung, jeweils zwei Tiere wurden ausschließlich histologisch untersucht, um Abweichungen der Daten durch Gewebeschädigung infolge der biomechanischen Testung ausschließen zu können.

Die 6-Wochengruppe diente der Darstellung des frühen Remodellings mit einem in der Literatur beschriebenen Maximum an zellulären Umbauvorgängen in den äußeren

² Ivomec S[®], Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland

³ Baypamune[®], Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

⁴ Pronilen[®], Intervet GmbH, Tönisvorst, Deutschland

Transplantatregionen und einer beginnenden Revaskularisierung bei autologen vorderen Kreuzbandersätzen.

Die Standzeit von 12 Wochen wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt ein komplett in allen Regionen in Umbauprozesse einbezogenes Transplantat mit beginnender Konsolidierung und Proliferation zu erwarten war (Bosch und Kasperczyk, 1992).

Nach 52 Wochen wurde bei autologem Kreuzbandersatz ein Abschluss des Ligamentisierungsprozesses vom Transplantat hin zu einer das intakte Kreuzband darstellenden Struktur festgestellt (Unterhauser et al., 2003). Daher erschien dieser Zeitpunkt geeignet, um mögliche Unterschiede bezüglich der Dauer des Remodellings zwischen autologem und allogenen Ersatz erkennen zu können.

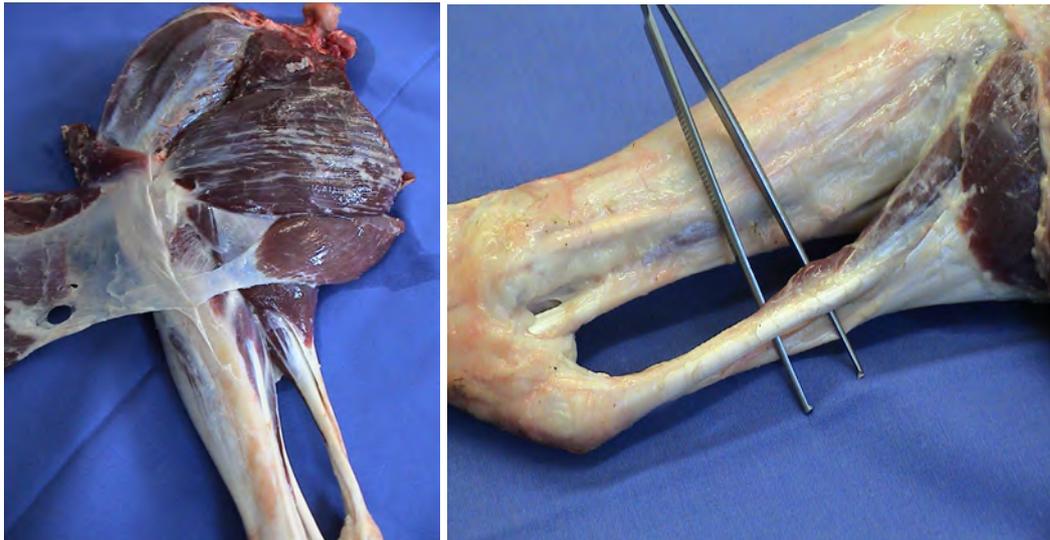
Als Kontrollgruppen dienten native vordere Kreuzbänder und Flexorsehnen, die von der jeweils nicht operierten Seite der Tiere aus der 52-Wochengruppe entnommen wurden. Diese Standzeit wurde gewählt, um Effekte durch eine mögliche Mehrbelastung der gesunden Seite zu den Zeitpunkten 6 und 12 Wochen ausschließen zu können.

Standzeiten	Gruppe 1: autolog		Gruppe 2: allogene		Summe
	<i>Biomechanik + Histologie</i>	<i>Histologie alleine</i>	<i>Biomechanik + Histologie</i>	<i>Histologie alleine</i>	
6 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2	n = 18
12 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2	n = 18
52 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2	n = 18
Summe	n = 27		n = 27		n = 54

Tabelle 1: Darstellung der Einteilung der in den Versuch aufgenommen Tiere, postoperative Standzeiten, Einteilung der Gruppen und Anzahl der Tiere pro Gruppe

3.2.2. Transplantatauswahl

Als Transplantat diente uns die Sehne des Musculus flexor digitalis superficialis. Diese ist beim Schaf chirurgisch gut zugänglich und von ihrer Dimensionen und ihrer biomechanischen Beschaffenheit her als Transplantat für den Ersatz des vorderen Kreuzbandes gut geeignet. Ihre Entnahme wird vom Schaf gut toleriert. Die beim Menschen häufig verwendeten Hamstringsehnen sind beim Schaf eher flächig und kurz angelegt und daher als Transplantat ungeeignet.



*Abb. 3: Darstellung der anatomischen Lage der als Transplantat genutzten Endsehne des *M. flexor digitalis superficialis* (rechts) sowie der beim Schaf sehr kurzen und daher nicht als Transplantat geeigneten Hamstringsehne (links), eigene Präparation*

3.3. Methoden

3.3.1. Transplantatvorbehandlung

Es stehen verschiedene Methoden zur Behandlung allogener Transplantate zur Verfügung. Dabei dient die Vorbehandlung der Transplantate grundsätzlich der Senkung antigener Eigenschaften des Materials und der Abtötung im Material vorhandener Bakterien und Viren. In diesem Projekt wurden die Transplantate nach ihrer sterilen Entnahme tiefgefroren bei -80°C maximal 1 Woche gelagert und direkt vor ihrer Verwendung steril verpackt bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Einfrieren der Transplantate vor ihrer Verwendung dient der Reduktion der antigenen Eigenschaften des Materials und damit verbundener möglicher Abstoßungsreaktionen im Empfänger durch Zerstörung der Zelloberflächen-Histocompatibilitätsantigene (Arnoczky, 1996; Noyes et al., 1998; Stevenson, 2000). Der Vorteil dieser Methode liegt in der Tatsache, dass es zu keinerlei negativen Beeinflussungen der zellulären und biomechanischen Eigenschaften der Transplantate kommt (Shino und Horibe, 1991; Amendola und Fowler, 1992). Nachteilig ist, dass es durchs Einfrieren der Bänder nicht zum Abtöten von HIV oder Hepatitis C Viren kommt. Beim Einsatz am Menschen sind daher gründliche präoperative Spenderscreenings von großer Bedeutung und unverzichtbar. Andere Methoden zur Transplantatvorbehandlung wie die Sterilisation durch Gammabestrahlung oder mittels Ethylenoxid führen zwar zu einer Abtötung vorhandener

Bakterien und Viren, können aber durch Aktivierung von Entzündungsmediatoren wie Interleukin1 zur Transplantatauflösung, Entstehung von Knochenerosionen und synovialen Entzündungsreaktionen und somit zu verminderten mechanischen Eigenschaften der Transplantate führen (Jackson et al., 1990; Drez et al., 1991a; Fideler et al., 1995). Roberts fand in seiner Studie 1991 hohe Versagerraten bei mit Ethylenoxid sterilisierten allogenen Patellarsehnentransplantaten (Roberts et al., 1991). Mit Hilfe einer Gammabestrahlung der Transplantate können die meisten bakteriellen und viralen Pathogene zwar eliminiert werden (Vangness et al., 1996; Noyes et al., 1998), jedoch ist die zur Abtötung beispielsweise von HIV-Viren benötigte Strahlenstärke mit 3,6 Gy so hoch, dass die Materialeigenschaften der Transplantate deutlich beeinträchtigt werden (Conway et al., 1991; Noyes et al., 1998). Daher werden vor allem in Ländern, die weniger stringente rechtlichen Auflagen unterliegen, hauptsächlich nicht sterilisierte Allografts verwendet, die von speziellen Gewebepanken bezogen werden, die gründliche Spenderscreenings und serologische Tests bezüglich Hepatitis C und B, Syphilis sowie HIV durchführen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Gefahr der Krankheitsübertragung durch nicht mit Strahlung oder anderen Methoden wie Ethylenoxid behandelten Transplantaten bei Einsatz gründlicher präoperativer Screenings bei 1: 1.600.000 liegt (Buck et al., 1989; Bartlett et al., 2001). Eine Studie kam zu dem Ergebnis, das die Übertragungsgefahr durchs Einfrieren zusätzlich auf 1:8000,000 gesenkt werden konnte (Buck und Malinin, 1994).

3.3.2. Operative Phase

Prämedikation, Narkose und Analgesie

Den Tieren wurde zunächst eine Braunüle in die Vena cephalica der linken oder rechten Vordergliedmaße gelegt, über diese erfolgte dann die Sedation mit 1000- 1500mg Thiopental⁵. In der Op-Vorbereitung wurden die Tiere dann mit Hilfe eines Laryngoskopes mit langem geraden Spatel (nach Foregger) und eines 7-8 mm Oxford-Tubus⁶ intubiert und die Narkose mittels eines Inhalators⁷ mit Isofluran⁸ und Lachgas vertieft und fortgeführt wobei NO₂ und O₂ im Verhältnis 3:1 und Isofluran bis zu einem expiratorischen Wert von maximal 1,7 verwandt wurden. Die Tiere wurden je nach Größe bei einer Frequenz von 16-18 Zügen mit 6-8 l/min beatmet. Zur Überwachung erfolgte die Messung des

⁵ Trapanal[®], Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

⁶ Hi-Lo Lanz[™] Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland

⁷ Ventilator 711, Siemens-Elema Ab, Solna, Schweden

⁸ Forene[®], Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Sauerstoffpartialdruckes über das Pulsoximeter sowie des CO₂'s in der Expirationsluft. Bei Bedarf, d.h. bei starker Aufgasung der Tiere wurde zusätzlich eine Magensonde gelegt.

Die Tiere wurden in Rückenlage gebracht und an beiden Vorder- sowie der rechten Hintergliedmaße auf dem Operationstisch fixiert. Beide Hintergliedmaßen wurden dann bis zur Hüfte geschoren und gründlich mittels Seifenlösung gewaschen. Alle vier Klauen wurden mit sauberen Papiertüchern umwickelt. An beiden Vorderbeinen sowie dem rechten Hinterbein wurden die Elektroden für die EKG- Überwachung befestigt.

Die Infektionsprophylaxe erfolgte intravenös mit Amoxicillin und Clavulansäure⁹. Während der Operation erfolgte eine Infusion von 1000ml Sterofundin intravenös. Zur zusätzlichen Analgesie wurde den Tieren ca. 30 Minuten nach Operationsbeginn 0,5mg Fentanyl¹⁰ intravenös verabreicht, dies wurde bei Bedarf d.h. bei Anstieg der Herz- oder Atemfrequenz als Anzeichen für Schmerz nach frühestens einer Stunde wiederholt. Während der gesamten Operationszeit wurden die Tiere bezüglich der Vitalfunktionen, d.h. Sauerstoffpartialdruck, CO₂ in der Expirationsluft, Herz- und Atemfrequenz sowie die Herztätigkeit über das EKG tierärztlich überwacht.

Zur Schmerzprophylaxe erhielten die Tiere direkt postoperativ sowie an den folgenden drei Tagen Finadyne¹¹ intramuskulär verabreicht.

OP Vorbereitung und Transplantatgewinnung

Die Operation erfolgte unter sterilen Kauthehlen. Das Operationsgebiet wurde zunächst großzügig mit einer Polyvidonjodlösung¹² abgewaschen, dann erfolgte das Abdecken des Operationsfeldes. Im ersten Teil der Operation wurde zunächst die Sehne des Musculus flexor digitalis superficialis entnommen. Dazu wurde lateral am Unterschenkel der linken Hintergliedmaße mittels länglicher Schnitttechnik die Haut sowie die darunter liegenden Schichten bis zum Musculus gastrocnemius durchtrennt. Dieser umhüllt die Musculi digitalis superficialis sowie profundus (Abb. 4 Seite 34). Nach Spaltung des Muskels in Längsrichtung wurde nun mit Hilfe zweier Overholt- Zangen die nun sichtbare Sehne des Musculus flexor digitalis superficialis mobilisiert und auf einer Länge von ca. 6cm unter Schonung der Umgebung komplett entnommen. Anschließend erfolgte der schichtweise Wundverschluß mittels fortlaufender Nahttechnik zunächst mit resorbierbarem Nahtmaterial¹³ des

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

¹⁰ Fentanyl®, Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

¹¹ Finadyne® Injektionslösung 1%, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland

¹² Braunoderm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

¹³ 1/0 Vicryl®, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

Sehnenmantels des Musculus gastrocnemius und anschließend der Haut mittels nicht resorbierbaren Nahtmaterials¹⁴.

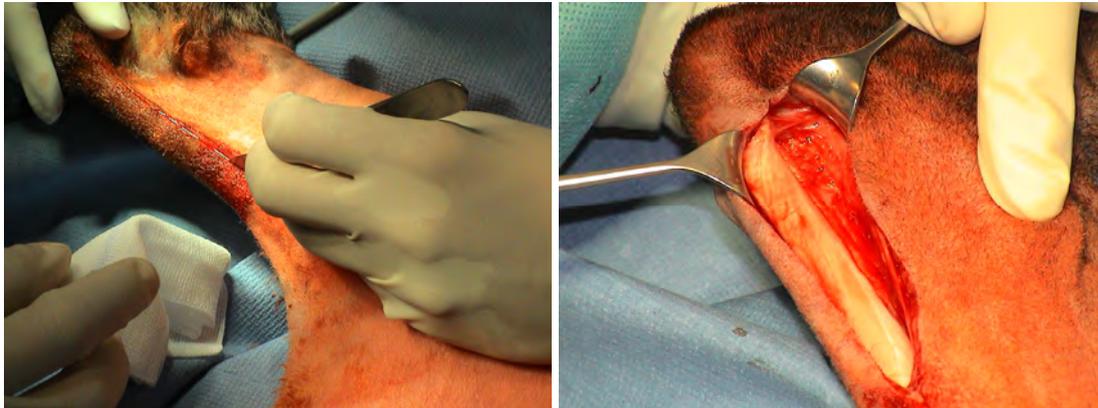


Abb. 4: Darstellung des Hautschnittes zur Transplantatentnahme (li), Darstellung des Muskelmantels nach Hauteröffnung (re)

Transplantatvorbereitung und Präparation

In der Gruppe der autologen Transplantate wurde das direkt entnommene Transplantat bis zum Wundverschluss zunächst in eine mit steriler Kochsalzlösung¹⁵ getränkte Gaze verbracht, um ein Austrocknen zu vermeiden. Zur weiteren Verwendung wurde das Transplantat zunächst auf eine Länge von 6cm gebracht und der Durchmesser gemessen und notiert. Anschließend erfolgte die Präparation des Transplantates mittels eines nicht resorbierbaren Fadens¹⁶ nach der Baseball- stitch Technik (Abb. 5 Seite 34). Das Transplantat wurde dann bis zur weiteren Verwendung wiederum in eine sterile, mit NaCl getränkte Gaze verbracht. Die Sehnen, die als allogene Transplantate dienen sollten, wurden nach ihrer Entnahme ebenfalls in eine feuchte Gaze verbracht und in einem sterilen Gefäß sofort bei $- 80^{\circ}\text{C}$ gefroren. Zur Verwendung wurden die Transplantate ca. 1 Stunde vor Transplantation bei Raumtemperatur aufgetaut und entsprechend ausgemessen und präpariert.

¹⁴ 2/0 Prolene[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

¹⁵ NaCl 0,9 % Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

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



Abb. 5: Transplantat in Baseball-stitch Technik präpariert (li, eigene Präparation), Darstellung der Präparationstechnik (re, aus Strobel, Arthroskopische Chirurgie, Springer Verlag)

Kreuzbandersatz

Der Ersatz erfolgte mittels offener Arthrotomie. Dazu wurde zunächst ein 10-12 cm langer Hautschnitt medial des Ligamentum patellae gesetzt. Auftretende Blutungen wurden mittels Elektrokoagulation gestillt. Dann erfolgte die schrittweise Durchtrennung der Verschiebeschichten, die distale Schlitzung des Musculus vastus medialis sowie die Durchtrennung der Gelenkkapsel auf einer Länge von 1-2 cm. Das mediale patellofemorale Band wurde nun kniescheibennah durchtrennt. Nach manueller Luxation der Patella nach lateral und medialer Ablösung des Hoffa'schen Fettkörpers konnte die Gelenkhöhle eingesehen und das vordere Kreuzband dargestellt werden. Dieses wurde nun möglichst komplett entnommen und die Insertionsflächen mittels scharfen Löffels und eines Lührs debridiert.

Zur Verankerung des Transplantates wurden nun femoral und tibial, jeweils ausgehend von den Bereichen der ursprünglichen Bandinsertionsstellen in einer inside- out- Technik dem Transplantatdurchmesser angepasste Tunnel gebohrt. Dabei erfolgte die Bohrung des femoralen Tunnels in maximal gebeugter Gelenksstellung in Richtung des Epicondylus lateralis bis auf 20mm, wobei uns ein vorher durch die Haut gebohrter Führungsdraht als Orientierung diente. Tibial erfolgte die Bohrung ebenfalls in gebeugter Stellung ausgehend von der ursprünglichen Ansatzstelle medial der Eminentia intercondylaris bis durch die Gegenkortikalis medial der Tuberositas tibiae. Zur Erzeugung der Knochenbrücke zur distalen Transplantatfixation wurde hier ein zweiter Tunnel gebohrt. Das präparierte Transplantat wurde nun über seine Haltefäden mit Hilfe eines Öhsendrahtes zunächst femoral, dann tibial in die Bohrkanäle eingezogen. Femoral erfolgte eine extrakortikale Fixation

mittels Endobuttons¹⁷ (siehe Abb. 6 und 7 Seite 35 und 36). Das Kniegelenk wurde nun 8-10mal maximal gebeugt und gestreckt. Bei richtigem Sitz des Transplantats in den Knochentunneln erfolgte die tibiale Befestigung in 30° Flexion über die Knochenbrücke und die Entfernung der Haltefäden. Anschließend wurde das Kniegelenk mit steriler Kochsalzlösung¹⁸ intensiv durchgespült, um etwaige Gewebereste und Knochenmehl zu entfernen. Nach Refixierung des patellofemorales Bandes erfolgte der Verschluss der Gelenkkapsel mit Kreuzstichen sowie der Muskulatur mittels fortlaufender Nahttechnik unter Verwendung von resorbierbarem Nahtmaterial¹⁹ und der Haut mittels nicht resorbierbaren Nahtmaterials²⁰.

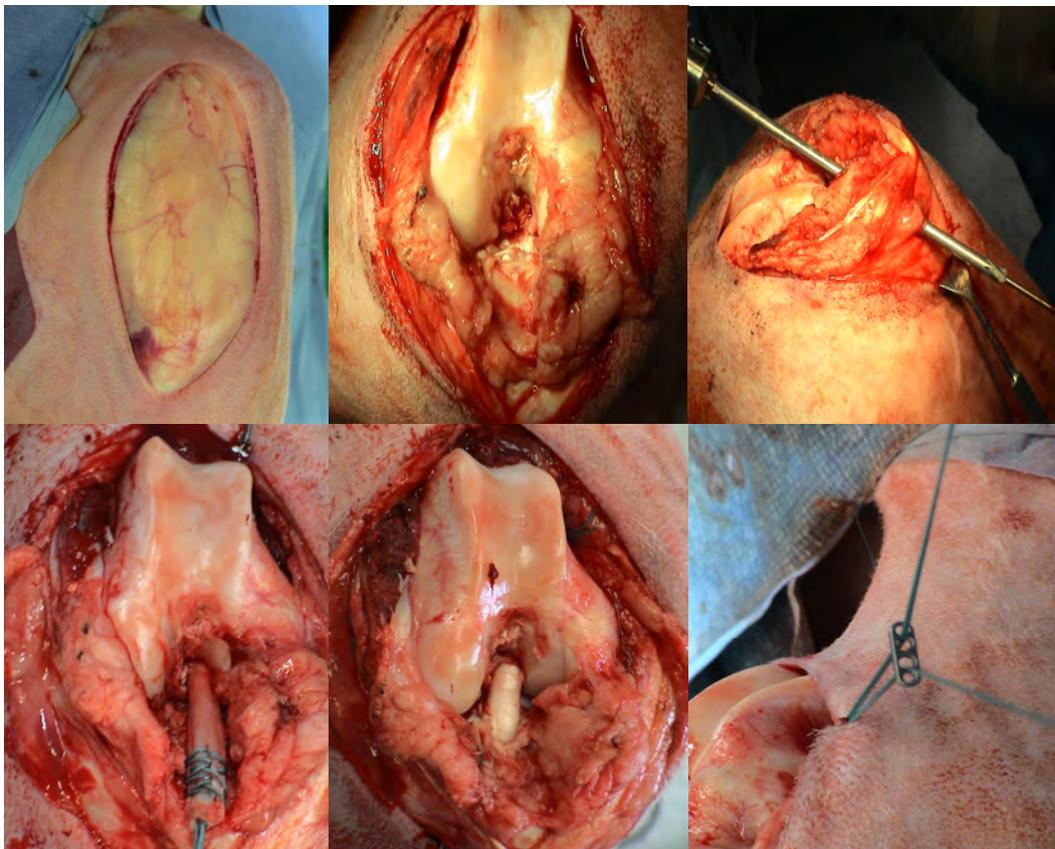


Abb. 6: Knie vor Eröffnung(oben li), eröffnetes Kniegelenk nach Entfernung des VKB (oben Mitte), Bohrung des proximalen Tunnels (oben re), proximal bereits eingezogenes Transplantat (unten li), komplett eingezogenes Transplantat (unten Mitte), Endobutton-Fixierung (unten re)

¹⁷ Acufex[®], Smith & Nephew Endoscopy Inc., Ma, USA

¹⁸ NaCl 0,9 % Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

¹⁹ 1/0 Vicryl[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

²⁰ 2/0 Prolene[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

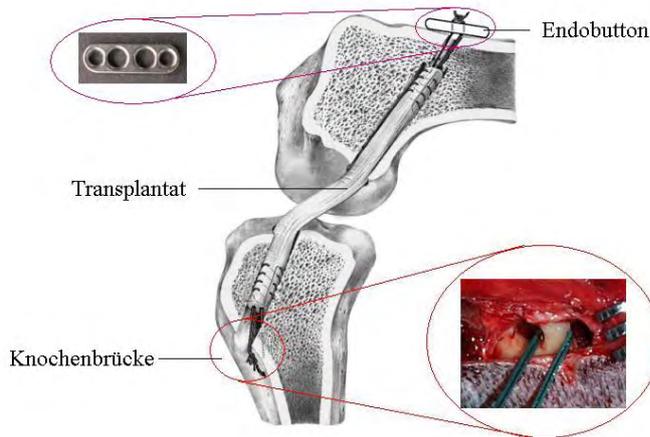


Abb. 7: Darstellung der Transplantatfixierung distal mittels Knochenbrücke und proximal mittels Endobutton

3.3.3. Postoperative Phase

Die Operationswunde wurde postoperativ mit sterilen Kompressen abgedeckt, ein Verband angelegt und Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen angefertigt. Bei sichergestellter eigenständiger Atmung der Tiere wurden diese extubiert und im Einzelstall weiter überwacht. Zur Schmerzprophylaxe erhielten die Tiere Finadyne²¹ direkt postoperativ sowie an den folgenden drei Tagen. Es erfolgten täglich Temperaturkontrollen sowie eine Beurteilung des Lahmheitsgrades, am zweiten Tag postoperativ erfolgte der erste Verbandswechsel und eine Adspektion der Wunde. Bei ungestörtem Verlauf wurde der Verband nach 3- 5 Tagen entfernt und die Fäden nach 10- 14 Tagen gezogen. Anschließend wurden die Tiere zum freien Weidegang zur Außenstelle des Institutes für Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität Berlin gebracht.

²¹ Finadyne® Injektionslösung 1%, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland



Abb. 8: Merino-Schafe auf dem Freigelände des Institutes für Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität

3.4. Probengewinnung und Bearbeitung

3.4.1. Euthanasie der Tiere und Explantation

Nach Ablauf der Standzeiten von 6, 12 bzw. 52 Wochen erfolgte die Euthanasie von jeweils 9 Tieren. Dazu wurde den Tieren wiederum über eine in die Vena cephalica gelegte Verweilkanüle zur Sedation ca. 2000 mg Thiopental²² verabreicht. Die Euthanasie erfolgte durch anschließende Injektion von 50 ml Kaliumchlorid²³ i. v. unter Auskultationskontrolle. Vor der Explantation des linken Kniegelenkes wurde dessen Beweglichkeit überprüft und die Gliedmaße makroskopisch auf pathologische Veränderungen untersucht. Anschließend wurden die inguinalen Lymphknoten beider Seiten sowie die Flexorsehne des nicht operierten Beines entnommen. Dann wurden beide Kniegelenke in toto explantiert, das intakte Kreuzband der rechten Gliedmaße entnommen und das linke Kniegelenk weiter präpariert. Dazu wurde das Weichteilgewebe grob entfernt, wobei wiederum auf makroskopische Veränderungen wie Verwachsungen, Fistelbildungen etc. geachtet wurde. Es wurden Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen angefertigt, und das Gelenk der für die biomechanische Testung eingeteilten Tiere wurde zur weiteren Bearbeitung femoral sowie tibial in Kunststoff eingebettet. Bei gebeugtem Kniegelenk erfolgte nun die Eröffnung des Gelenkes und die Gewinnung von Synovia sowie deren makroskopische Beurteilung. Von der Synovia wurden

²² Trapanal®, Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

²³ 1M-Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

Austriche angefertigt. Das eröffnete Kniegelenk wurde nun wiederum makroskopisch beurteilt, dabei wurde besonders auf Injektionsstellen im Transplantat, Beschaffenheit und Vorhandensein eines synovialen Überzugs, Rötungen der Gelenksflächen, Gelenksergussbildungen und sonstige Entzündungszeichen geachtet. Die Befunde wurden photographisch dokumentiert. Zusätzlich wurde der Sitz und die Festigkeit des Transplantates überprüft. Es erfolgte nun die weitere Probenentnahme, wobei für spätere Untersuchungen Plicaproben sowie Teile der Synovialis medialis und lateralis entnommen wurden. Dann erfolgte bei den Biomechaniktieren die biomechanische Testung in der Zwick- Testmaschine. Nach der biomechanischen Testung erfolgt die weitere Probenentnahme. Dazu wurde das Transplantat möglichst komplett herauspräpariert und in einem intraartikulär gelegenen Bereich einmal parallel zum Faserverlauf und im 90° Winkel, also längs- und quer, mit Hilfe eines scharfen Gewebemessers geschnitten, wobei möglichst glatte Schnittflächen entstehen und Quetschungen vermieden werden sollten. Es wurden jeweils zwei Quer- und zwei Längsschnitte entnommen. Femur und Tibia wurden zur weiteren Bearbeitung in mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte Binden eingewickelt und in eine spezielle Konservierungslösung eingelegt.

3.4.2. Histologische Probenbearbeitung

Nach ihrer Entnahme wurde jeweils 1 Transplantatquerschnitt in ein mit 0,9% NaCl gefülltes Plastikgefäß verbracht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gekennzeichnet bei -80°C aufbewahrt.

Alle weiteren entnommenen Proben, d.h. die Lymphknoten, Flexorsehnen, die nativen VKB's und die Transplantatproben wurden mit der Schnittfläche nach unten in mit Tiernummer, Präparatart, Entnahmeseite, Schnittrichtung und Datum beschriftetes Fixiergitter²⁴ verbracht und für mindestens 48 Stunden in 4% Formalinlösung²⁵ fixiert. Dann erfolgte nach einer 15 minütigen Spülung unter Leitungswasser eine Entwässerung im Entwässerungsautomaten²⁶ über 67 Stunden, und anschließend wurden die Präparate in Paraffin²⁷ eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden nun am Mikrotom²⁸ 4 Mikrometer dicke Serienschnitte angefertigt und diese auf silanisierte Adhäsionsobjektträger²⁹ aufgezogen.

²⁴ Tissue Tek III, Miles Limited, Slough, England

²⁵ Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

²⁶ Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

²⁷ Paraplast Plus®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA

²⁸ Leica RM 2125, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

²⁹ HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

3.5. Färbungen

3.5.1. Konventionelle Färbungen

Als Übersichtfärbungen wurden an Quer- und Längsschnitten die Hämatoxylin Eosin Färbung³⁰ (HE) sowie die Masson Goldner Trichromfärbung³¹ (MG) angefertigt. Bei der erstgenannten Färbung färben sich die Zellkerne blauviolett an, Cytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern werden rot gefärbt. Sie diente der differenzierten Zelldarstellung.

Bei der Masson Goldner Trichromfärbung werden Zellkerne schwarz, das Cytoplasma schwachorange bis rot, Fibrin rot und Bindegewebe grün angefärbt. Sie diente der genaueren Darstellung des Bindegewebes und Abgrenzung der synovialen Deckschicht vom Bandgewebe. Dazu wurden die Präparate zunächst in Xylol und folgender absteigender Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 96%) entparaffiniert und in destilliertes Wasser verbracht, anschließend erfolgten die Färbungen nach standardisierten Protokollen (siehe Romeis, Mikroskopische Technik).

3.5.2. Immunhistologische Faktor VIII Färbung

Die Faktor VIII Färbung dient der Darstellung der Gefäße im Bandgewebe und soll Aufschluß über die Revaskularisierung des Transplantates geben.

Das nachfolgende Färbeprotokoll wurde im Forschungshaus des Virchow- Klinikums der FU-Berlin auf Grundlage der Färbhinweise aus dem Handbuch der Firma DAKO entwickelt und etabliert. Es wurde von Unterhauser et al. in seiner Studie zur Revaskularisierung von autologen Sehnen transplantaten zum Ersatz des VKB weiter modifiziert und mit Ausnahme einer veränderten Vorbehandlung in dieser Form in der vorliegenden Studie eingesetzt.(Unterhauser et al., 2003).

Alle zu färbenden Schnitte wurden zunächst in 100 % Xylol 2 mal 10 Minuten und dann in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 80% ,70%) für je 2 Minuten entparaffiniert und in Aqua dest. verbracht. Die konventionell zu färbenden Schnitte wurden nach standardisierten Protokollen bearbeitet.

³⁰ Hämatoxylin, Papanicolaous Lösung 1a Harris´ , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

³¹ Eosin Solution Aqueous, Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri, USA

Bei den immunhistochemisch zu färbenden Schnitten erfolgte nach der Entparaffinierung eine zweimalige Spülung a 5 Minuten in PBS- Puffer³² pH 7,2. Dann erfolgte zur Demaskierung des Antigens eine 10 minütige Vorbehandlung mit Pronase³³ bei 37 °C mit anschließender Spülung unter Leitungswasser für 10 Minuten und Verbringung in Pufferlösung. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbungen wurden die Schnitte anschließend mit einem Normalserum³⁴ 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und ohne Spülung der polyklonale Faktor VIII Antikörper³⁵ in einer Verdünnung von 1:200 aufgebracht. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte im Kühlschrank über Nacht. Am folgenden Tag wurde nach Spülung im Puffer der biotinylierte Zweitantikörper³⁶ aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wiederum nach Spülung in Pufferlösung der ABC- Komplex³⁷ mit alkalischer Phosphatase als Reporterenzym für 50 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach zweimaligem Auftragen von Chromogenpuffers pH 8,2 zur Herstellung der richtigen pH Verhältnisse, wurden die Schnitte mit Hilfe der frisch angesetzten Chromogenlösung entwickelt. Diese enthielt Neufuchsin³⁸ als Substrat, welches von der alkalischen Phosphatase zu einem roten Chromogen reduziert wird, so dass also die zu detektierende Struktur, das Enzym Faktor VIII, rot angefärbt wurden. Abschließend wurde zur Darstellung der Zellkerne mit Methylgrün³⁹ gegengefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 95%, 95%) entwässert und nach Verbringung in Xylol mit Hilfe von Vitroclud⁴⁰ eingedeckelt.

Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Präparat statt mit dem Primärantikörper mit Pufferlösung inkubiert.

³² Tris Puffer TBS, Herstellung siehe Anhang

³³ Protease, Sigma, Nr.: P- 5147

³⁴ Normal Horse Serum, Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA

³⁵ Dako Rabbit Anti- Human von Willebrandt Factor, DAKO Glostrup, Dänemark, Kat.-Nr.: M0851

³⁶ Horse Anti- Mouse IgG secondary antibody, Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA

³⁷ ABC kit; Vector Lab., Burlingame, CA, USA

³⁸ Dako ChemMate, Dako A/S, Dänemark

³⁹ Certistain[®] Methylgrün, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

⁴⁰ Vitro-Clud[®], R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

3.6. Auswertung

3.6.1. Übersichtsfärbungen

Die Auswertung erfolgte an Längs- und Querschnitten.

Die HE gefärbten Schnitte wurden hinsichtlich Schnittqualität, Zellverteilung im Transplantat bzw. Auftreten von azellulären Bezirken, Vorhandensein von Fremdkörperriesenzellen oder sonstigen Entzündungszellen als Indikator für Entzündungs- bzw. Abstoßungsreaktionen und das morphologische Erscheinungsbild, d. h. Form und Größe der vorhandenen Zellen bzw. der Zellkerne, durchgemustert.

Bei den MG gefärbten Schnitten wurden die Ausrichtung und Struktur des kollagenen Bandgewebes sowie die Qualität und die Dicke der synovialen Deckschicht beurteilt.

Alle Präparate wurden von zwei Untersuchern begutachtet.

3.6.2. Faktor VIII Auswertung

Die Auswertung erfolgte anhand von Querschnitten mit Hilfe eines computergestützten Datenanalysesystems⁴¹. Bei diesem System wurden die Schnitte unter das Mikroskop⁴² verbracht, mit Hilfe einer Kamera⁴³ gescannt und das Bild auf den Rechner übertragen. Nun konnte die Auswertung über den Rechner mit einem speziellen für die Faktor VIII Färbung geschriebenen Programm durchgeführt werden. Zur Auswertung allgemein wurde das Transplantat in 3 Regionen aufgeteilt: einer direkt unter der synovialen Deckschicht gelegenen subsynovialen Schicht (SUB), einer darunter sich anschließenden intermediären Schicht (MID) sowie einer zentral im Band gelegenen Schicht (CNT). In jeder der drei Schichten erfolgte die Auswertung festgelegter Gesichtsfelder mit einer konstanten Größe von 0,06 mm².

Bei der Auswertung erfolgte zunächst die Betrachtung des gesamten Transplantates bei einer 50fachen Vergrößerung. Dabei wurden die Gefäßverteilung, die Qualität des Schnittes sowie das Vorhandensein und die Dicke der synovialen Deckschicht beurteilt. Dann erfolgte die Festlegung der zentralen Region des Schnittes. Anschließend erfolgte die Auswertung der Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung, wobei mit der subsynovialen Region begonnen

⁴¹ KS 400 3.0, Zeiss

⁴² DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

⁴³ Sony Color Video Camera, Moell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

wurde. Dazu wurde das Präparat so eingestellt, dass der obere Gesichtsfeldrand direkt unter der synovialen Deckschicht zu liegen kam. In dieser Art und Weise wurden acht Gesichtsfelder ausgewertet. Die intermediären Gesichtsfelder wurden so definiert, dass mit dem Mikroskop ausgehend von dem zuletzt gezählten subsynovialen Feld je nach Größe des Schnittes 1-2 Gesichtsfelder nach zentral gewandert wurde. In dieser Region wurden sechs Gesichtsfelder ausgewertet. In der zentralen Region wurden drei Gesichtsfelder ausgezählt. In der Gruppe der 52- Wochentiere konnte bei zwei Tieren nur eine geringere Anzahl von Gesichtsfeldern in der intermediären sowie der zentralen Region aufgrund einer zu geringen Schnittgröße ausgewertet werden.

Mit Hilfe der so ermittelten Daten, d.h. der Gesichtsfeldgröße sowie der pro Gesichtsfeld in den verschiedenen Schichten gezählten Gefäße, konnte der Computer nun die Gefäße pro mm² ermitteln, wobei die Daten zusammengefasst für die subsynoviale, die intermediäre sowie die zentrale Schicht jedes Tieres ermittelt wurden.

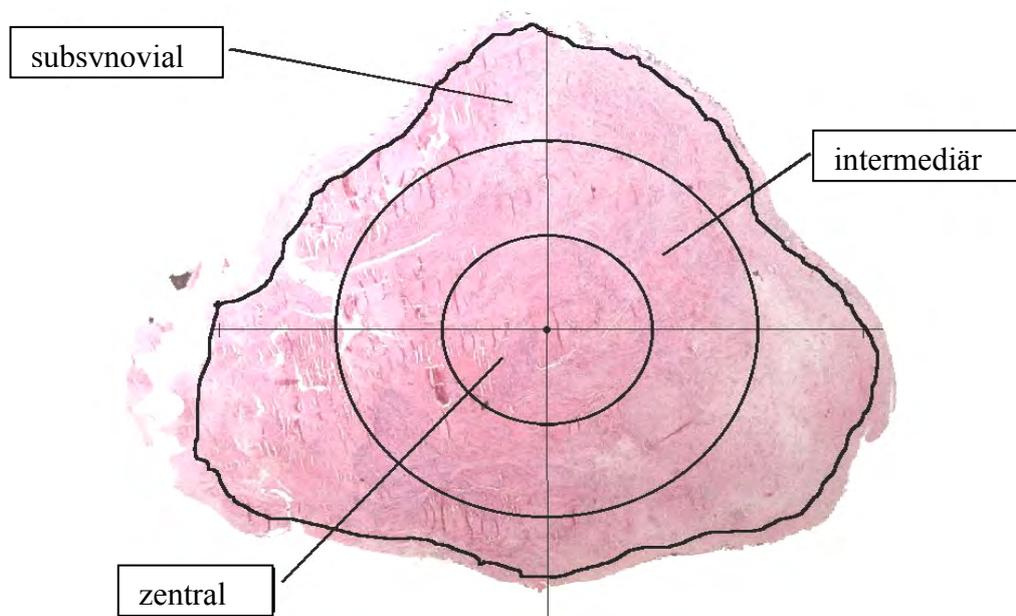


Abb. 9: Lage der verschiedenen Regionen bei der FaktorVIII Auswertung (Unterhauser, 2004)

3.6.3. Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden zunächst als Exceltabellen gespeichert und aufbereitet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des computergestützten Statistikprogrammes SPSS 12.0. Da nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, erfolgte die weitere

Auswertung mittels nicht-parametrischer Testverfahren. Dabei erfolgte zum einen eine Auswertung der Gefäßentwicklung innerhalb der einzelnen Gruppen (Auto/Allo/Nativ) zunächst mittels Gruppenvergleich mit dem Kruskal- Wallis Test, und bei gefundenen Unterschieden wurde dann ein paarweiser Vergleich der Standzeiten innerhalb der einzelnen Regionen mittels Man-Whitney-U Test (MWU) durchgeführt. Der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte ebenfalls mittels MWU Test. Das Signifikanzniveau wurde mit $p= 0,05$ festgelegt. Das bedeutet, dass ab einem $p \leq 0,05$ die Nullhypothese als angenommen galt und somit der Unterschied zwischen den betrachteten Werten als signifikant angesehen wurde. Als Lagemaß wurde der Median verwandt. Zusätzlich wurde als Streuungsmaß die Differenz des höchsten und des niedrigsten Wertes in der jeweiligen Gruppe betrachtet.

Alle statistischen Ergebnisse sind als beschreibende Elemente zu verstehen und beziehen sich nur auf Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit ermittelten Daten. Aufgrund der geringen Fallzahl und der Tatsache, dass die Stichprobenauswahl nicht zufällig erfolgte, sind Schlussfolgerungen in Bezug auf eine unabhängige Grundgesamtheit differenziert zu betrachten.