

## 4 Diskussion

Eine alte und immer wieder aktuelle Streitfrage der VKB-Rekonstruktion ist die Frage nach dem am besten geeigneten Transplantat. Hierbei werden überwiegend die verschiedenen körpereigenen Transplantatalternativen untersucht und diskutiert. Jedoch stehen diese autologen Transplantate z.B. bei multiplen Bandverletzungen des Kniegelenkes nur eingeschränkt zur Verfügung. Auch die mit der autologen Sehnenentnahme verbundene Entnahmemorbidität stellt eine Einschränkung dar, die den Ruf nach allogenen Material zunehmend lauter werden lässt. Allerdings bestehen immer noch Zweifel an der Gleichwertigkeit der biologischen Eigenschaften. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, anhand der Gesamtzellzahl, der Myofibroblastendichte und des Kollagen-Crimps den intraartikulären Remodeling-Prozess zu untersuchen und zu vergleichen. Die so erhobenen Daten sollten auch im Zusammenhang mit den im Rahmen dieses Projektes in einer weiteren Studie ermittelten biomechanischen Daten und der Analyse der Vaskularisierung betrachtet werden. Die klinische Relevanz besteht in der Planung der Nachbehandlung nach allogener VKB-Rekonstruktion, die sich an der Geschwindigkeit des Einheilungsprozesses orientieren sollte.

### 4.1 Ligamentisierung

Eine als Kreuzband-Ersatz verwendete Sehne wie die Patellarsehne übernimmt histologisch und biochemisch zunehmend die Gestalt des vorderen Kreuzbandes selbst. Dieser Umstand konnte schon durch Amiel et al. (1986) [5] am Kaninchenmodell belegt werden. Sie nannten diese Metamorphose „Ligamentisierung“ und führten sie auf die veränderte mechanische Belastungssituation und das neue synoviale Milieu zurück, in dem sich das Transplantat nun befand. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde ebenfalls ein solcher Umbau-Prozess des Transplantates deutlich. Dies galt für die autologen wie für die allogenen Transplantate gleichermaßen. Dabei zeigte sich ein Umbau mit einer zunächst unregelmäßigen Zell- und Kollagenanordnung mit extrem hyperzellulären, vor allem in den Randbereichen und hypo- bis azellulären Arealen in zentralen Regionen. Die Zellen wandern fingerförmig von proximal und distal und ausgehend von der synovialen Hülle entlang der Gefäßstraßen in das Transplantat ein, um es nach 1 Jahr wieder vollständig zu bevölkern (*Abb. 19, d*). Auch findet

sich im Verlauf eines Jahres wieder eine zunehmende longitudinale Orientierung des Gewebes. Die Gefäße verlaufen wieder vermehrt in bindegewebigen Septen und richten sich ebenfalls longitudinal aus. Anders als in der nativen Flexorsehne zeigen die Zellkerne und vor allem die der Myofibroblasten zunehmend eine ovoide bis runde Morphologie und gleichen damit immer stärker den Zellkernen der nativen Kreuzbänder.

Vergleicht man die Transplantate mit den nativen Kreuzbändern, zeigen die Transplantate quantitativ nach 6 Wochen noch eine signifikant geringere Gesamtzellzahl als die der nativen Kreuzbänder. Die Zellzahl gleicht zu diesem frühen Zeitpunkt noch mehr den nativen Flexorsehnen. Mit zunehmender Standzeit steigt sie jedoch wieder auf VKB-Niveau an. Dabei zeigt sich in den 12- und 52-Wochen-Gruppen eine deutlich erhöhte Varianz im Sinne hoher Standardabweichungen, was die Aktivität des Remodeling-Prozesses zu diesen Zeitpunkten unterstreicht. Auch die Anzahl der Myofibroblasten steigt nach 6 Wochen wieder an. Die Wellenlänge des Kollagens, das Kollagen-Crimp zeigt erst nach 52 Wochen keinen signifikanten Unterschied mehr gegenüber den nativen Kreuzbändern, wobei sich die Kollagenstruktur morphologisch noch deutlich von dem nativen Bandgewebe unterscheidet. Das Gewebe gleicht jedoch im Jahresverlauf zunehmend dem Kreuzbandgewebe.

Auch hier kamen Amiel et al. (1986) [5] zu ähnlichen Ergebnissen. Sie fanden am Kaninchenmodell ebenso eine Repopulation der Zellen von peripher nach zentral. Schon nach 4 Wochen war eine gleichmäßige Verteilung und eine dem VKB entsprechende Kernmorphologie erreicht, nach 6 Wochen eine longitudinale Orientierung und nach 30 Wochen eine dem VKB entsprechende Zellzahl. In einer Studie von Hoffmann und Haegele (1993) [70] zeigten sich sogar schon nach 16 Wochen eine dem Kreuzband ähnliche Kollagenorientierung, Zellmorphologie und Mikroangiographie. Sie untersuchten Transplantate der Sehne des *M. flexor digitorum longus* am Kaninchen. Ein Grund für das offenbar schnellere Remodeling in den Studien von Amiel et al. und Hoffman und Haegele mag in erster Linie an der Spezies liegen. Kaninchen zeigen in der Regel eine raschere Regeneration als größere Tiere oder gar Menschen. Auch mag die geringere Größe des Transplantates im Kaninchenmodell eine Rolle spielen. Liegt doch die Grundlage der Revitalisierung initial in der Diffusion und später in der Revaskularisierung, die in einem kleineren Transplantat sicherlich schneller abläuft.

Bosch und Kasperczyk (1993) [19] untersuchten den Remodeling-Prozess analog zu der vorliegenden Studie am Schafsmodell. Sie verwendeten als Transplantat jedoch Patellarsehnen zum hinteren Kreuzbandersatz. Sie teilten den Umbau-Prozess des Transplantatgewebes entsprechend der Phasen der Wundheilung in drei Stadien ein: Die initiale Phase der partiellen ischämischen Nekrose und Degeneration (bis 2 Wochen) und die Revitalisierungsphase (bis 16 Wochen). Es folgte die eigentliche Remodelingphase (bis 6 Monate). Auch sie fanden eine vor allem zentrale Desorganisation der Gewebestruktur, eine periphere Invasion von Granulationsgewebe gefolgt von einer zunehmend wieder longitudinalen Orientierung des Gewebes und Normalisierung des Zellgehaltes.

Vergleicht man die Aussagen der genannten Studien von Amiel et al. [5] und Bosch und Kasperczyk [19] fällt jedoch ein nicht unwesentlicher Unterschied auf: Amiel et al. postulierten, dass sich das Transplantat über die Zeit tatsächlich in eine dem intakten vorderen Kreuzband entsprechende Struktur transformiert. Dagegen gehen Bosch und Kasperczyk lediglich von einer Entwicklung zu einem narbenartigem Ersatzgewebe mit funktioneller Adaptation an die veränderte Umgebung aus. Sie konnten zwar in den frühen Remodeling-Phasen ein Angleichen des Gewebes an die Struktur des nativen HKBs zeigen, fanden jedoch nach 2 Jahren fortbestehende unterlegene biomechanische Eigenschaften sowie ein fehlendes Angleichen der elektronenmikroskopischen Parameter und der Kollagenstruktur. Auch wenn der von Amiel et al. eingeführte Begriff der „Ligamentisierung“ das von uns beobachtete Remodeling ziemlich treffend beschreibt, mussten auch wir feststellen, dass die Gewebeordnung nach einem Jahr noch nicht wieder dem Erscheinungsbild des nativen VKBs entspricht. So konnten wir zu diesem Zeitpunkt immer noch eine starke Varianz der Crimp-Frequenz beobachten und auch morphologisch glich die Kollagenanordnung nicht der des nativen vorderen Kreuzbandes. Ferner zeigten die im Rahmen dieser Studie ebenfalls erhobenen biomechanischen Daten auch nach 1 Jahr noch eine deutliche Unterlegenheit der Transplantate gegenüber den nativen Sehnen und Bändern. Es ist also eher von einem Angleichen der Sehnen an eine bandähnliche Struktur zu sprechen als von einer „Ligamentisierung“ im eigentlichen Sinne.

Goradia et al. (2000) [55] untersuchten das biologische Verhalten von Semitendinosussehnen-Transplantaten zur VKB-Rekonstruktion an 11 Schafen. Uns erschien die Semitendinosussehne aufgrund ihrer kurzen und faszienartigen Gestalt (siehe Abb. 10) als ungeeignetes Transplantat. Dennoch konnte auch in dieser Studie ein Remodeling-Prozess mit

einer zunehmenden Angleichung an die Gestalt des nativen VKBs im Verlauf von 24 Wochen nachgewiesen werden. Erst nach 1 Jahr fanden die Autoren schließlich eine dem VKB vergleichbare Zellzahl und eine weitgehend einheitliche Crimp-Struktur. Sie folgerten: Die in der Literatur wiederholt geforderte Aufnahme von sportlichen Aktivitäten schon nach 2-4 Monaten [102, 149], könnte das Transplantat für Verletzungen anfällig machen. Auch Falconiero et al. bezifferten den Abschluss der Ligamentisierung auf ein Jahr [42]. Sie untersuchten Biopsien von 38 humanen Patellarsehnen- und 8 humanen Hamstringsehnentransplantaten. Beide Autoren fanden also einen weitgehenden Abschluss des Remodelings nach 1 Jahr. Zu diesem Zeitpunkt waren unsere Transplantate zwar vollständig rezellularisiert und auch die Myofibroblasten waren wieder gleichmäßiger über das Transplantat verteilt. Sogar die Crimp-Wellen waren wieder regelmäßiger und longitudinal orientiert. Da das Kollagengewebe aber noch sehr inhomogen war und aufgrund fehlender längerer Standzeiten, können wir eine weitere Remodeling-Dynamik nach 1 Jahr aber nicht ausschließen.

Keine der bisher genannten Studien analysierten die Zellzahl und die Kollagenstruktur quantitativ, sondern beurteilten die Strukturen lediglich im Vergleich oder anhand von Skalen, in denen die Strukturen in Kategorien eingeordnet wurden. Dagegen konnte durch die vorliegende Arbeit der Remodeling-Prozess nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ untersucht werden. Nach 12 und 52 Wochen war kein signifikanter Unterschied der Gesamtzellzahl mehr gegenüber dem nativen VKB zu erkennen. Eine Ausnahme bildeten die allogenen Transplantate nach 52 Wochen. Die Kollagenwellenlänge unterschied sich in beiden Gruppen der 6- und 12-Wochen-Tiere noch signifikant gegenüber den nativen Kreuzbändern, während dieser Unterschied nach 52 Wochen wegfiel. Somit war das Angleichen des histologischen Erscheinungsbildes an das native VKB in unserer Studie bezüglich der Gesamtzellzahl nach 12 Wochen, bezüglich des Kollagen-Crimps jedoch erst nach 52 Wochen abgeschlossen, wobei sich die Morphologie aufgrund der noch variierenden Crimpfrequenz innerhalb eines Transplantates noch von nativem Bandgewebe unterschied. Weitere Studien mit längeren Standzeiten müssen zeigen, ob sich diese Varianz zu einem späteren Zeitpunkt nivelliert oder ob auch hier ein Endstadium erreicht ist.

In einer früheren Studie mit identischem Versuchsmodell von Weiler et al. (2002) [190] wurden Gesamtzellzahl, Myofibroblastendichte und Kollagen-Crimp sowie die Revaskularisierung auch quantitativ an ovinen Kreuzbandtransplantaten untersucht. In dieser

Studie wurden ausschließlich autologe Transplantate verwendet. Darin fand auch Unterhauser (2004) deskriptiv eine Remodeling-Dynamik von peripher nach zentral und eine zunehmend septale Gliederung der Gefäße. Quantitativ wurde der Gefäßstatus und die Zellzahl des nativen vorderen Kreuzbandes nach 24 Wochen erreicht. Auch die Kollagenwellenlänge erreichte nach 24 Wochen ein Endstadium, wobei sie dennoch signifikant unterhalb der Wellenlänge des nativen VKBs blieb. Der Myofibroblastenanteil zeigte sich nach 24, 52 und 104 Wochen dem nativen VKB vergleichbar, wobei er nach 104 Wochen wieder signifikant höher lag [190]. Auch die Ergebnisse dieser Studie zeigten nach 52 Wochen eine Myofibroblastendichte, die dem nativen VKB entsprach. Auffällig gegenüber unseren Ergebnissen ist jedoch der zeitliche Verlauf: Während in unseren Versuchen ein deutlicher Anstieg der Gesamtzellzahl von 6 auf 12 Wochen zu verzeichnen war, fiel sie bei Unterhauser (2004) kontinuierlich über 24 Wochen ab, um dann auf diesem Niveau zu verharren. Die Kollagenwellenlänge verringerte sich in unserer Untersuchung höchstens tendenziell, bei Unterhauser fiel sie besonders zwischen 6 und 12 Wochen deutlich ab. Eine mögliche Ursache für diese differente Dynamik könnte in der Transplantatverankerung liegen: Unterhauser verwendete eine intraartikuläre Fixierung mit Hilfe einer bioresorbierbaren Interferenzschraube, während wir eine ausschließlich extraartikuläre Fixation mit Endobutton<sup>48</sup> und Knochenbrücke wählten. Der enge Kontakt des Transplantates zum Knochen bei der anatomischen Fixation könnte durchaus die Revitalisierung des Gewebes beschleunigen. Dieser Zusammenhang zwischen Transplantatverankerung und Remodeling-Dynamik erfordert weitere Untersuchungen.

## **4.2 Myofibroblasten**

Einen entscheidenden Einfluss auf das Remodelingverhalten von Kreuzbandtransplantaten scheinen Myofibroblasten zu nehmen. Diese Zellen zeigten in einigen in-vitro Studien ihren kontraktile Einfluss auf die extrazelluläre Matrix [63, 105, 108, 172]. Sie wurden als pathologisches Korrelat der Wundkontraktion [52] und der Dupuytren'schen Palmarkontraktur [51] sowie bei weiteren Erkrankungen, die mit einer Kontraktion des Gewebes einhergehen nachgewiesen [1, 12, 15, 21, 68].

---

<sup>48</sup> Acufex<sup>®</sup>, Smith & Nephew Endoscopy Inc., Ma, USA

Im gesunden und heilenden medialen Kollateralband des Kaninchens wurden Myofibroblasten 1996 von Faryniarz et al. nachgewiesen. Sie postulierten, dass sie möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Wiedererlangung der in-situ Spannung spielten [43]. Kurz darauf wurde ihre Existenz im nativen und rupturierten humanen VKB von Murray und Spector (1999) belegt [110, 111]. Sie zeigten, dass die kürzeste Wellenlänge der Kollagentertiärstruktur (Crimp-Länge) in dem Bereich mit der größten Anzahl an Myofibroblasten liegt [111]. Weiler et al. beobachteten 2002 erstmals Myofibroblasten während des Transplantatremodelings nach VKB-Ersatz im Schafsmodell. Sie fanden dabei ebenfalls den kürzesten Crimp im eingehheilten Transplantatgewebe mit der größten Myofibroblastendichte [190]. Diese Zellen hatten also offensichtlich einen kontraktile Einfluss auf die Extrazelluläre Matrix. Diesen Zusammenhang konnten wir in unserer Studie jedoch nicht bestätigen. Nach 12 Wochen ergaben sich zwar für beide Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die höhere Myofibroblastenzahl führte jedoch nicht wie erwartet zu einer gesteigerten Crimp-Frequenz sondern eher zu einer höheren Wellenlänge des Kollagens, also nicht zu einer kontrahierten Gewebestruktur. Das Kollagen-Crimp stellte sich im remodellierenden Gewebe jedoch äußerst unregelmäßig dar. Es ist mit unserer Technik aber unmöglich, neu geformtes Kollagen von sich im Abbau befindendem Kollagen zu unterscheiden. Somit werden auch Crimp-Wellen in der Auswertung mitberücksichtigt, die nicht mit den eingewanderten Zellen im Zusammenhang stehen. Beim Prozess der Fibrillogenese spielen aber auch noch weitere Faktoren eine Rolle. Die Kollagenbildung verläuft in mehreren Schritten und wird beeinflusst von diversen Kollagenasen, die von Fibroblasten sezerniert werden. Auch Grundsubstanzen wie Proteoglycane und Glycoproteine spielen eine Rolle. Schließlich findet eine Quervernetzung der Trippelhelices statt. Alle diese Schritte beeinflussen die Crimp-Formation. Um den Gewebeumbau nach einer Sehnen transplantation zu verstehen müssten also noch weitere biochemische Analysen mit allogenen und autologen Transplantaten erfolgen.

Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass Myofibroblasten eine wichtige Rolle beim Remodeling- und Ligamentisierungsprozess des Kollagen-Crimps spielen. Neben kontraktile Elementen sind Myofibroblasten auch sekretorisch aktiv. Sie sezernieren die Vorläuferproteine des Kollagens und beeinflussen durch sezernierte Kollagenasen den Gewebeabbau [148, 171, 192]. Daher haben sie vermutlich auch einen wesentlichen Einfluss auf die Wiedererlangung der Reißfestigkeit eines Transplantates nach VKB-Ersatz. Ferner stellte der Myofibroblast als biologisch aktive Zelle einen Indikator für den Remodeling-

Prozess dar. In der vorliegenden Studie wurden erstmals Myofibroblasten als potentieller Faktor für den Remodeling-Prozess zum Vergleich von autologen und allogenen Transplantaten herangezogen. Ferner konnte aufgrund der verbesserten Methodik erstmals die Bedeutung der Myofibroblasten für das frühe Bandremodeling nach 6 und 12 Wochen gezeigt werden.

### **4.3 Autograft versus Allograft**

Primäres Ziel dieser Studie war der Vergleich der zellulären und extrazellulären Gewebeveränderungen von autologer und allogener VKB-Ersatzplastik mit freier Flexorsehne im Tiermodell. Bisherige Studien dazu waren widersprüchlich. So konnten vor allem hinsichtlich der klinischen Ergebnisse keine Unterschiede zwischen den Transplantaten nachgewiesen werden. [62, 97, 152, 153]. Bei früheren tierexperimentellen Arbeiten [10, 153] konnte aber eine Mehrzahl dieser Studien ein verzögertes Remodeling und eine eingeschränkte Biomechanik des allogenen Gewebes feststellen [64, 80, 92, 114]. In fast allen dieser Studien wurden allerdings Patellarsehnentransplantate verwendet, die über einen Knochenblock in einen ossären Tunnel einheilen [56, 80, 104, 115, 153, 169]. Sehr wenige Autoren nutzten knochenblockfreie Sehnen-transplantate, allerdings ausschließlich im klinischen Vergleich [7, 156, 178]. Heute werden jedoch in zunehmender Anzahl knochenblockfreie Hamstringsehnen-Transplantate verwendet, die einen anderen biochemischen Aufbau und eine andere Art der Knochen-Band-Heilung aufweisen (Sehnen-Knochen-Einheilung) [132]. Einige der klinische Studien untersuchten die Transplantate auch histologisch anhand nur weniger Biopsien oder Revisionen [56, 152]. Keine der genannten Arbeiten untersuchten quantitativ die Anzahl der Zellen und den Wellenabstand des Kollagen-Crimps, sondern bewerteten das Gewebe lediglich deskriptiv oder anhand von Skalen. Die Studien, die ein aussagekräftiges Großtiermodell verwendeten, untersuchten im Vergleich zu den 54 Schafen dieser Studie erheblich geringere Tierzahlen [64, 153, 169]. Durch die vorliegende Studie liegt erstmals ein Vergleich autologer und allogener knochenblockfreier Kreuzbandtransplantate vor.

Zwischen allogenen und autologen Transplantaten ergaben sich in der vorliegenden Arbeit folgende Unterschiede: Die allogenen Transplantate zeigten in der 6-Wochen-Gruppe eine signifikant geringere Gesamtzellzahl, während die Myofibroblastendichte in den Allografts

lediglich tendenziell vermindert war. In der 12-Wochen-Gruppe zeigten sich jedoch eine signifikant geringere Myofibroblastenzahl und Crimplänge bei den allogenen Transplantaten während sich beide Gruppen bezüglich der Gesamtzellzahl ähnelten. Insgesamt ließen sich nach 12 Wochen die deutlichsten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen (Graphik 1-3). Insbesondere die deskriptive Analyse enthüllte zu diesem Zeitpunkt die prägnantesten morphologischen Abweichungen. Dabei zeigte das autologe Gewebe eine regelmäßige Zell- und Gefäßverteilung und Kollagenstruktur sowie eine deutlichere longitudinale Orientierung. Nach 52 Wochen fanden sich deskriptiv außer einer größeren Varianz zwischen den Schnitten und noch vereinzelt hypozellulären Bereichen in zwei Präparaten der allogenen Transplantate keine Unterschiede mehr. Die Morphologie v.a. bezüglich der Zellularisierung und Vaskularisierung glich zu diesem Zeitpunkt weitgehend der der nativen Kreuzbänder. Allerdings war die Zellzahl der allogenen Transplantate nach 52 Wochen wieder signifikant größer als bei den nativen Kreuzbändern (*Graphik 1*). Insgesamt zeigten also die Transplantate nach 12 Wochen die deutlichsten und nach 52 Wochen die geringsten Unterschiede. Eine dem VKB vergleichbare Zellmorphologie und Zellverteilung wurde in beiden Gruppen erst nach 52 Wochen erreicht. Während wir also in unserer Studie im Jahresverlauf Unterschiede zwischen autologen und allogenen Transplantaten finden konnten, nivellierten sich diese Unterschiede nach 1 Jahr weitgehend.

Aufgrund eines stets unterschiedlichen Versuchsaufbaus sind die erzielten Ergebnisse nur eingeschränkt mit der Literatur zu vergleichen. So wurden diverse Tiermodelle verwendet, verschiedene Transplantate eingesetzt, die wiederum mit verschiedenen Methoden verankert wurden. Die Standzeiten der Tiere und somit auch der Beobachtungszeitraum des Remodeling-Verhaltens variieren stark. Schließlich existieren auch Unterschiede in der Verarbeitung und Färbung der Präparate. Die Tiermodelle unterscheiden sich vor allem in der Anatomie und der postoperativen Belastung voneinander. Neben der schnelleren Einheilung der Patellarsehnentransplantate aufgrund ihrer Verankerung durch Knochenblöcke, zeigen die verschiedenen Sehnen auch einen unterschiedlichen biochemischen Aufbau [132] und somit vermutlich auch ein differierendes Umbauverhalten. Die Verankerung könnte für den Umbauprozess ebenfalls eine Rolle spielen. So führt eine intraartikuläre, anatomische Verankerung zu einer höheren Konstruktsteifigkeit [77], welches möglicherweise auch einen direkten Einfluss auf die Art und den zeitlichen Verlauf der Remodelingvorgänge haben kann. Somit erschweren unterschiedliche Verankerungsmethoden ebenfalls den Vergleich der Studien.

Im Gegensatz zu der unterschiedlichen Zellularisierung zwischen den Gruppen unserer Studie konnten einige andere Studien keine langsamere Remodeling-Dynamik der allogenen Transplantate gegenüber den autologen finden. Die vorwiegend klinischen Arbeiten verwendeten Patellarsehnentransplantate und beobachteten den Verlauf auch über mehrere Jahre [62, 94, 97, 116]. Eine Studie von Shino et al. (1993) verdeutlichte dabei sogar die Entnahmemorbidity der autologen Transplantate und betonte somit eine mögliche Überlegenheit der Allografts [155]. Auch in einem Hunderversuch des gleichen Autors konnten keine signifikanten Nachteile der Allografts gefunden werden (Shino et al., 1984) [153]. Dazu wurden biomechanische und histologische Untersuchungen angestellt. Wie in unserer Studie konnten auch Shino et al. eine zentrale Hypovaskularisierung und Azellularität nach 6 Wochen nachweisen. Nach 15 Wochen war ebenso wie in unseren 12-Wochen-Präparaten die Vaskularisierung und Rezellularisierung weiter nach zentral fortgeschritten. Dabei schien die Revaskularisierung in den Allografts sogar geringfügig fortgeschrittener zu sein als in der autologen Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede konnten Shino et al. aber zu keinem Zeitpunkt nachweisen, während wir gerade nach 6 und vor allem nach 12 Wochen signifikant mehr Zellen im Autograft finden konnten. Diese unterschiedliche Entwicklung ist unter Umständen im Versuchsaufbau begründet. So verwendeten Shino et al. BPTB-Transplantate (Bone-Patellar-Tendon-Bone-Transplantate). Ferner dienten für die 26 Allograft-Tiere lediglich 6 autolog transplantierte Hunde als Kontrolle. So konnten histologisch nur deskriptive Analysen durchgeführt werden. Sicherlich ist auch die mikroangiographische Untersuchung nicht so genau wie die immunhistologische Darstellung der Gefäße, was in der vorliegenden Studie durch die Anfärbung des Aktins der Endothelzellen gewährleistet war. Nach 52 Wochen war bei Shino et al. eine vollständige Reifung des Gewebes festzustellen, die auch wir zu diesem Zeitpunkt bezüglich der Zellzahl und –Morphologie bestätigen konnten.

Die einzige tierexperimentelle Studie, die sogar eine mögliche Überlegenheit der Allografts herausarbeiten konnte, wurde im Kleinterversuch an Ratten durchgeführt (Nagano et al., 1996) [113]. Die Autoren stellten mit Hilfe radioaktiv markierten Patellarsehnengewebes fest, dass die Prozentzahl alten Kollagens im Allograft nach 4 Wochen geringer war während schon nach 12 Wochen ein Angleichen beider Gruppen zu verzeichnen war. Die Zellularität war nach 2 Wochen in den Allografts signifikant höher als in den Autografts. Während die Gruppen hier schon nach 4 Wochen das gleiche Level erreichten. In unserer Studie war dagegen die Zellularität zu den frühen Zeitpunkten bei den allogenen Transplantaten

insgesamt verringert, während eine Hyperzellularität höchstens in der Peripherie zu beobachten war. Ein Grund für diesen unterschiedlichen Verlauf mag hier nicht nur in der unterschiedlichen Transplantatwahl der Studien sondern auch in den Versuchstieren liegen. So leuchtet ein, dass ein kleineres Transplantat von einer Ratte schneller und anders remodelliert als ein großes. Sicherlich ist ein Rattentransplantat auch schneller revaskularisiert. Ferner ist die postoperative Belastung in einem Kleintierprojekt verringert. Auch bei einer offensichtlich früheren Gewebeumbau der Allograft bei Nagano et al. zeigt diese Studie, dass sich das Gewebe beider Gruppen histologisch nach einer gewissen Zeit angleicht.

Die Mehrzahl der tierexperimentellen Studien fanden aber histologisch überlegene Eigenschaften der Autografts. So zeigten Jackson et al. (1993) in einer Studie mit 40 Ziegen bei den Allografts eine stärkere Differenz zum nativen VKB mit einer deutlicheren Entzündungsreaktion und Hypervaskularität nach 6 Wochen [80]. Eine statistische Aussage konnten allerdings auch sie mit nur 2 histologisch und 2 elektronenmikroskopisch untersuchten Präparaten pro Gruppe nicht treffen. Außerdem verwendeten sie ebenfalls Patellarsehnen-Transplantate, die sich im Aufbau und im Inkorporationsverhalten von Flexorsehnen unterscheiden. Dennoch fanden wir ebenso nach 6 Wochen eine verzögerte Revaskularisierung bei den Allografts. Eine Hypervaskularisierung beobachteten wir vielmehr in der Peripherie, während das gesamte Transplantat eher weniger Gefäße aufwies als bei den autologen Tieren. Nach 6 Monaten fanden Jackson et al. bezüglich Zellularität, Zellmorphologie und Knochen-Band-Verbindung keine Unterschiede mehr. Das Kollagen war in beiden Gruppen wieder longitudinal orientiert. Nach einem halben Jahr war das Gewebe also zumindest histologisch vollständig ausgereift. Dies entspricht dem Ergebnis einer Vorläuferstudie von Unterhauser. So wurden bei autologen Transplantaten mit ähnlichem Versuchsaufbau der Gefäßstatus und die Zellzahl sowie der Myofibroblastenanteil des nativen vorderen Kreuzbandes nach 24 Wochen erreicht. Auch die Kollagenwellenlänge erreichte nach 24 Wochen ein Endstadium, wobei sie dennoch signifikant unterhalb der Wellenlänge des nativen VKBs blieb [175]. In unserer Studie hingegen waren die Unterschiede nach 12 Wochen größer als nach 6 Wochen. Eine Kreuzband-ähnliche Zellmorphologie- und Verteilung sowie eine longitudinale Orientierung des Kollagens fanden wir erst nach 1 Jahr. Wir verzichteten aber auf eine Standzeit von 6 Monaten, so dass wir keine Aussage zum Fortschritt des Remodeling zu diesem Zeitpunkt machen konnten.

Interessant sind auch die elektronenmikroskopischen Daten bei Jackson et al. Dabei zeigten die allogenen Transplantate nach 6 Monaten noch deutlich geringere Kollagenfaserdurchmesser. Wie in unserer 52-Wochen-Gruppe waren die Allografts nach 6 Monaten auch biomechanisch noch den autologen Transplantaten unterlegen. Sie konnten also wie wir beobachten, dass bei unterschiedlicher Remodeling-Dynamik zu einem frühen Zeitpunkt die Biomechanik der Allografts zu einem späteren Zeitpunkt noch unterlegen bleibt, während sich das lichtmikroskopische Erscheinungsbild schon angeglichen hatte. Möglicherweise spielt hier eine zu frühe Belastung in einer vulnerablen Phase des Remodelings eine Rolle, wurde doch bei Jackson et al. wie in unserer Studie auf eine Immobilisation der Versuchstiere verzichtet. Diese Erkenntnis würde bedeuten, dass insbesondere bei den allogenen Transplantaten von einer zu frühen und forcierten Nachbehandlung abgeraten werden sollte. Dies würde vermutlich die mechanische Stabilität im Langzeitverlauf unterstützen. Leider untersuchten Jackson et al. die Transplantate nur zu den genannten 2 Standzeiten. Es wäre interessant zu sehen, ob sich diese biomechanischen Unterschiede z.B. nach 1 Jahr nivelliert hätten.

Über einen längeren Zeitraum verfolgten Shino et al. (1995) [156] das Remodeling-Verhalten von autologen und allogenen Transplantaten. Sie zeigten elektronenmikroskopisch an menschlichen sekund-look Biopsien von knochenblockfreien Sehnen-Transplantaten, dass die Anzahl der Kollagenfibrillen mit großem Durchmesser innerhalb des ersten Jahres abnahm. Dieser Gewebeumbau erreichte nach 12 Monaten ein Endstadium mit einer fortbestehenden Dominanz kleiner Kollagenfibrillen-Durchmesser. Die Struktur von nativen Kreuzbändern erreichten die allogenen Transplantate aber auch nach 8 Jahren nicht. In unserer histologischen Analyse dagegen war nach 1 Jahr bezüglich der Zellverteilung und Revaskularisierung die Morphologie des nativen vorderen Kreuzbandes erreicht. Betrachtet man aber die Kollagenwellenlänge im Jahresverlauf, (siehe Graphik 3) kann man aber perspektivisch ebenfalls keine deutliche Tendenz zu Kreuzband-ähnlichen Werten feststellen. Zwar war eine longitudinale Orientierung im Sinne eines nativen Band- oder Sehngewebes wieder hergestellt, die Crimp-Frequenz variierte aber noch stark. Dies galt jedoch für die allogenen wie für die autologen Transplantate gleichermaßen. Ein Unterschied war also histologisch zwischen beiden Gruppen nach einem Jahr nicht mehr festzustellen.

Über einen längeren Zeitraum beobachteten auch Nikolaou und Mitarbeiter (1986) [114] das Remodelingverhalten von Autografts und Allografts. Sie verwendeten dazu im Hunderversuch

die vorderen Kreuzbänder selbst als Transplantat, die sie mit einer speziellen Technik inklusive Knochenblöcken entnahmen. Bei den histologischen und mikroangiographischen Untersuchungen fanden sie eine dem nativen VKB ähnelnde Erscheinung wie Jackson et al. [80] und Unterhauser [175] schon nach 24 Wochen. Für die autologen Transplantate war dieses Ergebnis jedoch schon nach 16 Wochen erreicht. Die Reißkraft der allogenen Transplantate war zu diesen Zeitpunkten noch unterlegen und erreichte erst nach 36 Wochen die gleiche Festigkeit. Nikolaou et al. zeigten also ein Angleichen des histologischen Aufbaus beider Transplantate bei unterschiedlichem zeitlichem Verlauf. Das vordere Kreuzband als Transplantat konnte sich jedoch in der Praxis bisher nicht durchsetzen. Außerdem untersuchten auch Nikolaou et al. nur 2-3 Tiere pro Standzeit, was in anbetracht der starken Varianz des sich umbauenden Gewebes sicherlich als zu gering einzuschätzen ist. Im Vergleich zu unseren Ergebnissen war bei Nikolaou et al. schon früh eine kreuzbandähnliche Morphologie erreicht. In unserer Studie war dies für beide Gruppen erst nach 12 Monaten zu beobachten. Wie bereits erwähnt, hatten wir aber keine Standzeit von 24 Wochen. Es leuchtet auch durchaus ein, dass das vordere Kreuzband selbst als Transplantat schneller zu einer kreuzbandähnlichen Gestalt remodeliert als ein Sehnen transplantat. Auch wäre denkbar, dass das Transplantatremodeling im Hunderversuch mit einer anderen Dynamik verläuft als im Schafsmodell.

Krikpatrick und Mitarbeiter (1996) [92] nutzten ebenfalls Hunde für ihre Versuche und zeigten eine verzögerte Revaskularisierung und Repopulation der Zellen im allogenen Gewebe. Auch biomechanisch waren im Langzeitversuch von 2 Jahren die allogenen den autologen Transplantaten unterlegen. Thorson et al. (1989) [169] zeigten ebenso im Hunderversuch eine deutliche biomechanische Unterlegenheit des allogenen Transplantates mit ausgeprägteren Entzündungsreaktionen und Knorpeldefekten. Sie untersuchten 15 Hunde, von denen aber nur 4 ein autologes Transplantat des Traktus iliotibialis erhielten. Die allogenen Transplantate wurden dagegen aus den Patellarsehnen entnommen, was einen Vergleich eigentlich unmöglich macht. Entzündungsreaktionen, wie sie auch bei Jackson et al. erwähnt werden, konnten wir im Sinne von einer Granulozyten- oder Lymphozytenproliferation dagegen nicht beobachten. Wir fanden lediglich Gefäßinjektionen im Bereich der Synovialmembran, die aber für beide Gruppen gleichermaßen von 6 über 12 Wochen deutlich in ihrer Anzahl abnahmen und nach 1 Jahr nicht mehr zu beobachten waren. Ob im Hunderversuch, Ziegen- oder durch unser Schafsmodell konnte in fast allen

tierexperimentellen Studien ein langsames Remodeling der allogenen Transplantate im Vergleich zu den autologen Transplantaten gezeigt werden.

Es gibt jedoch auch einige *klinische* Studien, die die Eigenschaften allogenen Gewebes als Kreuzbandersatz in Frage stellen. So fanden sich höhere Versagerraten [166], ein schlechterer Pivot-Shift-Test [127, 150] und eine höhere anteriore Laxizität [128, 177]. Fast alle Autoren verwendeten jedoch Patellarsehnen als Transplantat. Eine umfangreiche klinisch-histologische Studie mit 268 Patienten zeigte ebenfalls Unterschiede (Gorschewsky et al., 2002) [56]: In der Allograft-Gruppe kam es zu einer wesentlich höheren Rerupturrate und zu einer größeren Laxizität im Pivot-Shift-Test und in der KT-1000-Translations-Messung. Allerdings wurde dagegen in der Autograft-Gruppe eine deutliche Entnahmemorbidity beobachtet. Ergänzend zu den klinischen Untersuchungen wurden in dieser Studie im Rahmen von Revisionseingriffen bei 4 Autograft- und 14 Allograft-Patienten nach 5-20 Monaten Proben zur histologischen Weiterverarbeitung entnommen. Dabei wurde der bereits erwähnte typische Verlauf des Remodelings beobachtet. Bei der Allograft-Gruppe fanden sich histologisch Hinweise auf eine verzögerte Einheilung und einen verlängerten Umbauvorgang: Hyperzellularität und Hypervaskularität waren im allogenen Gewebe länger und deutlicher vorhanden. Das Kollagengerüst war auch nach einem Jahr noch nicht regelmäßig longitudinal ausgerichtet. In unserer Studie dagegen machte sich das verzögerte Remodeling der Allografts durch eine Hypozellularität und Hypovaskularität bemerkbar. Allerdings konnten wir in unserer tierexperimentellen Arbeit auch zentrale Regionen der Transplantate beurteilen. Eine Biopsie-Studie dagegen ist in der Regel auf die Untersuchung peripheren Gewebes beschränkt. Auch in der umfangreichen Studie von Gorschewsky et al. wurden ausschließlich Patellarsehnentransplantate verwendet. Die allogenen Transplantate wurden allerdings mit Hilfe von  $\gamma$ -Strahlen sterilisiert, die nachweislich bei suffizienter Dosierung die biomechanischen und histologischen Eigenschaften des Transplantates schwächten [46, 129].

Zwei aktuelle klinische Studien fanden dagegen bessere Eigenschaften der Allografts. So zeigten Chang et al. (2003) bezogen auf die Rerupturrate, die Rückkehr zur Aktivität, den retropatellären Schmerz und das Flexionsdefizit bessere Eigenschaften von BPTB-Allografts. Jedoch zeigten sich in der subjektiven Bewertung, im Lysholm-Score und bei der KT-1000-Messung keine Unterschiede zwischen den Gruppen [25]. Poehling et al. (2005) dagegen zeigten zwar in der KT-1000-Messung eine größere Laxizität seiner allogenen Achillessehnen-transplantate. Auf der anderen Seite wurden bei den BPTB-Autografts stärkere

postoperative Schmerzen, eine schlechtere Funktion und höhere Aktivitätsbeschränkungen dokumentiert [128]. Bei unseren Untersuchungen konnten wir die Entnahmemorbidität nicht evaluieren, da auch den Schafen der Allograft-Gruppe eine Flexorsehne entnommen wurde.

Fassen wir die Ergebnisse der Literatur zusammen, die autologe und allogene Transplantate verglichen haben, müssen wir feststellen, dass sich vor allem die klinischen Studien in ihrer Aussage unterscheiden. Ein Unterschied zwischen den Transplantaten ist somit klinisch zumindest nicht offensichtlich. Tierexperimentelle Untersuchungen mit histologischen und biomechanischen Daten zeigten jedoch zumeist unterlegene Transplantateigenschaften der Allografts vor allem während des frühen Remodelings. Nach 24 bis 52 Wochen wird meist von einem Angleichen der Parameter berichtet. Elektronenmikroskopisch konnte jedoch gezeigt werden, dass die allogenen Transplantate offensichtlich gar nicht die Eigenschaften der Autografts erreichen. In dieses Bild fügen sich unsere Ergebnisse treffend ein und vervollständigen es. Durch die vorliegende Arbeit konnten erstmals im Schafsmodell, mit knochenblockfreier, extraartikulären Fixation und einer statistisch auswertbaren Stückzahl sowie der Analyse der Myofibroblasten deutliche Unterschiede nach 6, vor allem aber auch nach 12 Wochen Standzeit gezeigt werden. Nach 52 Wochen waren die Unterschiede zumindest bezüglich deskriptiver Auswertung, Zellzahl, MFB-Dichte und Kollagenstruktur fast nicht mehr existent. Das Angleichen der histologischen Parameter war also weitgehend abgeschlossen. Dennoch müssen weitere Studien mit längeren Standzeiten zeigen, ob sich insbesondere bezüglich der EZM zu späteren Zeitpunkten noch deutliche Änderungen ergeben.

#### ***4.4 Ergebnisse im Zusammenhang mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe***

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben den bereits erwähnten Parametern auch die Revaskularisierung untersucht und biomechanische Daten erhoben. Zur Darstellung der Gefäße wurde der Faktor VIII immunhistochemisch gefärbt und die Präparate in drei verschiedenen Zonen anhand von Querschnitten ausgewertet. Dabei fanden sich die deskriptiven Ergebnisse hier auch in den Querschnitten bestätigt: Die Revaskularisierung erfolgte von peripher nach zentral mit zunehmend homogener Anordnung des Gewebes und annähernd gleichem Erscheinungsbild der Gruppen nach 52 Wochen. Bei signifikant

unterschiedlicher Gefäßdichte zu jeder Standzeit im subsynovialen Bereich ergaben sich für die intermediäre Zone nur nach 6 Wochen signifikante Unterschiede zwischen autologen und allogenen Transplantaten. Da die Zellen das Gewebe entlang der Gefäße erreichen, ist ein Zusammenhang zwischen Revaskularisierung und Zell-Repopulation gegeben. Daher verwundert es nicht, dass sich zu diesem Zeitpunkt als einziges auch ein signifikanter Unterschied bezüglich der Gesamtzellzahl ergab. Nach 52 Wochen entsprach die Gefäßdichte der autologen Transplantate im subsynovialen Bereich annähernd wieder denjenigen des nativen vorderen Kreuzbandes, während die Gefäßdichte der allogenen Transplantate von 12 auf 52 Wochen wieder angestiegen war. Auch bei der Gesamtzellzahl ergab sich hier wieder ein Unterschied zu den nativen Kreuzbändern. Die Revaskularisierung schien bei den Allografts insgesamt verlangsamt abzulaufen.

Bei der biomechanischen Auswertung wurden die Schubladenlaxizität und ein Versagenstest durchgeführt. Dabei konnten zu den frühen Zeitpunkten von 6 und 12 Wochen bei beiden Gruppen biomechanisch keine Unterschiede gefunden werden. Obwohl die Versagenkraft und Laxizität der Autografts fast zu jedem Zeitpunkt den Allografts überlegen war, konnten wir in beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied erst nach 52 Wochen Standzeit beobachten.

Während die histologischen und immunhistologischen Ergebnisse zu den frühen Zeitpunkten Unterschiede zeigten, ließen sie nach 52 Wochen ein Angleichen der biologischen Eigenschaften vermuten. Auswirkung auf die biomechanischen Eigenschaften schien dies jedoch erst nach 52 Wochen zu haben.

#### **4.5 Limitierungen der Studie**

Obwohl das Schaf aufgrund anatomischer und funktioneller Ähnlichkeiten zum Menschen, guter Verfügbarkeit und ausreichender Größe ein mehrfach bewährtes Tiermodell für den vorderen Kreuzbandersatz ist [75, 112, 131], erscheint eine Übertragbarkeit insbesondere im Hinblick auf die Kinetik des Remodeling-Prozesses sicherlich nur eingeschränkt möglich. Die Tiere verfügen über einen anderen Metabolismus der z.B. im Vergleich zum Menschen eine deutlich schnellere Wundheilung und somit möglicherweise auch ein schnelleres Remodeling gewährleistet. Auch die biomechanischen Verhältnisse sind bei einem Vierbeiner immer

anders als bei einem Bipeden. Dennoch erschien uns das Schaf als das am besten geeignete Tiermodell für die vorliegende Studie.

Eine weitere Einflussgröße liegt in der Fixationstechnik. In unserer Studie wurde auf eine anatomische, gelenknahe Transplantatverankerung verzichtet. Der Kontakt zum Knochen, von dem die Revaskularisierung und somit auch die Rezellularisierung ausgehen, ist somit zwar gegeben, er ist aber nicht so fest, wie es bei der Verwendung von Verankerungsschrauben der Fall wäre. Auf der anderen Seite verhindern diese Schrauben in einem Bereich von ca. 30 % des Transplantatumfangs völlig den Kontakt zum Knochen. Es ist also durchaus möglich, dass es bei einer anatomischen Fixation zu einer anderen Remodeling-Dynamik gekommen wäre. So war in einer Vorgängerstudie mit anatomischer Transplantatverankerung ein anderer Jahresverlauf der untersuchten Parameter festzustellen als es in unserer Studie der Fall war [175].

Trotz penibler Einhaltung der Färbeprotokolle war ferner insbesondere die immunhistologische Färbung störanfällig. Gelegentlich blieb die Farbreaktion aus oder es färbte sich der Hintergrund an. Dies machte eine Differenzierung der einzelnen Zellen unmöglich. So mussten einige Färbungen aufgrund ungeklärter Ursache verworfen werden. Diese Versager sind aber bei immunhistologischen Färbungen durchaus bekannt. Sie führten bei der Auswertbarkeit der Daten zu keinerlei Einschränkungen.

Schließlich ist bei der Datenauswertung von histologischen Präparaten immer nur ein Näherungswert möglich. In der vorliegenden Studie wurde dies mit einkalkuliert und mit einer großen Tierzahl (9 pro Gruppe) und einer großen Zahl ausgewerteter Gesichtsfelder (10 pro Präparat) entgegengewirkt. Dennoch fallen bei der Betrachtung der Daten zum Teil große Standardabweichungen auf. Da es sich aber bei einem Gewebeumbau im Rahmen des Remodelings in sich um eine inhomogene Struktur handeln muss, lag das durchaus im Rahmen unserer Erwartungen.

Da die genannten Einflussgrößen aber für alle Standzeiten und für beide Transplantatgruppen in gleicher Weise galten, waren dennoch ein Vergleich zwischen den Gruppen und eine Beurteilung im Zeitverlauf möglich. Somit lassen sich durchaus die im folgenden Abschnitt dargestellten Aussagen treffen.

#### **4.6 Schlussfolgerung und klinische Bedeutung**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Bandremodeling im autologen Transplantat offensichtlich schneller abläuft als im allogenen Bandersatz. Zellen und Gefäße sind im Autograft nach 6 und 12 Wochen weiter nach zentral vorgedrungen und auch die Gewebeanordnung ist zu diesen Zeitpunkten geordneter. Die für das frühe Remodeling bedeutenden Myofibroblasten sind nach 12 Wochen im Autograft erhöht. Nach einem Jahr Standzeit erreichten die Werte wieder weitgehend das Niveau des vorderen Kreuzbandes mit nur noch geringen Unterschieden zwischen den autologen und allogenen Transplantaten. Die Gesamtzellzahl und die Revaskularisierung zeigte zu diesem Zeitpunkt zwischen Auto- und Allografts eine voneinander abweichende Dynamik, die weiterer Untersuchungen bedarf. Trotz der geringen Unterschiede nach einem Jahr, zeigten sich jetzt erstmal signifikante Unterschiede in der Versagenskraft der Transplantate. Die Revaskularisierung und konsekutiv die darüber erfolgte Repopulation mit Zellen und Myofibroblasten führte also bei unterschiedlicher Remodeling-Geschwindigkeit erst nach einem Jahr zu veränderten biomechanischen Werten.

Bei Betrachtung dieser Resultate sollte von einer zu euphorischen Verwendung von allogenen knochenblock-freien Sehnentransplantaten abgeraten werden. Bei komplexen, multiplen Kniebandverletzungen oder mehrfachen Revisionen mag es zwar weiterhin eine Indikation für Allografts geben, wir sollten jedoch den langsameren Ligamentisierungs-Prozess bedenken und demnach die Nachbehandlung entsprechend vorsichtiger ausrichten. Autologe Hamstringsehnen-Transplantate scheinen nach 1 Jahr wieder voll belastbar zu sein, während das Remodelingverhalten der Allografts zu diesem Zeitpunkt offenbar noch nicht ganz abgeschlossen ist. Weitere Studien müssen zeigen, ob es durch eine vorsichtiger Nachbehandlung möglich ist, nach einem oder zwei Jahren die gleichen Ergebnisse für autologe und allogene Sehnentransplantate zu erreichen. Vielleicht wird es in Zukunft sogar möglich sein, durch die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren, in die Remodeling-Dynamik einzugreifen um den Prozess der Ligamentisierung zu beschleunigen.