

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Untersuchung der frühen Knochen- Band-
Einheilung von allogenen Bandtransplantaten als
Ersatz des vorderen Kreuzbandes nach Sterilisation
mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck-
Verfahren**

-eine tierexperimentelle Studie am Schafsmodell-

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der medizinischen Fakultät Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von

Tassilo Böhm

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h.c. N. P. Haas
2. Priv.-Doz. Dr. med. A. Pruß
3. Priv.-Doz. Dr. med. W. Nebelung

Datum der Promotion: 16.05.2010

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Motivation.	1
1.2 Anatomie, biologische Struktur und Funktion des vorderen Kreuzbandes. . .	3
1.3 Die knöcherne Insertion des vorderen Kreuzbandes	4
1.4 Allgemeine Aspekte des vorderen Kreuzbandersatzes	6
1.5 Knochen- Band- Einheilung	8
1.6 Die Verwendung von Allografts für den Ersatz des vorderen Kreuzbandes. .	9
1.7 Sterilisationsverfahren	12
1.8 Fragestellung und Ziel der Studie.	13
2 MATERIAL UND METHODEN.	14
2.1 Studiendesign.	14
2.2 Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren.	15
2.3 Auswahl des Tiermodells und der Standzeiten.	17
2.4 Tierhaltung	18
2.5 Operatives Vorgehen	18
2.6 Polychrome Sequenzmarkierung	20
2.7 Biomechanische Testung.	22
2.8 Anfertigung der histologischen Präparate	22
2.9 Histologische Auswertung	26

3	ERGEBNISSE	30
3.1	Allgemeines	30
3.1.1	Postoperativer Verlauf und Komplikationen.	30
3.1.2	Biomechanischen Ergebnisse	30
3.1.3	Revaskularisierung	31
3.1.4	Remodeling	33
3.1.5	Makroskopische Befunde.	34
3.2	Histologische Ergebnisse	35
3.2.1	Ergebnisse der 6- Wochengruppe.	36
3.2.1.1	Knochen- Band- Einheilung	36
3.2.1.2	Transplantat	39
3.2.1.3	Knochenumbau	40
3.2.1.4	Fluoreszenzmikroskopie.	40
3.2.2	Ergebnisse der 12- Wochengruppe.	43
3.2.2.1	Knochen- Band- Einheilung.	43
3.2.2.2	Transplantat.	46
3.2.2.3	Knochenumbau.	47
3.2.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	48
4	DISKUSSION	50
4.1	Knochen- Band- Einheilung	50
4.2	Transplantaremodeling.	58
4.3	Relevanz der Untersuchungsergebnisse für den klinischen Alltag.	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATUR	66

7	ANHANG	82
7.1	Lebenslauf	82
7.2	Danksagung	83
7.3	Selbständigkeitserklärung	84

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb.:</i>	<i>Abbildung</i>
<i>AC:</i>	<i>Alcianblau- Färbung</i>
<i>ALLO:</i>	<i>Allograft</i>
<i>AUTO:</i>	<i>Autograft</i>
<i>BMP:</i>	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
<i>°C:</i>	<i>Grad Celsius</i>
<i>ca.:</i>	<i>circa</i>
<i>CA:</i>	<i>Kalifornien</i>
<i>CCD:</i>	<i>Charged Couple Device</i>
<i>EKG:</i>	<i>Elektrokardiogramm</i>
<i>et al.:</i>	<i>und andere</i>
<i>FGFb:</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Basic</i>
<i>g:</i>	<i>Gramm</i>
<i>HBV:</i>	<i>Hepatitis- B- Virus</i>
<i>HCV:</i>	<i>Hepatitis- C- Virus</i>
<i>HE:</i>	<i>Hämatoxylin- Eosin</i>
<i>HIV:</i>	<i>Humanes Immundefizienz Virus</i>
<i>HKB:</i>	<i>Hinteres Kreuzband</i>
<i>HTLV:</i>	<i>Humanes T-Zell-lymphotropes Virus</i>
<i>IGF:</i>	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
<i>kg:</i>	<i>Kilogramm</i>
<i>KG:</i>	<i>Körpergewicht</i>
<i>kGy:</i>	<i>Kilogray (1000 Joule pro kg)</i>
<i>M.:</i>	<i>Musculus</i>
<i>m²:</i>	<i>Quadratmeter</i>
<i>mb:</i>	<i>Millibar (= 1Hektopascal)</i>
<i>mg:</i>	<i>Milligramm</i>
<i>MG</i>	<i>Masson- Goldner- Trichromfärbung</i>
<i>ml:</i>	<i>Milliliter</i>
<i>mm:</i>	<i>Millimeter</i>
<i>mm²:</i>	<i>Quadratmillimeter</i>

<i>N:</i>	<i>Newton</i>
<i>PCR:</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PDGF:</i>	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
<i>PES:</i>	<i>Peressigsäure</i>
<i>pH:</i>	<i>potentia Hydrogenii</i>
<i>ppm:</i>	<i>parts per million</i>
<i>s:</i>	<i>Sekunde</i>
<i>s.:</i>	<i>siehe</i>
<i>SOvK:</i>	<i>Safranin-O- von- Kossa- Färbung</i>
<i>Tab.:</i>	<i>Tabelle</i>
<i>TGF:</i>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<i>TX:</i>	<i>Texas</i>
<i>U.S.:</i>	<i>United States</i>
<i>VEGF:</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<i>VKB:</i>	<i>vorderes Kreuzband</i>
<i>z.B.:</i>	<i>zum Beispiel</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	SEITE
<i>Abb. 1.1: Anatomische Darstellung des menschlichen Kniegelenks</i>	3
<i>Abb. 1.2: Histologie eines direkten Bandansatzes, hinteres Kreuzband eines Schafes aus der 6-Wochengruppe; Kollagenfasern (1), unverkalkter Faserknorpel (2), Kalkfaserknorpel (3), Lamellenknochen (4), MG</i>	6
<i>Abb. 1.3: Polymerisationsmikroskopisches Bild eines indirekten Bandansatzes, VKB- Rekonstruktion, Schaf; Lamellenknochen (1), Sharpey-Fasern (2), Kollagenfasern (3)</i>	6
<i>Abb. 2.1: Links: mediale Ansicht eines Schafknies. Über der oberen Pinzette liegt die Sehne des M. gracilis auf, darunter befindet sich der M. semimembranosus und über der unteren Pinzette stellt sich die Sehne des M. semitendinosus dar. Rechts: plantare Ansicht auf die Sehne des M. gastrocnemius (über der oberen Pinzette) und die Sehne des M. flexor digitalis superficialis (unter der unteren Pinzette) [64]</i>	14
<i>Abb. 2.2: Chemische Formel der Peressigsäure</i>	16
<i>Abb. 2.3: Allograft</i>	19
<i>Abb. 2.4: Darstellung der extraartikulären Transplantatfixierung [148]</i>	20
<i>Abb. 3.1: Links: Makroskopische Ansicht der Arthrofibrose nach 12 Wochen; der Pfeil deutet auf den Bereich des tibialen Tunneleingangs; Rechts: Mikroskopisches Bild der Arthrofibrose nach 12 Wochen</i>	34
<i>Abb. 3.2: Knochenschnitte (links Femur, rechts Tibia) mit Darstellung der Ebenen des Tunneleingangs (rot), der Tunnelmitte (blau) sowie des Tunnelbodens (grün)</i>	35
<i>Abb. 3.3: Direkte Bandinsertion III. Grades im Bereich des Tunneleingangs bis –mitte posterior; der Pfeil deutet in Richtung der Tunneleingangsebene; 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur, MG x 200</i>	37

<i>Abb.3.4:</i>	<i>Korrespondierende Darstellung der zu Säulen angeordneten chondroiden Zellen (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur, AC x 200</i>	<i>37</i>
<i>Abb. 3.5:</i>	<i>Korrespondierende Darstellung der breitem Mineralisationsfronten (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur, SOvK x 200</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 3.6:</i>	<i>Indirekte Bandinsertion über Sharpeysche Fasern (weiße Pfeile) neben direkter Bandinsertion II. Grades (schwarze Pfeile) am Tunnelboden; 6 Wochen, Schaf 6-06, Femur, MG x 200</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 3.7:</i>	<i>Direkte Bandinsertion III. Grades (weißer Pfeil) im Bereich des Tunneleingangs anterior; der schwarze Pfeil deutet in Richtung der Tunneleingangsebene; 6 Wochen, Schaf 7-06, Tibia, MG x 100</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 3.8:</i>	<i>Korrespondierende Darstellung der breiten Mineralisationsfront (schwarze Pfeile) neben noch nicht mineralisierten Knorpelsäulen (weiße Pfeile); 6 Wochen, Schaf 9-06, Tibia, SOvK x 100</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 3.9:</i>	<i>Darstellung eines Transplantats mit zentralen avitalen Anteilen (weißer Pfeil) mit z.T. vakuoliger Degeneration sowie hyperzellulärem Randbereich (schwarzer Pfeil); 6 Wochen, Schaf 7-06, Femur, MG x50</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 3.10:</i>	<i>Rundzellinfiltrate am Tunnelboden mit vereinzelt Fremdkörperriesenzellen (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 7-06, Tibia, MG x 400</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 3.11:</i>	<i>Osteoklasten am Tunnelboden (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 2-06, Femur, MG x 400</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 3.12:</i>	<i>Anlagerung von Calcein- Grün punktuell und Xylenol- Orange über gesamten Knochenkanal, tendenziell vermehrt am Tunnelboden; 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 3.13:</i>	<i>Gleichmäßige Anlagerung von Xylenol- Orange über gesamten Knochenkanal; 6 Wochen, Schaf 4-06, Femur</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 3.14:</i>	<i>Anlagerung aller drei Fluorochrome an die neugebildeten Knocheninseln (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 2-06, Tibia</i>	<i>42</i>

- Abb. 3.15: *Darstellung aller drei Fluorochrome, verstärkte Anlagerung von Tetracyclin in Tunnelmitte und v.a. im Eingangsbereich (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 7-06, Tibia* 42
- Abb. 3.16: *Bandinsertion mit z.T. verkalktem (schwarze Pfeile) neben unverkalktem Knorpel (weiße Pfeile) im Bereich des anterioren Tunneleingangs; 12 Wochen, Schaf 2-12, Femur, AB x 200* 45
- Abb. 3.17: *Indirekte Bandinsertion über Sharpeysche Fasern im Bereich der posterioren Tunnelmitte; 12 Wochen, Schaf 3-12, Femur, MG x 400* 45
- Abb. 3.18: *Vierzonenaufbau einer reifen direkten Bandinsertion (Grad IV) im Bereich des posterioren Tunneleingangs; Kollagen-fasern (1), unverkalkter Faserknorpel (2), Kalkfaserknorpel (3), Lamellenknochen (4); 12 Wochen, Schaf 8-12, Tibia, MG x 200* 45
- Abb. 3.19: *Korrespondierender Bildaus-schnitt; Kollagenfasern (1), unverkalkter Faserknorpel (2), Kalkfaserknorpel (3), Lamellenknochen (4); 12 Wochen, Schaf 8-12, Tibia, AB x 200* 45
- Abb. 3.20: *Darstellung eines Transplantats mit vakuoliger Degeneration in zentralen Anteilen; 12 Wochen, Schaf 2-12, Tibia, MG x400* 46
- Abb. 3.21: *Darstellung der zum Teil sehr kräftigen Osteoidanlagerungen im Bereich der Tunnelmitte; 12 Wochen, Schaf 9-12, Femur, MG x200* 47
- Abb. 3.22: *Vermehrte Anlagerung des Calcein- Grün im Bereich des Tunneleingangs; 12 Wochen, Schaf 1-12, Femur* 49
- Abb. 3.23: *Gleichmäßige Anlagerung aller drei Fluorochrome im gesamten Knochenkanal, bevorzugt aber im Bereich des Tunneleingangs und – bodens; 12 Wochen, Schaf 1-12, Femur* 49
- Abb. 3.24: *Kontinuierliche Anlagerung des Calcein- Grün im gesamten Knochenkanal; 12 Wochen, Schaf 9-12, Tibia* 49
- Abb. 3.25: *Verstärkte Anlagerung aller drei Fluorochrome im Bereich des Tunneleingangs mit Einengung desselbigen; 12 Wochen, Schaf 8-12, Tibia* 49

TABELLENVERZEICHNIS	SEITE
Tab. 2.1: <i>Empfehlung des AO- Forschungsinstituts Davos zur Herstellung von Injektionslösungen zur polychromen Sequenzmarkierung</i>	21
Tab. 2.2: <i>Zeitplan der polychromen Sequenzmarkierung</i>	22
Tab. 2.3: <i>Zusammensetzung der Fixierlösung</i>	23
Tab. 2.4: <i>Entwässerungsschema der Knochenscheiben</i>	23
Tab. 2.5 <i>Score zur semiquantitativen Auswertung der direkten Bandinsertion [143]</i>	29
Tab. 3.1: <i>Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der Knochen-Band-Einheilung der 6- Wochengruppe</i>	37
Tab. 3.2: <i>Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der Knochen- Band- Einheilung der 12- Wochengruppe</i> <i>*¹ 3 der 5 Präparate befanden sich im Übergang zur fortgeschrittenen Bandinsertion; *² 1 der 2 Präparate befand sich im Übergang zur ausgeprägten Bandinsertion; *³ 1 der 4 Präparate befanden sich im Übergang zur reifen Bandinsertion</i>	44
Tab. 4.1: <i>Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der tibialen Knochen- Band- Einheilung der Kontrollstudie der Auto- bzw. Allografts nach 6, 12 bzw. 52 Wochen</i>	56
Tab. 4.2: <i>Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der femoralen Knochen-Band- Einheilung der Kontrollstudie der Auto- bzw. Allografts nach 6, 12 und 52 Wochen</i>	57

1 Einleitung

1.1 Motivation

Die vorrangige Funktion des vorderen Kreuzbandes (VKB) ist die Stabilisierung des Kniegelenks, indem es einer vorderen Translation der Tibia gegenüber dem Femur entgegenwirkt [21, 140, 155]. Daher kann ein insuffizientes VKB zu einer anterioren Subluxation des Kniegelenks und damit zu einer Instabilität desselbigen führen und somit die Funktion des betroffenen Kniegelenks erheblich einschränken [21]. Die zunehmende leistungs- und freizeitsportliche Betätigung der Bevölkerung und der Anspruch an eine Fortführung dieser bis ins hohe Alter hinaus haben dazu geführt, dass Binnenverletzungen des Knies an Häufigkeit zugenommen haben und es damit das am häufigsten verletzte Gelenk des menschlichen Körpers darstellt [60]. In Deutschland liegen die Zahlen bei ca. 20.000 Verletzungen des VKB pro Jahr bis knapp eine Verletzung je 1000 Einwohner [125, 138], während sie im angloamerikanischen Raum zwischen 80.000 und 94.000 liegen [55, 93]. Aktuell wird davon ausgegangen, dass in ungefähr 75 % der Fälle ein operativer Eingriff an der verletzten Bandstruktur vorgenommen wird. Dabei besteht aufgrund der eingeschränkten Heilungspotenz des VKB und der unbefriedigenden Ergebnisse der primären Bandnaht [39] die Indikation für den Einsatz eines Transplantats.

In diesem Zusammenhang sind die Verwendung von Transplantaten allogenen Ursprungs und damit die Nachfrage nach ihnen deutlich angestiegen. Wie oben bereits erwähnt, erfolgt in den Industrieländern jedes Jahr derzeit in ca. 1 Fall pro 1000 Einwohner eine Rekonstruktion des VKB [130]. In knapp einen Drittel dieser Fälle, kommen im angloamerikanischen Raum Allografts zum Einsatz, wobei diese zunehmend als primärer Ersatz bei jungen Patienten bzw. Leistungssportlern Verwendung finden und nicht allein bei Revisionseingriffen und komplexem Knieinnenverletzungen [141]. Zum Vergleich werden in Deutschland in nur ca. 1% der Fälle allogene Transplantate verwendet. Aufgrund der rechtlichen Auflagen, die

u.a. einen kommerziellen Vertrieb von humanen Spendersehnen verbietet, sowie die potentielle Gefahr der Übertragung von bakteriellen und viralen Erregern wie z.B. Hepatitis und HIV durch das eingesetzte Allograft [29, 37, 74, 87, 161] wird die Verfügbarkeit und damit der Einsatz von allogenen Sehnen deutlich eingeschränkt. Durch ein suffizientes Sterilisationsverfahren, welches das Infektionsrisiko minimiert oder vielleicht sogar eliminiert, könnte das Problem der Verfügbarkeit gelöst werden und der Einsatz von Allografts als gleichwertige Alternative zum autologen Bandersatz werden lassen.

Die bisher eingesetzten Sterilisationsverfahren führen jedoch zu Beeinträchtigungen bezüglich der biomechanischen und biologischen Eigenschaften des Transplantats oder bieten keinen ausreichenden Schutz gegenüber bakteriellen und viralen Erregern [29, 37, 74, 87].

Das Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren hat sich als Methode zur Sterilisation knöcherner Allografts bewährt. Negative Auswirkungen auf die biomechanischen und biologischen Eigenschaften ergaben sich nicht [108, 109]. Seit den 80er Jahren existiert trotz fehlender in-vitro bzw. in-vivo- Studien eine Zulassung für die Sterilisation von Achilles- und Patellarsehnen.

Um dies nachzuholen, wurde in unserem Hause eine in-vitro- Analyse durchgeführt, in der nachgewiesen werden konnte, dass die Peressigsäure keinen negativen Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften der hier verwendeten humanen Patellarsehnen zeigt [121]. Auf diesen Ergebnissen baut die von uns durchgeführte experimentelle Studie auf. So sollen die Untersuchungen des Einflusses des Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahrens auf die ossäre Integration des Allografts einem in-vivo- Modell überprüfen, ob dieses Verfahren einen Einsatz bei der Sterilisation von allogenen Transplantaten für den VKB- Ersatz beim Menschen erlaubt.

1.2 Anatomie, biologische Struktur und Funktion des vorderen Kreuzbandes

Das vordere Kreuzband ist eine Bandstruktur des Kniegelenks, welche intraartikulär verlaufend Femur und Tibia miteinander verbindet (s. Abb. 1.1). Das VKB entspringt femoral an der Innenseite des lateralen Condylus und zieht schräg durch die Fossa intercondylaris zur Area intercondylaris, wo es in deren mittleren Anteil inseriert [104]. Dadurch, dass es in seinem gesamten Verlauf zusammen mit dem hinteren Kreuzband (HKB) durch eine Gelenkschleimhautfalte umhüllt wird und damit keinen direkten Kontakt zur Synovia hat, liegt es genau genommen extrasynovial [5, 33, 46].



Abb. 1.1: Anatomische Darstellung des menschlichen Kniegelenks

Das zwischen 31 (+/- 3) mm und 36 (+/- 6) mm lange [82] und in seinem mittleren Anteil 44 mm² (bei Männern) und 36,1 mm² (bei Frauen) im längsovalen Querschnitt messende VKB [4] besteht hauptsächlich aus Typ- I- Kollagenfibrillen, die von Typ- III- Kollagenfasern [105] zu Bündeln zusammengefasst werden. Dabei kann man funktionell zwischen einem anteromedialen und einem posterolateralen Bündel unterscheiden, wobei diese aber kein histomorphologisches Korrelat aufweisen [33, 97]. So ermöglicht die individuelle Regelung der Spannungszustände dieser Funktionseinheiten bei Bewegung des Gelenks [5], dass eine Bandstabilisierung über den gesamten Bewegungsumfang gewährleistet ist [91, 97].

Die Sicherung der Tibia bei der Verschiebung nach vorne ist die Hauptfunktion des VKB [21, 140, 155], wobei dies bei einer Beugung zwischen 20° und 30° am effektivsten erfolgt [89]. So lässt sich aus dieser Stellung heraus die Tibia bei einem insuffizienten VKB um ca. 5 bis 10 mm weiter nach vorn bringen als bei einem intakten VKB [140], was beim Patienten das subjektive Gefühl der Instabilität hervorrufen kann. Des Weiteren limitiert es sekundär die Innenrotation des Unterschenkels bei gebeugtem Knie [56], indem es sich um das HKB wickelt. Dabei limitiert das VKB die anteriore tibiale Translation vor allem unter Einwirkung von Rotationskräften [32]. Dabei gewinnt die Wiederherstellung dieser Funktion bei der VKB- Rekonstruktion zunehmend an Bedeutung, da eine diesbezügliche Insuffizienz zu einer vermehrten anterolateralen Rotationsinstabilität führt [159] und es damit verbunden Hinweise auf die beschleunigte Entwicklung einer Arthrose im Kniegelenk gibt [72]. Ferner wurden Eigenschaften des VKBs beschreiben, welche für die Kinematik des Kniegelenks große mechanische Bedeutung hat [63]. So enthält es an den Insertionsstellen an Femur und Tibia, sowie im subsynovialen Bindegewebe zahlreiche Propiorezeptoren [44, 57, 63], wie Vater- Pacini- und Ruffini- Körperchen, sowie freie Nervenendigungen, die Informationen über die Stellung des Kniegelenks liefern und somit für eine gewisse Stabilisierung sorgen [63], indem sie die Aktivität der stabilisierenden Muskulatur der ischiokruralen Gruppe regulieren [9, 63].

1.3 Knöcherne Insertion

Die Kraftübertragung über das vordere Kreuzband erfolgt über relativ kleine Insertionsflächen an Femur und Tibia. So entspringt es femoral in einer Mulde dorsokranial an der medialen Wange des lateralen Condylus von einer halbkreisförmigen Fläche mit einem Längsdurchmesser von ca. 18 mm und einem Querdurchmesser von ca. 7 mm [33, 46, 77] und inseriert in der Area intercondylaris anterior tibiae, wo es einen eher ovalen, etwas kräftigeren Bandansatz mit einer Größe von 17 mm zu 11 mm von Längs- zu Querdurchmesser bildet [5, 33, 46].

Histologisch gleichen sich beide Insertionsflächen des VKB durch den typischen Vierzonenaufbau (s. Abb. 1.2). Dabei durchlaufen die parallel ausgerichteten Kollagenfasern der freien Bandstruktur (Zone 1) die Zone 2 und die Zone 3, die durch eine Schicht aus unverkalktem bzw. verkalktem Faserknorpel repräsentiert werden, um letztendlich scherengitterartig unmittelbar am lamellären Knochen der 4. Zone zu inserieren [5, 10, 11, 25, 27, 33, 34, 65, 80, 83, 124, 127]. Dabei passt sich letztere den unregelmäßigen Strukturen des Kalkknorpels an, wodurch es zu einer Art Verzahnung dieser beiden Zonen kommt [124]. Das Gesamtbild entspricht dem charakteristischen Aufbau einer direkten Bandinsertion, da die freie Bandstruktur über ihre Kollagenfasern ohne Zwischenschaltung einer bindegewebigen Schicht unmittelbar am anliegenden Knochen ansetzt, die man vor allem dort vorfindet, wo das Verhältnis von übertragener Kraft zu Insertionsfläche relativ groß ist [34, 124]. Neben den Bandansatzstellen des VKB und des HKB, ist diese Form der Knochen-Sehnen-Verbindung beispielhaft an der Tuberositas tibiae oder am Tuberculum majus humeri anzutreffen, wo Patellar- bzw. Supraspinatussehne inserieren. [5, 10, 11, 27, 33, 65, 80, 83, 124, 127].

Die komplexe Strukturierung der direkten Bandinsertion ist fähig, den während einer Bewegung des Kniegelenks entstehenden Zug-, Scher- und Schubkräften standzuhalten [11, 83, 124]. Dabei fungiert der Vierzonenaufbau, durch dessen graduelle Versteifung Zug- und Scherkräfte schrittweise abgeschwächt und damit schließlich neutralisiert werden, als ein dämpfendes Federungssystem [5, 10, 11, 33, 83, 124]. So werden die von den Kollagenfasern geleiteten Kräfte über die Knorpelzellen in der Form umgelenkt, dass das gesamte Insertionsareal als Angriffsfläche dient [10, 83]. Zusätzlich wirkt die Verzahnung des Kalkknorpels und des lamellären Knochens den Schubkräften entgegen [124].

Neben der direkten Bandinsertion existiert auch eine indirekte (s. Abb. 1.3). Sie kommen beispielhaft dort vor, wo Muskeln flächenhaft am Periost ansetzen, also wo in eine Richtung wirkende Zugkräfte auf eine relativ große Fläche eines Knochens übertragen werden (z.B. *Musculus deltoideus* an der Tuberositas deltoideae humeri) [11]. Dabei inserieren die Kollagenfasern in bindegewebigen Fasern einer fibrösen Zwischenschicht, welche wiederum über eine Vielzahl so genannter Sharpeyscher

Fasern in den Knochen einstrahlen. Diese nach ihrem Erstbeschreiber bezeichneten Fasern stellen somit eine indirekte, mittelbare Verknüpfung zur knöchernen Struktur dar [128].

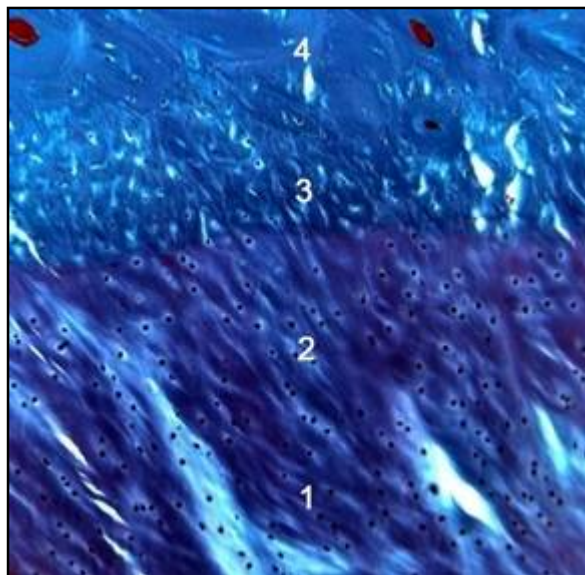


Abb. 1.3: Histologie eines direkten Bandansatzes, hinteres Kreuzband eines Schafes aus der 6-Wochengruppe; Kollagenfasern (1), unverkalkter Faserknorpel (2), Kalkfaserknorpel (3), Lamellenknochen (4), MG

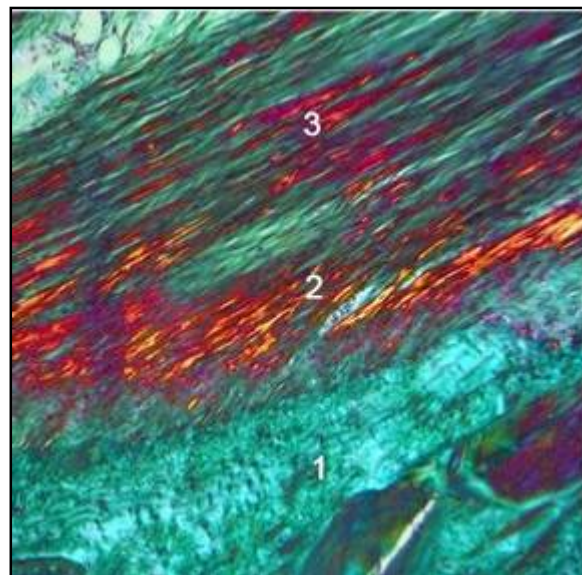


Abb. 1.2: Polymerisationsmikroskopisches Bild eines indirekten Bandansatzes, VKB- Rekonstruktion, Schaf; Lamellenknochen (1), Sharpey-Fasern (2), Kollagenfasern (3)

1.4 Allgemeine Aspekte des vorderen Kreuzbandersatzes

Die zunehmende leistungs- und freizeitsportliche Betätigung der Bevölkerung und der Anspruch an eine Fortführung dieser bis ins hohe Alter hinaus haben dazu geführt, dass Binnenerletzungen des Knies an Häufigkeit zugenommen haben und es damit das am häufigsten verletzte Gelenk des menschlichen Körpers darstellt [60]. In Deutschland schwanken die Zahlen zwischen ca. 20.000 Verletzungen des VKB pro Jahr bis knapp eine Verletzung je 1000 Einwohner [125, 138], während sie im angloamerikanischen Raum zwischen 80.000 und 94.000 liegen [55, 93]. Aktuell wird davon ausgegangen, dass in ungefähr 75 % der Fälle ein operativer Eingriff an der verletzten Bandstruktur vorgenommen wird.

Dabei stehen nicht nur verschiedene Verankerungstechniken, sondern auch diverse Transplantate zur Verfügung. Neben den früher am häufigsten verwendeten Patellarsehnen kommen vor allem zunehmend die Hamstringsehnen (der am Pes anserinus ansetzende Teil der ischiokruralen Muskulatur: Semitendinosus- und Gracilissehnen) sowie in einigen Fällen das zentrale Drittel der Quadrizepssehnen zum Einsatz [31, 151]. Da klinische Studien gezeigt haben, dass die unterschiedlichen Autografts, abhängig von den verschiedenen Fixationstechniken, keine signifikanten Unterschiede bezüglich des postoperativen Verlaufs und der dauerhaften Transplantatstabilität aufweisen [6, 38, 58, 61, 99, 118, 139, 146], gewinnt der Aspekt der Entnahmemorbidität zunehmend an Bedeutung.

So kann es bei der Verwendung von autologen Patellarsehnen zu frühen oder späten Patellafrakturen oder Sehnenrupturen kommen [13, 17, 92]. Weitaus schwerer wiegen aber die viel häufiger vorkommenden und schwer zu behandelnden Probleme des femoropatellären Schmerzsyndroms, wie das Patellaspitzensyndrom, patellofemorale Krepitation, die Patellatendinitis und die infrapatelläre Kontraktur [1, 75, 101, 117], wobei die Angaben zur Häufigkeit (4- 40 %) und Ausmaß der Beschwerden weit auseinander gehen [8, 28, 76, 115]. Zusätzlich kann eine Reduktion der Kraft des Streckapparats über Jahre persistieren [116], wobei das Defizit mit entsprechender Rehabilitation beeinflusst werden kann [130, 131]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass einerseits das Auftreten von Problemen je nach Invasivität der Entnahme gering gehalten werden kann [76], aber andererseits sich die Behandlung dieser schwierig gestaltet.

Die Inzidenz und Intensität der Komplikationen nach der Entnahme der Hamstringsehnen sind geringer. So treten aber auch patellofemorale Schmerzen [28, 40] und solche an der Entnahmestelle auf, wobei letztere aber nur von kurzer Dauer sind [158]. Eine temporäre Reduktion der Beugekraft durch eine Schwächung der ischiokruralen Muskulatur wurde ebenfalls beobachtet, besteht einigen Studien zufolge aber nur für drei bis vier Monate fort [40, 84]. Bei einer kombinierten Entnahme von Semitendinosus- und Gracilissehne kann es hingegen zu einem längerfristig andauernden Defizit bezüglich der Innenrotation des Unterschenkels kommen [144].

Aufgrund des nicht weit verbreiteten Einsatzes der Quadrizepssehne, steht nur eine eingeschränkte Anzahl von Daten über die Entnahmemorbidity zur Verfügung. Jedoch wurden auch hier zum Teil erhebliche Schmerzen, eine Funktionseinschränkung [26] und auch eine Reduktion der Kraft des Quadrizeps beschrieben [22].

Aufgrund dieser aufgeführten Problematik der Entnahmemorbidity, hat der Einsatz von Allografts für den primären Ersatz des VKB zunehmend an Bedeutung gewonnen.

1.5 Knochen- Band- Einheilung

Eine solide knöchernen Integration korreliert mit einer dauerhaften Transplantatstabilität und ist damit eine Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches Ergebnis einer VKB- Rekonstruktion [99, 114, 148]. Idealerweise sollte dabei wieder eine äquivalente Struktur des Bandansatzes vergleichbar mit der nativen Insertionsanatomie des intakten VKB erzielt werden. Dies entspricht einer direkten Bandinsertion mit dem charakteristischen Vierzonenaufbau, der den am Knie wirkenden Kräften optimal entgegenwirkt [5, 10, 11, 25, 27, 33, 34, 65, 80, 83, 124, 127].

Verschiedene Studien beschreiben bei der Einheilung von Weichteiltransplantaten (z.B. Hamstrings oder die in dieser Studie eingesetzte Sehne des Musculus digitorum superficialis) eine fibröse Zwischenschicht, die sich in der frühen Phase entwickelt und durch Sharpey- ähnliche Fasern gekennzeichnet ist [12, 53, 85, 114, 142]. Somit kommt es zunächst zu der Entwicklung einer indirekten Bandinsertion, die durch die parallele Krafteinwirkung im Knochentunnel bedingt ist und in der mechanischen Belastbarkeit herabgesetzt ist [129]. So wird postuliert, dass es möglicherweise einen direkten Einfluss des Verankerungsniveaus auf den Zeitpunkt der Wiederherstellung der direkten Knochen-Band- Insertion auf Gelenkebene gibt, so dass es bei der extraartikulären Fixation zu einer verzögerten Entwicklung einer direkten Bandinsertion kommen kann [53, 114, 142, 148].

1.6 Allografts als Ersatz des vorderen Kreuzbandes

Die oben erwähnten unterschiedlichen Sehnen, die bei der Rekonstruktion des VKB zum Einsatz kommen, kann man aus unterschiedlichen Quellen gewinnen. Dabei unterscheidet man Transplantate autologen Ursprungs von allogenen. Dabei überwiegt die Zahl verwendeter Autografts bei weitem. So waren es 2001 im europäischen Raum rund 99%, während ihr Anteil in den USA ca. 95% betrug. Daraus ergibt sich, dass in Europa nur in 1%, im amerikanischen Raum aber in 5% der Fälle auf allogenes Gewebe zurückgegriffen wird [31]. Die geographische Diskrepanz in den Zahlen hat sich aktuellen Untersuchungen zufolge noch verstärkt. Während die Verwendung von Allografts z.B. in Deutschland nahezu konstant geblieben ist, ist deren Anteil im angloamerikanischen Raum auf 30% gestiegen [141]. Das ist durch die in Europa geringe Anzahl von Gewebebanken an den jeweiligen Operationszentren, sowie deren fehlende Existenz auf kommerzieller Ebene zu erklären (so ist in Deutschland der Vertrieb von „Organteilen“ gesetzlich verboten).

Ein weiterer ausschlaggebender Faktor für den aktuell nur sehr eingeschränkt möglichen Zugang zu allogenen Spendersehnen in Europa sind die rechtlichen Rahmenbedingungen. Der nationale Gesetzgeber in Deutschland sowie die europäische Richtlinie für den Umgang mit humanen Spendersehnen setzt entweder die Sterilisation voraus oder aber, dass die das Gewebe entnehmende Person identisch mit der implantierenden Person ist. Dies ist jedoch dem normal praktizierenden Operateur in der Regel nicht möglich. Da es in Europa keine autorisierten Einrichtungen, wie z.B. die kommerziellen Gewebereinrichtungen in den USA, gibt, die sowohl logistisch als auch rechtlich für die adäquate Gewinnung und Prozessierung von Gewebe verantwortlich sind, besteht nur eine sehr eingeschränkte Verwendung von Spendergewebe in Europa.

Der Einsatz synthetischer Bandersatzmaterialien, wie Gore- Tex, Kohlefasern, Dacron und dem Leeds-Keio Band, ist heutzutage nur sehr speziellen Einzelfällen vorbehalten, da Studien eine hohe frühzeitige Versagerquote aufgezeigt haben [30,

45, 47, 88, 100, 112]. Die Abriebpartikel dieser Bänder führten teilweise zu erheblichen synovialen Fremdkörperreaktion mit daraus resultierenden Rupturen [23, 36, 71, 79].

In der historischen Entwicklung wurden die Allograft zunächst nur bei Rekonstruktionen komplexer Knieinstabilitäten und bei Revisionseingriffen eingesetzt [96], da hier im Sinne eines Kompromisses die eventuellen Nachteile bei der Entscheidung für den Einsatz vernachlässigt wurden [145]. Denn es wird davon ausgegangen, dass der Prozess des Remodelings verzögert abläuft und möglicherweise daraus eine etwas höhere Rerupturrate resultiert. So konnten tierexperimentelle Studien nachweisen, dass Allografts vergleichbar mit autologen Transplantaten eine biologische Integration zeigen, die jedoch zeitlich verzögert abläuft [69, 122], und keine überschießende Fremdkörperreaktion verursachen [67, 95]. Weiterhin bringt deren Einsatz auch einige Vorteile mit sich. So verkürzt es nicht nur die Operationsdauer, sondern auch die Rehabilitationszeit [7] da die Invasivität des Eingriffs reduziert wird bzw. der Beuge- und Streckapparat unverletzt bleibt. Dies beinhaltet zudem ein besseres kosmetisches Ergebnis. Ein weiteres Plus ist, dass die Spendersehne fast beliebig dimensioniert werden kann. Außerdem tritt das ansonsten bedeutende und oben beschriebene Problem der Transplantatentnahmemorbidität in den Hintergrund (s. 1.4). Dies ist neben den guten bis sehr guten Erfahrungen bei Revisionseingriffen der entscheidende Faktor, weswegen der Einsatz von Allografts zunehmend auch für den primären Ersatz des VKB interessant erscheint, zumal die Berichte über klinische Ergebnisse dieser Verwendung vielversprechend und vergleichbar mit dem Einsatz von autologen Transplantaten sind [7, 102, 107, 132].

Dabei muss man festhalten, dass man zwischen den „verschiedenen“ Allografts differenzieren muss und das „typische“ Allograft nicht existiert. Prinzipiell unterscheidet man nicht sterilisierte („fresh-frozen“, kryopreserviert, gefriergetrocknet) von sterilisierten allogenen Transplantaten. Dabei stellt zurzeit die Verwendung der „fresh-frozen“- Präparate den sogenannten Goldstandard auf der Ebene der Allografts dar, da sie in Anbetracht der aktuellen Studienlage im Vergleich zu den autologen Transplantaten die geringsten Nachteile aufweisen [122].

Da zurzeit keine suffiziente Sterilisationsmethode für die Behandlung von Sehnentransplantaten existiert, werden vornehmlich „fresh frozen“, also unbehandelt tiefgefrorene (-80° C), oder kryopreserviert Allografts verwendet. Dies birgt die Gefahr, dass eventuell bestandene Infektionskrankheiten des Spenders auf den Empfänger übertragen werden können, was unter anderem auch auf das Überleben des Tiefkühlprozesses von HI- Viren zutrifft. Ende der 80er Jahre beziffern Studien das Risiko einer Übertragung der Immunschwächekrankheit bei Knochenallografts mit ca. 1: 600.000 [8, 19]. Die im Rahmen des üblichen Screenings bei Multiorganentnahmen durchgeführten Untersuchungen auf infektiöse Viruserkrankungen konnten dieses zwar weiter reduzieren, dennoch besteht weiterhin ein nicht unerhebliches Risiko beispielsweise für eine Infektion durch HIV, HTLV, HBV oder HCV [161]. Die im Jahre 2002 eingeführte veränderte Gesetzgebung für Gewebebanken in Deutschland, die einen direkten negativen Virusnachweis im Gewebe selbst fordert (z.B. mittels PCR), führt zwar zu mehr Sicherheit, bedingt aber andererseits einen hohen logistischen und ökonomischen Aufwand und damit eine drastische Verschlechterung der Versorgungssituation mit Allografts. Hinzu kommt, dass bei der Verwendung von unbehandelten Transplantaten ein vermehrtes Auftreten von Komplikationen im Sinne von bakteriellen Infektionen mit zum Teil fatalen Folgen beobachtet wurden [29, 37, 74, 87].

Dies alles verdeutlicht die Notwendigkeit eines suffizienten Sterilisationsverfahrens, um die Verfügbarkeit von Allografts zu verbessern bzw. sicherzustellen und ein höchstmögliches Maß an Sicherheit bei deren Verwendung zu gewährleisten. Das Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren könnte in diesem Rahmen zu erheblichen Fortschritten führen, was die Bedeutung dieser Studie hervorhebt.

1.7 Sterilisationsverfahren

Neben der reinen Konservierung von allogenen Sehnen- und Bandtransplantaten durch Tiefkühlung oder Gefriertrocknung existieren diverse Verfahren, die eine Kontamination des Allografts selbst oder eine Infektion durch das zu transplantierende Gewebe verhindern sollen. Dabei bieten antiseptische oder antibiotische Lösungen aufgrund ihrer mangelnden Penetrationsfähigkeit nur einen Schutz gegen oberflächliche Verunreinigungen. Deswegen nehmen die Sterilisation mit γ -Strahlen und die chemische Behandlung mit Ethylenoxid eine herausragende Bedeutung ein, wobei von letzterer aufgrund ihrer karzinogenen und mutagenen Eigenschaften schon früh Abstand genommen wurde [20], zumal zusätzlich weitere Entzündungs- und Immunreaktionen beobachtet wurden [68, 113, 134]. Neben der Problematik der bei der γ -Strahlung in der Literatur empfohlenen verschiedenen Bestrahlungsdosen, die von 15 bis 40 kGy reichen [18, 119], ist die Entstehung von toxischen Radikalen [98] und die negative Beeinflussung biomechanischer Eigenschaften [18, 41, 42] relevant.

Aufgrund dessen ergibt sich zwangsläufig die Notwendigkeit, ein alternatives Sterilisationsverfahren zu finden, um den Einsatz von allogenen Kreuzbandtransplantaten sicher zu gestalten und die Vorgaben des Transplantationsgesetzes umzusetzen. Durch die Gewebekbank des Instituts für Transfusionsmedizin an der Charité ist das so genannte Peressigsäure- Ethanol-Unterdruck- Verfahren zur Sterilisation von allogem Knochengewebe entwickelt worden, das einen adäquaten antiviralen und antibakteriellen Schutz erzielt [109]. In diesem Bereich wird es bereits seit über zwanzig Jahren erfolgreich eingesetzt [108]. Des Weiteren konnte in darauf folgenden mikrobiologischen Studien eine Eignung dieses Verfahrens für die Behandlung von Sehngewebe gezeigt werden [86, 121, 137]. Jedoch existieren bis dato keine Studien, die dessen Effekte auf die Biomechanik, das Transplantatremodeling und die Knochen- Band- Einheilung nach VKB- Rekonstruktion mit einem Allograft in einem in- vivo- Modell beschreiben. Dies ist aber zwingende Voraussetzung, um einen sicheren Einsatz beim Menschen zu gewährleisten.

1.8 Fragestellung und Ziel der Studie

In dieser Studie soll die Knochen- Band- Einheilung eines freien, mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren behandelten Sehnen transplantates des Musculus digitorum superficialis als vordere Kreuzbandplastik im Schafsmodell während der frühen Einheilungsphase untersucht werden.

Dabei wurde die identische Verankerungstechnik, femoral per Fixationsbutton und tibial mittels Knochenbrücke, wie in einer vorangegangenen Studie gewählt, in der der Kreuzbandersatz mit nicht-sterilisierter allogener und autologer Sehne verglichen wurden [123]. Diese Daten wurden als Kontrollgruppen zu der Studiengruppe dieser Untersuchung herangezogen. So war es erstmals möglich, den Einfluss des Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahrens auf die biologischen Ein- und Umbauvorgänge eines Allografts als VKB- Ersatz in einem in- vivo- Modell zu untersuchen und zu beurteilen.

Somit war es Ziel dieser Studie folgende Fragestellung zu beantworten:

Welchen Einfluss hat die Sterilisation eines freien Sehnen transplantats mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren auf die Knochen- Band- Einheilung nach einer VKB- Rekonstruktion?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Für diese Studie wurden 18 ausgewachsene Schafe weiblichen Geschlechts im Alter zwischen zwei und drei Jahren der Rasse Merino ausgewählt, bei denen am Kniegelenk des linken Hinterlaufs ein offener Ersatz des vorderen Kreuzbandes vorgenommen wurde. Es wurden 2 Standzeiten bzw. Gruppen von 6 und 12 Wochen festgelegt. Dies entspricht also einer Gruppengröße von 9 Versuchstieren pro Gruppe und Standzeit. Als Transplantat diente ein mit Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren behandeltes Allograft des Musculus digitorum superficialis, welcher der Achillessehne entspricht (s. Abb. 2.1).

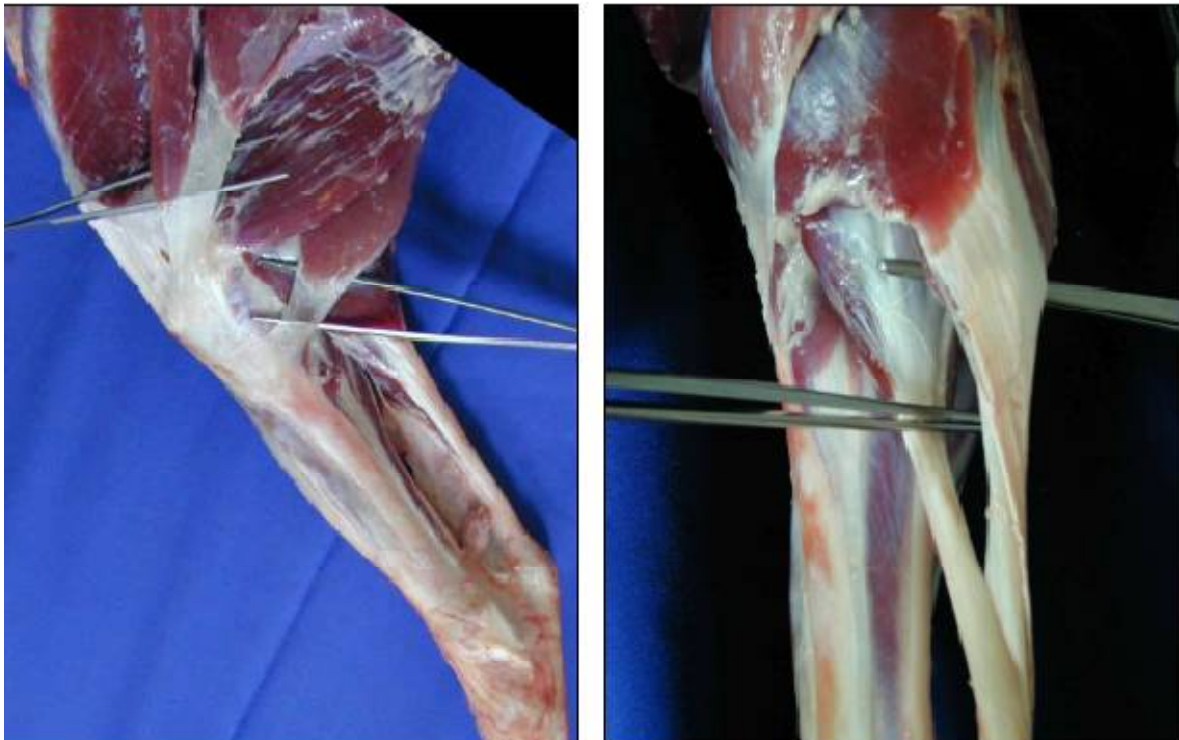


Abb. 2.1: Links: mediale Ansicht eines Schafkniees. Über der oberen Pinzette liegt die Sehne des M. gracilis auf, darunter befindet sich der M. semimembranosus und über der unteren Pinzette stellt sich die Sehne des M. semitendinosus dar. Rechts: plantare Ansicht auf die Sehne des M. gastrocnemius (über der oberen Pinzette) und die Sehne des M. flexor digitorum superficialis (unter der unteren Pinzette) [64]

Da diese Sehne leicht zu gewinnen und die Entnahme von den Tieren gut toleriert wird, wurde sie gegenüber der Semintendinosussehne bevorzugt, da letztere eher als eine faszienähnliche Struktur erscheint [148, 152].

Das Transplantat wurde femoral per Fixationsbutton und tibial mittels Knochenbrücke auf Höhe des Gelenkspalts fixiert. Postoperativ wurden nach standardisierten Protokollen in- vivo- Fluoreszenzmarkierungen vorgenommen. Nach der Explantation erfolgte die biomechanische Testung der VKB- Rekonstruktion. Abschließend wurden die hier vorgestellten histologischen Untersuchungen vorgenommen.

Durch diesen Versuchsaufbau war es möglich, den Verlauf der Knochen- Sehnen- Heilung auf biomechanischer und histologischer Ebene zeitgleich zu untersuchen. Zusätzlich wurden Untersuchungen zum intraartikulären Transplantatremodeling und zur Rollenverteilung der Wachstumsfaktoren durchgeführt. Die Studie wurde von dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (Genehmigungsnummer: G0029/04) am 11.03.2004 genehmigt. Jedes Versuchstier wurde vor dem operativen Eingriff hinsichtlich seiner körperlichen Tauglichkeit untersucht und war während des gesamten Versuchszeitraumes in tierärztlicher und - pflegerischer Behandlung der tierexperimentellen Abteilung der Charité, Campus Virchow- Klinikum. Alle operativen Eingriffe wurden von demselben Operateur vorgenommen.

2.2 Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren

Nach Entnahme der Allografts werden diese bei -18°C zwischenkonserviert. Die Transplantate werden dann zunächst von allen Blutrückständen mittels sterilen, 37°C warmen Wassers befreit, indem sie unter hohem Druck für 30 Minuten gespült werden. Anschließend erfolgt die Entfettung der Präparate. Dabei werden diese in einer Lösung aus konzentriertem Chloroform (99,4%) und Methanol (99,8%) im Verhältnis 2 zu 1 verbracht, in der sie unter konstanten Schüttelbewegungen (Schüttelvorrichtung THYS 2, MLW, Leipzig) für zwei Stunden verweilen. Das

Gemisch wird hierbei alle 30 Minuten erneuert. Um das anhaftende Chloroform vollständig zu entfernen, werden die Gewebe mit Methanol in einem Ultraschallbad (Sonorex RK 510 H, Bandelin Electronic, Berlin) für 15 Minuten behandelt. Diese Prozedur wird achtmal wiederholt. Unter zweimaliger gründlicher Spülung mit deionisiertem Wasser werden die Transplantate vom Methanol befreit. Der eigentliche Vorgang der Sterilisation wird ebenfalls unter konstanten Schüttelbewegungen (Schüttelvorrichtung THYS 2, MLW, Leipzig) bei Raumtemperatur bei einem Unterdruck von 200 mbar durchgeführt. Dabei werden nun die fettfreien Präparate für 2 Stunden mit einer 1%igen Sterilisationslösung bedeckt, welche aus 2%iger Peressigsäure (Kesla-Chemie, Wolfen, s. Abb. 2.2), 96%igem Ethanol (Merck, Darmstadt), Aqua ad injectabile (Ampuwa; Fresenius, Bad Homburg) in einem Mischungsverhältnis von 2 zu 1 zu 1 besteht.

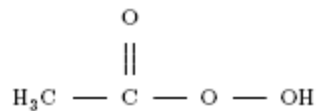


Abb. 2.2: Chemische Formel der Peressigsäure

Abschließend wird das Transplantat mit Sörensen- Puffer gespült, um einen Rückstand von PES von unter 1 ppm zu erreichen. Aufgrund der Spülung und des schnellen Zerfalls der PES in Essigsäure und Wasserstoffperoxid nach Kontakt mit Fremdoberflächen, ist sie bereits nach 60 Minuten nach Sterilisation nicht mehr im Gewebe nachweisbar. Dies konnte anhand des Reflectoquant- Peressigsäure- Test gezeigt werden, der von der Gewebekbank der Charité routinemäßig bei jedem sterilisierten Transplantat durchgeführt wird. Bei diesem Test reagiert die Peressigsäure mit einem aromatischen Amin zu einem blauen Farbstoff, dessen Konzentration gemessen wird und damit der Rückstand der Peressigsäure im Gewebe bestimmt werden kann. Nach Trocknung und Verpackung unter sterilen Bedingungen wird das Transplantat bis zur Verwendung bei -18°C aufbewahrt.

Diese Methode, welches von der Gewebekbank des Instituts für Transfusionsmedizin an der Charité für die Sterilisation von allogenen Knochengewebe entwickelt worden ist, bietet einen adäquaten Schutz gegen Viren, Bakterien und Pilze, ohne die

mechanischen Eigenschaften der Transplantate zu beeinflussen [109]. Die Eignung dieses Verfahrens zur Behandlung von Sehngewebe konnte in mikrobiologischen Studien nachgewiesen werden [137]. So ergab dann auch eine in- vitro- Testung von Patellarsehnentransplantaten, die mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck-Verfahren behandelt wurden, keine negativen Auswirkungen auf deren biomechanischen Eigenschaften [121].

2.3 Auswahl des Tiermodels und der Standzeiten

Das Schaf ist ein in der traumatologischen und orthopädischen Forschung bewährtes Versuchstier und wurde unter anderem deswegen auch für diese Studie herangezogen [2, 3, 14-16, 50-52, 64, 110, 111, 126, 148, 149]. Die Anatomie des Kniegelenks entspricht weitestgehend der des Menschen und die sich zudem ergebene realistische Belastungssituation bietet ideale Voraussetzungen für die experimentelle Kreuzbandchirurgie. Daraus ergibt sich auch eine hohe Anzahl von histologischen und biomechanischen Daten anderer Arbeitsgruppen zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes, der den Vergleich dieser Studie mit anderen erst ermöglicht [64].

Die Versuchstiere, deren durchschnittliches Gewicht 72 kg betrug, wurden von einem lizenzierten Schafszüchter bezogen, wobei strikt darauf geachtet wurde, dass die Schafe ausgewachsen waren, welches im Mittel im Alter von 2 bis 3 Jahren der Fall ist. So konnte vermieden werden, beim Anlegen der Bohrkanäle zur Transplantatverankerung mögliche noch aktive Wachstumsfugen zu beschädigen. Denn die daraus resultierenden Wachstumsstörungen hätten die Daten und Ergebnisse dieser Studie in unkalkulierbarer Weise beeinflussen können.

Eine Gruppengröße von $n = 9$ hat sich aufgrund von Erfahrungswerten aus vorangegangenen Studien bezüglich der statistischen Relevanz der Untersuchungen bewährt. Die Wahl der Standzeiten beruht ebenfalls auf diesen Studien der jüngeren

Vergangenheit. Daher ist nämlich bekannt, dass nach ca. 6 Wochen ein Maximum der Umbaugänge und nach 8 bis 12 Wochen die Ausbildung einer neuen Knochen-Band- Insertion zu beobachten sind [147, 148].

2.4 Tierhaltung

Während des Versuchszeitraumes wurden die Schafe größtenteils auf einem Außengelände der Charité in einem Stall gehalten, wo sie freie Auslaufmöglichkeit hatten. Lediglich für den operativen Eingriff wurden sie per Tiertransporter in die tierexperimentelle Einrichtung der Charité auf dem Campus Virchow- Klinikum verlegt, wo ein Stall von knapp 15 m² Größe zur Verfügung stand. Zur Beurteilung des unmittelbar postoperativen Verlaufs wurden die Tiere dort für 14 Tage intensiv beobachtet und täglich klinisch untersucht, bevor sie letztendlich wieder zur Außenstelle zurücktransportiert wurden. Somit war die Möglichkeit der freien Bewegung der Schafe bei voller Belastung zu jedem Zeitpunkt dieser Studie gegeben.

2.5 Operatives Vorgehen

Nachdem das Tier von der restlichen Gruppe isoliert und aus dem Stall gebracht war, wurde die Narkose mit der intravenösen Gabe von Thiopental (Trapanal®, Byk Gulden GmbH, 78467 Konstanz) und Fentanylhydrogencitrat (Fentanyl Curamed®, Curamed Pharma GmbH, 76202 Karlsruhe) eingeleitet und nach erfolgreicher Intubation mit einem Inhalationsgemisch aus Isofluran (Forene®, Abott GmbH, 65011 Wiesbaden), Stickoxydul und Sauerstoff aufrechterhalten. Das intraoperative Narkosemonitoring erfolgte nach Standardbedingungen. Zur perioperativen antibiotischen Prophylaxe wurde intravenös einmalig Amoxicillin-Clavulansäure 2,2 g (Augmentan®, Smith Kline Beecham Pharma GmbH, 80804 München) verabreicht.

Die Operationen verliefen nach den standardisierten Methoden des sterilen Vorgehens. So wurde nach Abwaschen und sterilem Abdecken des Hinterlaufs der linken Seite zunächst die Sehne des Musculus digitorum superficialis gewonnen. Dabei wurde der longitudinale Hautschnitt kurz oberhalb der Achillessehne gesetzt. Nach anschließender Blutstillung wurde sich durch die bindegewebigen Verschiebeschichten präpariert, bis die Sehne des Musculus digitorum longus freigelegt wurde, die die Achillessehne mantelförmig umhüllt. Deswegen musste diese dünne Flexorensehne der Länge nach durchtrennt werden, um im Folgenden das eigentliche Transplantat mittels zwei Overhold- Zangen zu mobilisieren und auf einer Länge von 7,5 cm zur Hälfte scharf herauszutrennen. Die Wunde wurde dann schichtweise mit Vicryl® 3/0 und Ethilon II® 3/0 wieder verschlossen. Das entnommene Transplantat wurde verpackt und an die Gewebebank der Charité zur Behandlung mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren versandt.



Abb. 2.3: Allograft

Anschließend wurde mittels anteromedialen Hautschnitt und Durchtrennung des Retinaculum patellae das linke Kniegelenk eröffnet. So konnte dann die Patella nach lateral luxiert und der Hoffasche Fettkörper scharf durchtrennt werden. In Folge wurde die Plica synovialis und das vordere Kreuzband entfernt, wobei die vom verbliebenen Bindegewebe bedeckten Insertionsstellen freigelegt wurden. Dabei wurden das Ligamentum transversum genus und das hintere Kreuzband komplett erhalten.

Orientierend an den Insertionsstellen des nativen Kreuzbandes wurde in 90° Flexion mittels Bohrer zunächst der tibiale Tunnel von innen nach außen angelegt, wobei die

Länge bzw. der Durchmesser je nach Transplantatgröße zwischen 20 bis 35 mm bzw. 6 bis 9 mm lag. Anschließend wurde mit dem femoralen Tunnel analog verfahren, wobei die Bohrung in maximaler Beugung des Kniegelenks vorgenommen wurde. Nun wurde ein weiteres, bereits mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck-Verfahren behandelte und inzwischen aufgetaute Allograft an beiden Enden mit einer 1,5- fachen Kirchheim- Kessler Sehnennaht versehen, um die ein Haltefaden aus Vicryl CT® 1/0 geschlungen wurde (s. Abb. 2.3). Über letzteres wurde das Transplantat dann unter Zuhilfenahme eines Ösendrahtes in die jeweiligen Bohrkanäle eingezogen. Femoral wurde die Sehne per Fixationsbutton extrakortikal, tibial mittels Knochenbrücke fixiert (s. Abb. 2.4).

Anschließend wurde das Knie mehrere Male durchbewegt, um ein eventuelles Transplantat- Impingement frühzeitig zu erkennen. Danach wurden der eröffnete Hoffasche Fettkörper und das durchtrennte Retinaculum patellae adaptiert und die Wunde verschlossen.

Abschließend wurde noch ein steriler Wundverband angelegt und das operierte Tier in den Stall der Einrichtung zurückgebracht. Eine Analgesie wurde mittels eines Fentanyl- Pflasters durchgeführt, welches bis zum dritten postoperativen Tag belassen wurde. Ein Verbandswechsel erfolgte jeden zweiten Tag bis die Wunden trocken und geschlossen waren, wobei die Fäden bis zum 10. bis 14. postoperativen Tag belassen wurden.

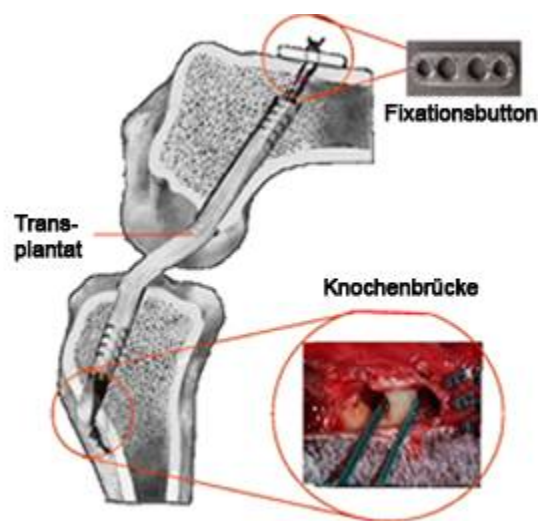


Abb. 2.4: Darstellung der extraartikulären Transplantatfixierung [148]

2.6 Polychrome Sequenzmarkierung

Um über den zeitlichen Ablauf und die Lokalisation des Knochenumbaus Aussagen treffen zu können, wurde den Versuchstieren zu definierten Studienzeitpunkten so genannte Fluorochrome appliziert. Diesen Prozess nennt man polychrome Sequenzmarkierung. Dabei macht man sich die Eigenschaft fluoreszierenden Substanzen zunutze, sich an die Mineralsalze biologisch aktiven Knochens zu binden.

Als Fluorochrome wurden Calcein- Grün, Xylenol- Orange (beide Sigma Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen) und Tetracyclin (Supramycin® pro infusione, Grünenthal GmbH, 52220 Stolberg). Hergestellt wurden die Injektionslösungen nach einer Empfehlung des AO- Forschungsinstituts Davos (s. Tab. 2.1).

Substanz	Lösung	Konzentration
Calcein- Grün	1 g in 100 ml Aqua dest.	10 mg/ ml
Xylenol- Orange	9 g in 100 ml Aqua dest.	90 mg/ ml
Tetracyclin	2,5 g in 100 ml Aqua ad Injectabile	25 mg/ ml

Tab. 2.1: Empfehlung des AO- Forschungsinstituts Davos zur Herstellung von Injektionslösungen zur polychromen Sequenzmarkierung

Die Lösungen von Calcein- Grün und Xylenol- Orange, welche zuvor mittels Sterilfiltration sterilisiert wurden, konnten problemlos subkutan appliziert werden, während Tetracyclin intravenös verabreicht werden musste. Die injizierte Menge richtete sich nach dem jeweiligen Gewicht des Versuchstieres, welches unmittelbar zuvor ermittelt wurde. Dabei galten für die verwendeten Substanzen folgende Vorgaben: Calcein- Grün 10 mg/ kg KG, Xylenol- Orange 90 mg/ kg KG und Tetracyclin 25 mg/ kg KG.

Die beiden Versuchsgruppen wurden zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten markiert, so dass eine kontinuierliche Fluoreszenzmarkierung und damit eine Beurteilung des knöchernen Umbaus über den gesamten Versuchszeitraum möglich waren (s. Tab. 2.2).

Gruppe	Calcein- Grün	Xylenol- Orange	Tetracyclin
6- Wochengruppe	1. Woche postoperativ	3. Woche postoperativ	5. Woche postoperativ
12- Wochengruppe	7. Woche postoperativ	9. Woche postoperativ	11. Woche postoperativ

Tab. 2.2: Zeitplan der polychromen Sequenzmarkierung

2.7 Biomechanische Testung

Die Euthanasie der Tiere erfolgte unter einer Narkose mit Thiopental und Pancuroniumbromid 0,2 mg/ kg KG mit einer Überdosis von Kaliumchlorid (Kaliumchlorid 7,45% Braun®, Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen). Der linke Hinterlauf wurde explantiert und in Kompressen eingeschlagen, die mit physiologischer Kochsalzlösung getränkt waren, und anschließend zur biomechanischen Testung gebracht, wo zunächst das Kniegelenk bis auf den Kapselbandapparat freipräpariert wurde. In Folge wurde es dann in neutraler Rotation und 90° Beugung in die Testmaschine (Zwick 1455, Zwick GmbH, Ulm) eingespannt. Dann wurden jeweils drei vordere und drei hintere Schublidentests absolviert, wobei die Belastung 50 N und der Versatz 1 mm/s betrug. Dieser Vorgang wurde dann am isolierten vorderen Kreuzbandersatz wiederholt, nachdem sämtliche Binnenstrukturen des Kniegelenks entfernt worden waren. Schlussendlich wurde ein Versagenstest bei neutraler Rotation und 60° Flexion des Gelenks mit einer Versatzgeschwindigkeit von ebenfalls 1 mm/s durchgeführt, um den Kraftwert zu ermitteln, der zum Versagen der Rekonstruktion führte. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind Bestandteil der Dissertation von Johannes Gonnermann.

2.8 Anfertigung der histologischen Präparate

Im Anschluss an die biomechanischen Untersuchungen wurden die restlichen Weichteile von Femur und Tibia entfernt und anschließend für die nächsten vier Wochen in eine gepufferte Fixierlösung gelegt (s. Tab. 2.3).

Die fixierten Gelenkköpfe wurden in das EXAKT®- Trennschleifsystem Makro (EXAKT- Apparatebau GmbH, Norderstedt) eingespannt und entsprechend justiert, so dass eine Sägeebene getroffen wurde, bei der Bohrkanal in vollem Ausmaß sichtbar wurde. Dabei orientierte man sich an den intraartikulären Austrittsstellen des verbliebenen Transplantats und an der extrakortikalen Verankerung des distalen Femur bzw. der Knochenbrücke an der proximalen Tibia und korrigierte die Einstellung, wenn es nötig war.

Substanz	Menge
Formaldehyd 36%	124 ml
Methylalkohol 100%	540 ml
Barbital- Natrium Puffer pH 7,4/ 0,1 molar	130 ml
Glukose	6g

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Fixierlösung

Sobald der Bohrkanal in voller Länge zu erkennen war, wurden 3 bis 4 mm dicke Knochenscheiben aus den Gelenkköpfen herausgesägt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (s. Tab. 2.4).

Ethylalkoholgehalt	Dauer
70%	3 Tage
80%	3 Tage
96%	2x 3 Tage
100%	3x 3 Tage

Tab. 2.4: Entwässerungsschema der Knochenscheiben

Anschließend wurden diese unentkalkt mit Technovit® (Heraeus Kulzer GmbH, 61273 Wehrheim) infiltriert. Dies ist ein Kunststoffpolymer aus Polymethylmetacrylat. Nach Auswaschen in Xylol wurden sie für 3 Stunden in eine Präinfiltrationslösung aus 200 ml entstabilisierter Technovit 9100 Basislösung und 1 g „Härter 1“ eingelegt. Danach wurden die Knochenscheiben zweimal hintereinander für jeweils 7 Tage in 250 ml Technovit Infiltrationslösung gelegt. Die Infiltrationslösung wurde aus entstabilisierter Basislösung und 20 g Pulver 2 und 1 g „Härter 1“ hergestellt, wobei zuerst das Pulver vollständig in der Basislösung gelöst werden musste. Die Präinfiltration erfolgte bei Raumtemperatur, die Infiltration im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4° C.

Für die Kunststoffeinbettung wurde ein Polymerisationsgemisch gefertigt, welches innerhalb von 24 Stunden auspolymerisierte. Das Polymerisationsgemisch bestand zu 9 Volumenanteilen aus Stammlösung A und einem Volumenanteil Stammlösung B. Zur Herstellung der Stammlösung A wurden 80 g Pulver 2 in entstabilisierter Basislösung vollständig gelöst. Danach wurden 3 g „Härter 1“ hinzugefügt. Die Lösungsmenge ergab am Ende 500 ml. Zur Herstellung der Stammlösung B wurden 44 ml entstabilisierte Basislösung mit 4 ml „Härter 2“ und 2 ml „Regler 5“ vermischt. Die Knochenscheiben wurden mit der Schnittseite nach unten in Kunststoffformen gelegt und in dem Polymerisationsgemisch eingebettet. Dann wurden Sie luftdicht verschlossen und zum Aushärten bis auf 0-6° C gekühlt. Nach dem Aushärten wurden die Kunststoffblöcke aus den Formen gelöst und beschriftet.

Auf eine säureentkalkte Knochenhistologie wurde bewusst verzichtet, um ein Herauslösen der gebundenen Fluorochrome zu verhindern und eine Beurteilung der Mineralisationsvorgänge zu ermöglichen.

Die in dem Polymethylacrylat eingebetteten Schnittpräparate wurden ins Leica® SM 2500 Hartschnittmikrotom (Leica GmbH, 61400 Bensheim) eingespannt und Seriidünnschnitte von 6 µm Dicke hergestellt. Diese wurden auf einen Glasobjektträger gebracht, mit Streckflüssigkeit aus 30 ml Butoxyethyl- Acetat und 70 ml 70%igem Alkohol beträufelt. Anschließend wurden sie mit Kisolfolie bedeckt, mit

einem Pinsel behutsam geglättet und dann unter dem Druck einer Schnittpresse bei 37°C im Brutschrank über 24 Stunden getrocknet.

Um die diversen Gewebestrukturen gesondert hervorzuheben, wurden die Schnitte nach drei unterschiedlichen Methoden gefärbt. Die Masson-Goldner-Färbung (MG) ist eine Übersichtsfärbung und dient dem Nachweis von kollagenem Bindegewebe. Die Zellkerne färben sich bräunlich-schwarz an, das Zytoplasma ziegelrot, Bindegewebe grün, Erythrozyten orangegelb und Osteoid rot. Mineralisiertes Knochengewebe stellt sich leuchtend grün dar, unverkalktes Knochengewebe hellgrün.

Die kombinierte Safranin- O- von- Kossa- Färbung (SOvK) dient der Abgrenzung von mineralisiertem Knochen und Knorpelgewebe gegenüber nichtmineralisiertem Knochen. Mineralisiertes Gewebe stellt sich in dieser Färbung schwarz dar, während sich die nichtmineralisierten Bereiche leuchtend rot darstellen.

Die Alcianblau- Färbung (AC) dient der Darstellung saurer Mukopolysaccharide und der Darstellung der Kalkknorpelgrenze. Die Mukopolysaccharide stellen sich lila dar und die sauren Mukopolysaccharide leuchtend blau. Die Zellkerne werden rot angefärbt, Knochen lila und Kalkknorpel leuchtend blau.

Von den Kunststoffblöcken, die zum Schliff vorgesehen waren, wurde nach der von Donath beschriebenen Methode Knochendünnschliffe hergestellt [35]. Zunächst wurden die auspolymerisierten Präparate mit der nicht zu untersuchenden Oberfläche mit Technovit® 4000 auf einen Kunststoffobjektträger mit einer EXAKT-Vakuum- Klebevorrichtung (EXAKT, Apparatebau GmbH, Norderstedt) aufgeblockt. In der Vakuumvorrichtung eines EXAKT- Mikro- Schleifsystems wurde anschließend die zu untersuchende Seite des Präparats eingespannt und mit einem 4000er Schleifpapier planparallel freigelegt, um daraufhin den transparenten Technovit® 7100 Präzisionskleber aufzutragen. Dann wurde ein weiterer Objektträger aufgebracht und der Kleber blasenfrei unter der EXAKT- Vakuum-Klebevorrichtung photopolymerisiert. Das lichtdurchlässige sich auf dem Objektträger befindliche

Präparat wurde nach Aushärtung des erhaltenen „Sandwichs“ mit dem EXAKT-Trennschleifsystem Makro abgetrennt, um anschließend erneut in das EXAKT-Mikroschleifsystem eingespannt zu werden. Dort wurde es unter Mikrometerkontrolle mittels 1000- 4000er Schleifpapier und abschließendem Polieren auf eine Stärke von 80 bis 100 µm gebracht. Diese Dünnschliffpräparate wurden ungefärbt fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.9 Histologische Auswertung

Für die histologische Auswertung wurden die Methoden der konventionellen Durchlichtmikroskopie, der Polarisations- und Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Dafür wurde stets auf ein Leica DMRB Mikroskop (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, 35530 Wetzlar) zurückgegriffen. Während bei der herkömmlichen Durchlichtmikroskopie Objektive mit 1,6-, 2,5-, 5-, 10-, 20- und 40- facher Vergrößerung zum Einsatz kamen, wurden bei der Polarisationsmikroskopie nur mit maximal 20- facher Vergrößerung gearbeitet, da durch die zwei zusätzlich dazwischengeschalteten Polarisationsfilter mehr Licht absorbiert wurde. Zur Dokumentation der histologischen Befunde kamen ein Leitz Orthomat E System Wild und ein digitales Bildanalyse-System zur Anwendung.

Die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der verschiedenen Gewebearten machen den Einsatz von Farbstoffen möglich, die bei simultaner und sukzedaner Anwendung eine Differenzierung dieser Gewebearten erlauben. Dadurch lassen sich bei der Durchlichtmikroskopie Aussagen über die feingewebliche Zusammensetzung von Schnittpräparaten treffen.

Dabei lässt die modifizierte Masson- Goldner- Trichrom- Färbung, die als Übersichtsfärbung fungierte, eine Beurteilung bindegewebiger und knöcherner Strukturen zu. Die Safranin-O- von- Kossa- Färbung diente der Bewertung von mineralisierten, die Alcianblau- Färbung von knorpeligen Strukturen. In Übersichts-

vergrößerungen wurde zunächst durch einen Quervergleich der drei Präparatfärbungen Aussagen über den feingeweblichen Aufbau getroffen und eine gewebliche Zuordnung der Strukturen vorgenommen. Dabei wurden sowohl das Ausmaß als auch die Lokalisation bewertet, um sie anschließend in höheren Auflösungen auf zellulärer Ebene zu beurteilen. Zusammenfassend war es möglich, anhand dieser Analyse den Stand des Einheilungsprozesses nach sechs bzw. zwölf Wochen zu bestimmen.

Die Polarisationsmikroskopie ist eine Methode, um über die Ordnung von Molekülverbänden zu urteilen. Eine in den Lichtgang eingebrachte Folie, auch Polarisator genannt, zerlegt das von einer Lichtquelle ausgesendete diffuse, in allen Achsen schwingende Licht in einen außerordentlichen, d.h. nur in einer definierten Achse schwingenden, und einen ordentlichen, d.h. sich in allen übrigen Schwingungsebenen bewegenden, Strahl. Dabei wird letzterer durch Reflexion ausgelöscht, so dass nur der außerordentliche Strahl durch den Polarisator tritt. Trifft dieser nun auf gleichsinnig ausgerichtete Molekülverbände, durch welche er gleichsinnig gedreht wird, kann durch eine weitere zwischengeschaltete Folie, dem Analysator, verstärkt nur dieser, in einer definierten Drehachse schwingende Lichtstrahl hindurch gelassen werden. Dadurch leuchten wiederum genau diese Strukturen im Gesichtsfeld des Mikroskops heller auf, die gleichsam ausgerichtet sind.

Der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung diente das Leica DMRB Mikroskop mit einer Quecksilberhochdrucklampe und Filtern für die jeweilige selektive Darstellung der drei verwendeten Fluorochrome. Für die Befundung und Dokumentation wurde ein digitales Bildanalysesystem (AxioVision Rel. 4.3) verwendet. In dieses System wurden dann die 16-fach vergrößerten Einzelbilder mittels einer Videokamera (Sony 3 CCD Color video camera) eingespeist. Ein an das digitale Bildsystem gekoppelter, motorisierter XY- Tisch (MCX- 2eco, ITK Dr. Kassen GmbH, Lahnau) ermöglichte die Erstellung von Übersichtsaufnahmen, die automatisch aus Einzelbildern nicht überlappend zusammengesetzt wurden. Dabei konnte durch eine weitere Funktion des Programms der Bildanalyse eine gleichzeiti-

ge Befundung des Anlagerungsverhaltens aller drei verwendeten fluoreszierenden Stoffe vorgenommen werden, indem die jeweiligen Einzeldarstellungen verrechnet und dann optisch übereinander gelagert wurden.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie macht man sich die Eigenschaft bestimmter Substanzen zunutze, nach Anregung durch kurzwelliges, energiereiches Licht, in dem Falle 0,3- 0,04 μm , zu fluoreszieren. Werden nämlich diese so genannten Fluorochrome durch dieses ultraviolette, nicht sichtbare Licht angeregt, werden ihre Moleküle kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau angehoben, von welchem sie dann unter Abgabe von sichtbarem, energieärmerem und langwelligerem Licht auf ihr ursprüngliches Niveau zurückfallen. Dabei existieren für die entsprechenden fluoreszierenden Substanzen spezifische Wellenlängen für den entsprechenden Energietransfer, wobei dann durch bestimmte Filter das charakteristisch farbige Licht separiert weitergeleitet wird. So sendet Calcein- Grün grüne, Xylenol- Orange rote und Tetracyclin gelbe Fluoreszenzen aus, die sich gut von der Hintergrundfluoreszenz körpereigener Substanzen abheben. Durch die Sequenzmarkierung (s. Tab. 2.2) ließen sich zudem Aussagen über den zeitlichen Verlauf des knöchernen Umbaus für den gesamten Versuchszeitraum treffen.

Aus vorangegangenen Studien ist hinlänglich bekannt, dass die Einheilung eines freien Sehnentransplantats ein komplexes Geschehen darstellt. Dabei sind der Knochenumbau und das biologische Verhalten des Transplantats Bestandteile einer Reihe von parallel verlaufenden und ineinander greifenden Prozessen der Knochen-Band- Einheilung, die zudem noch einer gegenseitigen Beeinflussung unterliegt.

Deswegen stellt die quantitative Auswertung dieses Prozesses eine große Schwierigkeit dar. Um dennoch der Vielzahl an relevanten und teilweise schwer quantifizierbaren Parametern gerecht zu werden, erfolgt die histologische Analyse der Knochen- Band- Einheilung zum größten Teil rein deskriptiv, wobei die verfügbaren Untersuchungsprotokolle vorangegangener wissenschaftlicher Arbeiten als Vorlage bzw. Muster dienen. Zusätzlich muss bemerkt werden, dass die Reifung der Knochen- Band- Einheilung vor allem durch das Auftreten qualitativ neuer Merkmale geprägt und die Quantität nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Um zusätzlich den Vergleich von Ergebnissen verschiedener Studien zu erleichtern, wurde der wichtigste Faktor dieses Heilungsprozesses, die direkte Bandinsertion, mittels eines Scores (s. Tab. 2.6) erarbeitet, der im Vorfeld in der Arbeitsgruppe von Weiler et al. entwickelt wurde [143]. Zusammengenommen fanden einerseits der Gesamtkomplex, aber andererseits auch die einzelnen Vorgänge und Merkmale ausreichende Berücksichtigung bei der Auswertung.

Grad	Bezeichnung	Merkmale
0	keine direkte Bandinsertion	keine Anzeichen einer direkten Bandinsertion, indirekte Bandinsertion
I	beginnende direkte Bandinsertion	vereinzelte, nicht mineralisierte Chondrocyten
II	fortgeschrittene direkte Bandinsertion	Vielzahl von ungeordneten Chondrocyten, zum Teil mineralisiert
III	ausgeprägte direkte Bandinsertion	Vielzahl von zu Säulen angeordneten Chondrocyten, breite Mineralisationsfronten
IV	reife direkte Bandinsertion	typischer Vierzonen- Aufbau: 1. freie Bandstruktur mit parallel ausgerichteten Kollagenfasern 2. unverkalkter Faserknorpel 3. Kalkfaserknorpel 4. lamellärer Knochen

Tab. 2.6: Score zur semiquantitativen Auswertung der direkten Bandinsertion [143]

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines

3.1.1 Postoperativer Verlauf und Komplikationen

Insgesamt wurden bei 18 Tieren eine Rekonstruktion des VKB mittels eines mit Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren behandelten Allograft vorgenommen. Im kompletten Verlauf dieser Studie traten keine wesentlichen Komplikationen auf, so dass jeweils die komplette Anzahl der Schafe aus der 6- bzw. 12- Wochengruppe den biomechanischen und histologischen Untersuchungen zugeführt werden konnten. Die Schafe wurden in den ersten 14 Tagen nach der Operation täglich beobachtet bzw. untersucht. Alle Schafe übten unmittelbar postoperativ eine Teilbelastung der operierten Extremität aus und entwickelten innerhalb der ersten 14 Tage ein normales Gangbild. Lediglich ein Tier zeigte innerhalb der ersten zwei Wochen, ab dem 6. postoperativen Tag ohne ersichtlichen Grund eine kurzzeitige Verschlechterung des Gangbildes in Form eines Schonhinkens, welches aber nach drei Tagen wieder vollständig verschwand. Danach verlief die weitere Entwicklung ebenfalls problemlos.

3.1.2 Biomechanische Ergebnisse

Die Ergebnisse der biomechanischen Testungen sind Bestandteil der Dissertation von Johannes Gonnermann. Im Folgenden soll jedoch durch die kurze Darstellung ein Vergleich zwischen den Heilungsvorgängen und den Versagenskräften bzw. den Versagensmodi ermöglicht werden. Auch diese Ergebnisse wurden mit denen der Kontrollstudie verglichen.

Nach 6 Wochen beobachteten wir ähnliche biomechanische Eigenschaften in den Schubladentests bei den PES-sterilisierten Transplantaten im Vergleich zu den

unsterilisierten Allografts und den Autografts. Einzig im vorderen Schubladentest zeigte sich schon nach 6 Wochen eine signifikant größere Laxizität und eine signifikant geringere Steifigkeit der PES-behandelten Flexorensehnen zu den Autografts. Im 3. Monat des Transplantatremodelings fand sich in der PES-Gruppe bereits eine signifikant größere Laxizität und signifikant geringere Steifigkeit im kombinierten vorderen und hinteren Schubladentest gegenüber dem Autograft. Im vorderen Schubladentest ergaben sich eine signifikant größere Laxizität und eine signifikant geringere Steifigkeit gegenüber beiden Kontrollgruppen.

Die Steifigkeit der PES-behandelten Allografts war im Versagenstest gegenüber den Kontrollgruppen bereits zu beiden Zeitpunkten signifikant geringer. Eine signifikant verringerte maximale Versagenskraft war allerdings erst in der 12. postoperativen Woche zu verzeichnen. Dabei versagten bereits 44,4% (4/9) der PES-Transplantate beim vorderen Schubladentest unter submaximaler Belastung, so dass ein Versagenstest gar nicht erst möglich war. Während die Kontrollgruppen nach 12 Wochen einen Anstieg der Versagenskraft zeigten, nahm die maximale Versagenskraft bei den PES-Allografts im Vergleich zum Zeitpunkt von 6 Wochen noch weiter ab. Dabei änderte sich ebenfalls der Versagensmodus von einem primären Versagen der Verbindungsmaterialien (Knoten/Fäden) nach 6 Wochen zu einem intraligamentären Reißen des PES-Transplantates nach 12 Wochen.

Insgesamt schnitt das PES-behandelte Allograft in allen biomechanischen Testungen im Vergleich zum tiefgefrorenen Allograft und dem Autograft schlechter ab, wobei die Unterschiede im Verlauf nach 12 Wochen immer deutlicher wurden. Die Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Sterilisation von Weichteiltransplantaten resultiert somit schon nach 12 Wochen in erheblich eingeschränkten biomechanischen Eigenschaften.

3.1.3 Revaskularisierung

Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Revaskularisierung sind ebenfalls Bestandteil der Dissertation von Johannes Gonnermann.

Im Vergleich zu den Autografts (AUTO) und den unsterilisierten Allografts (ALLO) der Vorstudie zeigte sich das Transplantatremodeling der PES-behandelten Allografts jedoch deutlich verlangsamt bzw. gestört. In der deskriptiven Auswertung der konventionellen HE- und MG-Färbungen der PES-behandelten Allografts fand sich noch 6 Wochen postoperativ ein weitestgehend avitales, avaskuläres und strukturloses Transplantat. Diese Aussage wurde durch die quantitative Erhebung der Gefäßdichte über drei vorher definierte Zonen (subsynovial, intermediär, zentral) im Querschnitt anhand der anti-v.Willebrandt/ FaktorVIII- Färbung bestätigt. Zum Zeitpunkt von 6 Wochen war die Gefäßdichte im Vergleich zu den Kontrollgruppen (AUTO, ALLO) sowohl in der zentralen, intermediären als auch in der subsynovialen Zone signifikant geringer. Die signifikante Hypovaskularität gegenüber der nativen Flexorensehne und dem nativen Kreuzband über den gesamten Transplantatquerschnitt bekräftigt ebenfalls die Vermutung, dass sich das PES-Allograft nach 6 Wochen noch in der Degenerationsphase befand. Die Kontrollgruppen (AUTO, ALLO) waren zu diesem Zeitpunkt im Remodelingprozess schon weiter fortgeschritten.

Nach 12 Wochen präsentierte sich das PES-behandelte Allograft inhomogen vitaler als zuvor. Vor allem in der subsynovialen Zone gab es lokal vitale, hyperzelluläre und hypervaskularisierte Regionen neben avitalen Bereichen. Die Vaskularität und Zellularität nahm zur Transplantatmitte allerdings stetig ab. Das Bindegewebe wirkte noch weitestgehend ungeordnet und strukturlos. Die quantitative Bestimmung der Gefäßdichte ergab einen Anstieg in allen 3 Zonen von 6 nach 12 Wochen. Im Vergleich zu der AUTO- und der ALLO-Gruppe war der Gefäßgehalt aber weiterhin in allen Regionen signifikant vermindert und wies lediglich in den peripheren Zonen gegenüber dem nativen VKB eine Hypervaskularität auf. Es zeigt sich also, dass beim PES-behandelten Allograft ebenfalls eine Revaskularisierung im Rahmen des Remodelings stattgefunden haben muss. Diese verläuft jedoch selbst noch 12 Wochen nach Implantation im Vergleich zum unsterilisierten Allograft und erst recht zum Autograft deutlich verlangsamt ab. Das Peressigsäure-Unterdruck-Verfahren scheint demnach die „Ligamentisierung“ von allogenen Sehmentransplantaten zu stören.

3.1.4 Remodeling

Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich des Remodelings sind Bestandteil der Dissertation von Julia Kamp. Im Folgenden soll jedoch durch die kurze Darstellung ein Vergleich zwischen den Heilungsvorgängen und den Remodelingprozessen ermöglicht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der frühe Remodelingprozess der PES-sterilisierten Transplantate deutlich verzögert ablief. Nach 6 Wochen war eine niedrigere Gesamtzellzahl als bei autologen und allogenen, nicht-sterilisierten Transplantaten festzustellen, nach 12 Wochen war dieser Unterschied dann signifikant. Von 6 zu 12 Wochen war nur ein minimaler Anstieg der Zellzahl im PES-sterilisierten Transplantat zu sehen gewesen.

Bei der Crimplänge ergaben sich nach 6 und nach 12 Wochen signifikante Unterschiede zu beiden Gruppen. In der Vergleichsgruppe war deutlich geworden, dass sich die Wellenlänge des Crimp in autologen und in allogenen, nicht-sterilisierten Transplantaten im Laufe der Zeit der Länge des VKB langsam annäherte, nachdem sie initial deutlich gestiegen war. Bei dem PES-sterilisierten Gewebe war diese Entwicklung in der frühen Phase des Remodeling noch nicht zu erkennen. Die Wellenlänge nahm von 6 zu 12 Wochen sogar noch zu, wenn auch nicht signifikant ($p = 0,258$)

Auch die Betrachtung der Myofibroblasten zeigte wenig Dynamik im Remodeling. Es waren deutlich weniger einsproßende Myofibroblasten als in autologen und allogenen, nicht-sterilisierten Transplantaten zu sehen.

Der Gehalt an Kollagen I und III änderte sich über den gesamten beobachteten Zeitraum nicht signifikant. Aus der Literatur ist bekannt, dass innerhalb der ersten Wochen der Gehalt an Kollagen III zunimmt, während der an Kollagen I abnimmt.

Alle Parameter zeigen also eine deutliche Verzögerung oder Störung des Remodelingprozesses.

3.1.5 Makroskopische Befunde

Das native vordere Kreuzband zeigte sich zum Zeitpunkt Null von einer gut vaskularisierten synovialen Hülle umgeben, während die PES-sterilisierte Flexorenhöhle von einem dünnen Peritendineum mit ähnlicher Gefäßverteilung überzogen war.

In der frühen Remodelingphase nach 6 Wochen wies das Kniegelenk geringe Entzündungszeichen wie serösen Gelenkerguss und Gefäßinjektionen der Synovialis auf. Bei zwei explantierten Kniegelenken war der Gelenkerguss im Rahmen eines Hämarthros leicht blutig tingiert. Das Transplantat war von einer reichlich vaskularisierten und hypertrophen Synovialschicht umhüllt.

Während der intermediären Remodelingphase ergab die makroskopische Inspektion der explantierten Gelenke der 12 Wochentiere schwerere Entzündungszeichen. Bei zwei Drittel der operierten Kniegelenke zeigten sich z.T. schwer ausgeprägte sekundäre Arthrofibrosen am tibialen Knochentunneleingang (s. Abb. 3.1).



Abb. 3.1: *Links*: Makroskopische Ansicht der Arthrofibrose nach 12 Wochen; der Pfeil deutet auf den Bereich des tibialen Tunneleingangs; *Rechts*: Mikroskopisches Bild der Arthrofibrose nach 12 Wochen

Zur Verifizierung dieser Diagnose wurden histologische Schnitte dieser Veränderungen angefertigt und einem Pathologen zur Beurteilung vorgelegt, der dies dann bestätigte. Andere Charakteristika waren ausgeprägte seröse in einigen Fällen leicht blutige Gelenkergüsse und eine ausgeprägte Gefäßinjektion in der Synovia des

Transplantats, welches selbst teilweise aufgefasert und weiterhin von einer hypertrophen Synovialschicht umhüllt war.

3.2 Histologische Ergebnisse

Bei den folgenden Ergebnissen werden die verschiedenen Entwicklungen bezüglich der Knochen- Sehnen- Heilung sowie des Knochenumbaus bestimmten Regionen des femoralen bzw. tibialen Knochentunnels zugewiesen. In den unten abgebildeten Knochenschnitten werden die einzelnen Bereiche des Tunneleingangs, der- mitte und des –bodens farblich hervorgehoben (s. Abb. 3.2).

Entsprechend der biomechanischen Belastungssituation unterscheidet man eine Druckseite, die femoral der anterioren und tibial der posterioren Ebene entspricht, von einer Zugseite. Letztere befindet sich femoral auf der posterioren und tibial auf der anterioren Seite.

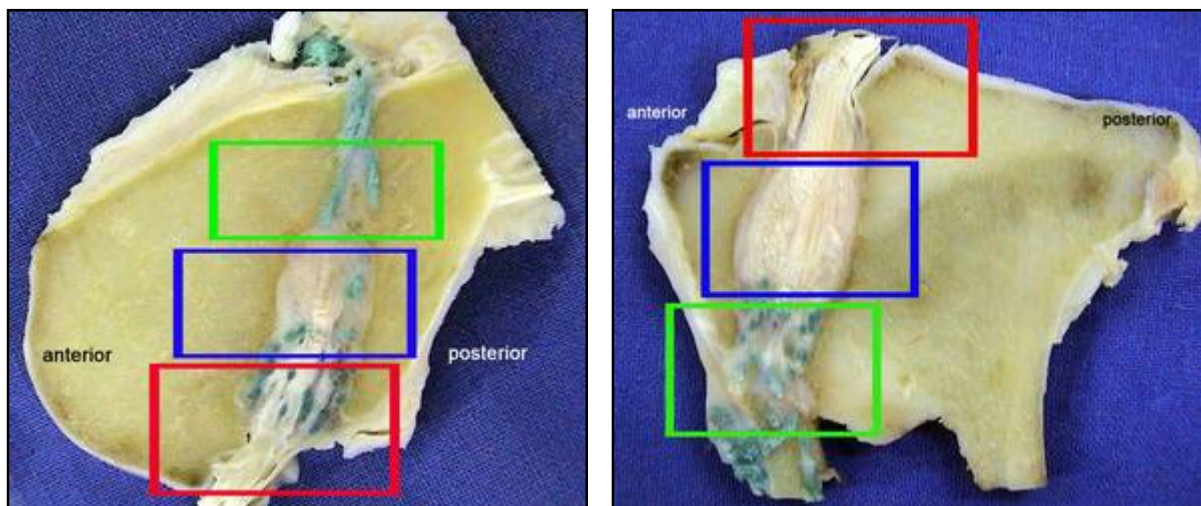


Abb. 3.2: Knochenschnitte (links Femur, rechts Tibia) mit Darstellung der Ebenen des Tunneleingangs (rot), der Tunnelmitte (blau) sowie des Tunnelbodens (grün)

3.2.1 Ergebnisse der 6- Wochengruppe

3.2.1.1 Knochen- Band- Einheilung

Femur:

In 2 Präparaten waren keine Anzeichen der direkten Bandinsertion zu erkennen. In 2 weiteren zeigte sich eine Entwicklung einer neuen direkten Bandinsertion I. Grades, die sich jeweils an der posterioren Seite des Knochenkanals auf Höhe des Tunneleingangs befand. Eine fortgeschrittene Entwicklung einer direkten Bandinsertion (Grad II) zeigte sich in 5 Fällen, wobei dies sich ebenfalls größtenteils auf die posteriore Seite (3/5) und den Tunneleingang (3/5) beschränkte. Bei zweien war diese am Tunnelboden bzw. -ausgang vorzufinden (s. Abb. 3.8). In einem Präparat zeigten sich am Eingang und der Mitte der dorsalen Seite des Knochenkanals eine Vielzahl von zu Säulen angeordneten chondroiden Zellen und breite Mineralisationsfronten, was einer neu entwickelten direkten Bandinsertion des Reifegrad III entsprach (s. Abb. 3.3- 3.5).

Vor allem am Tunnelboden war eine schwache bis mittel ausgeprägte bindegewebige Zwischenschicht zu sehen, die von vereinzelt Sharpey- ähnlichen Fasern durchsetzt war, die in den anliegenden Knochen einstrahlten.

Tibia:

Bei der Auswertung der histologischen Schnitte der Tibia zeigte sich bezüglich der Knochen- Band- Heilung ein ähnliches Bild wie bei denen des Femurs. So ließen sich bei 2 Präparaten ebenfalls keine Zeichen der direkten Bandinsertion auffinden und bei 2 weiteren eine zeigte sich beginnende Entwicklung (Grad I). Dabei wiesen diese vereinzelte chondroide Zellen jeweils auf der anterioren Seite auf, das eine Mal am Eingang, das andere Mal in der Mitte und am Boden des Knochentunnels. In 4 Fällen hatte sich eine Vielzahl von Knorpelzellen entwickelt, die zum Teil mineralisiert waren (Grad II) und die sich vorwiegend am Eingang und der Mitte des Bohrkanals vorfanden, wobei die jeweilige Verteilung auf die anteriore bzw. posteriore Seite ausgeglichen war. Ein Präparat zeigte eine ausgeprägte Entwicklung einer neuen direkten Bandinsertion (Grad III), die in allen Abschnitten des Tunnels vorzufinden war, aber an der dorsalen Seite noch etwas stärker entwickelt war (s. Abb. 3.7- 3.8).

Die Ausbildung der bindegewebigen Schicht ließ ein ähnliches Bild erkennen wie auf der femoralen Seite. Dabei war sie ebenfalls verstärkt am Tunnelboden zu finden, wobei dort Abschnitte dieser fibrösen Sharpey- Fasern enthaltende Zwischenschicht zum Teil direkt an Bereiche angrenzten, die durch Zeichen der direkten Bandinsertion geprägt waren.

Grad der Bandinsertion	Femur	Tibia
0	2	2
I	2	2
II	4	4
III	1	1
IV	-	-

Tab. 3.1: Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der Knochen- Band-Einheilung der 6- Wochengruppe

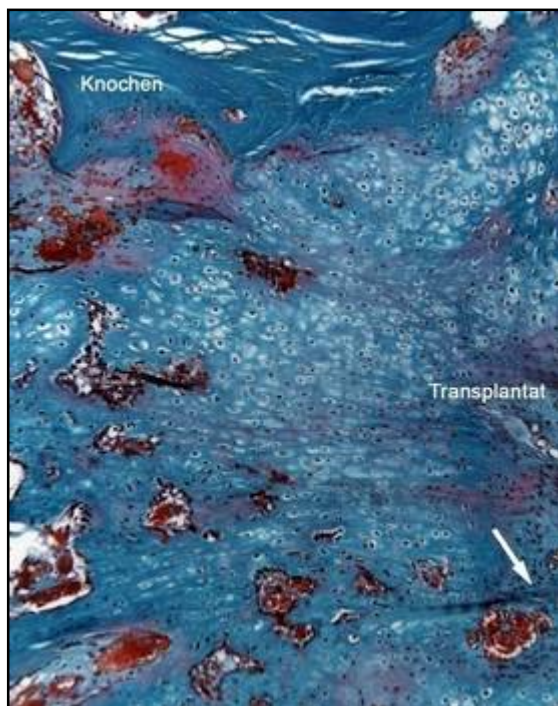


Abb. 3.3: Direkte Bandinsertion III. Grades im Bereich des Tunneleingangs bis –mitte posterior; der Pfeil deutet in Richtung der Tunneleingangsebene; 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur, MG x 200

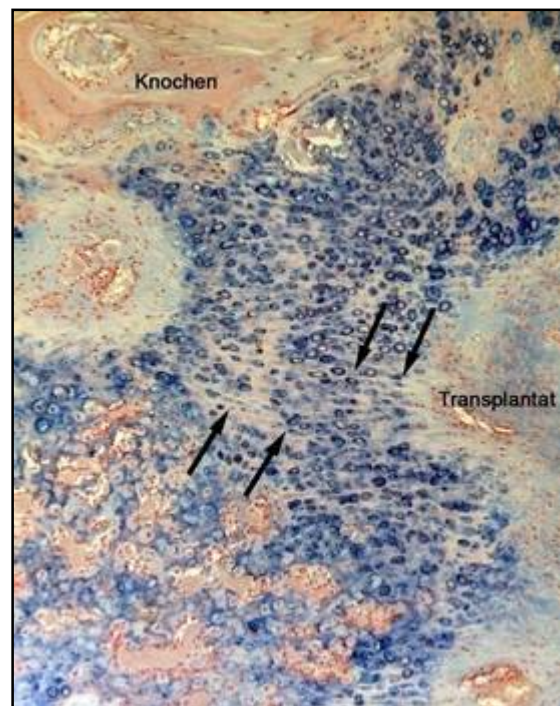


Abb. 3.4: Korrespondierende Darstellung der zu Säulen angeordneten chondroiden Zellen (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur, AB x 200

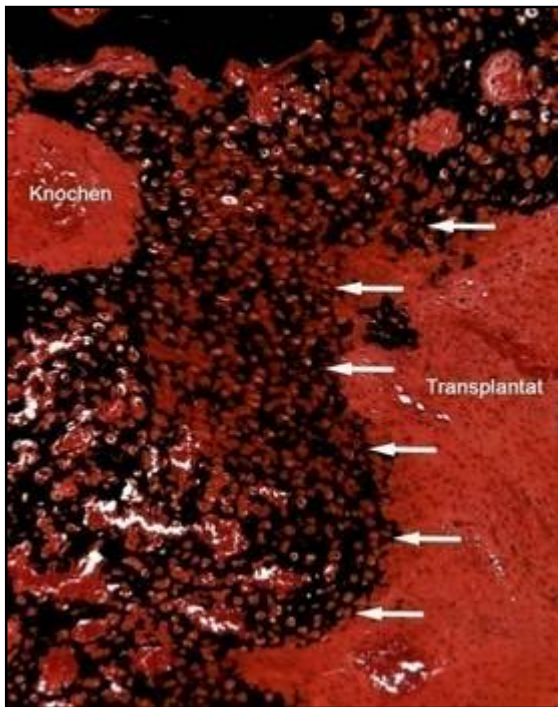


Abb. 3.5: Korrespondierende Darstellung der breitem Mineralisationsfronten (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur, SOvK x 200

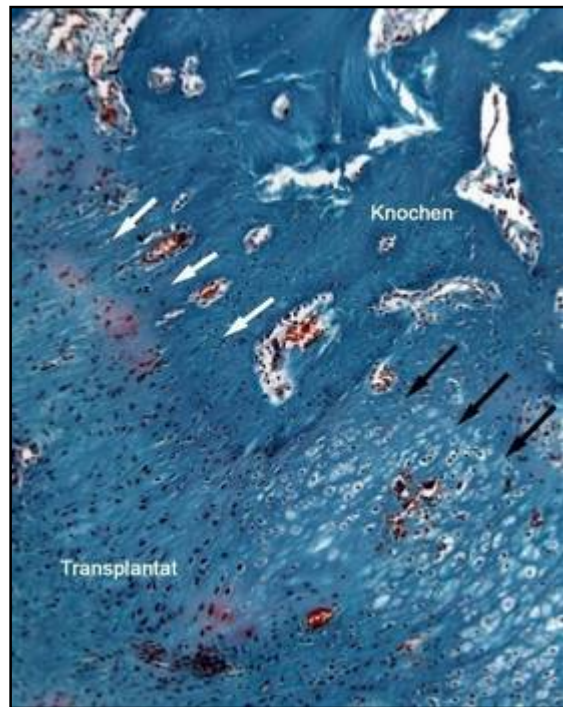


Abb. 3.6: Indirekte Bandinsertion über Sharpeysche Fasern (weiße Pfeile) neben direkter Bandinsertion II. Grades (schwarze Pfeile) am Tunnelboden; 6 Wochen, Schaf 6-06, Tibia, MG x 200

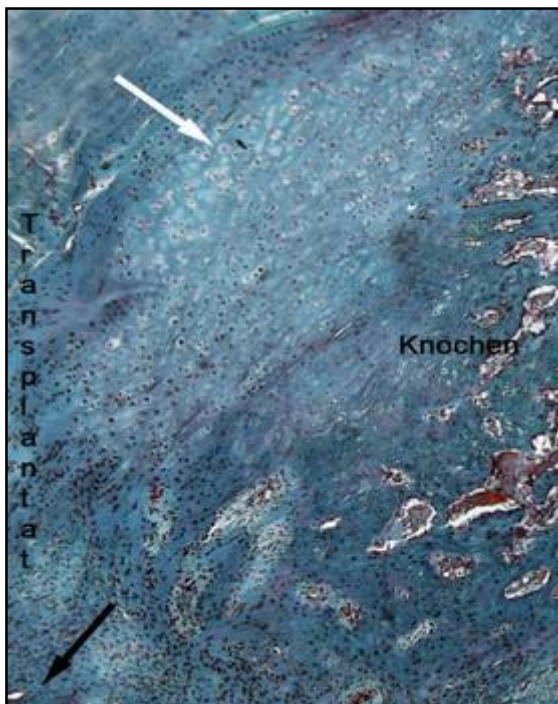


Abb. 3.7: Direkte Bandinsertion III. Grades (weißer Pfeil) im Bereich des Tunneleingangs anterior; der schwarze Pfeil deutet in Richtung der Tunneleingangsebene; 6 Wochen, Schaf 7-06, Tibia, MG x 100

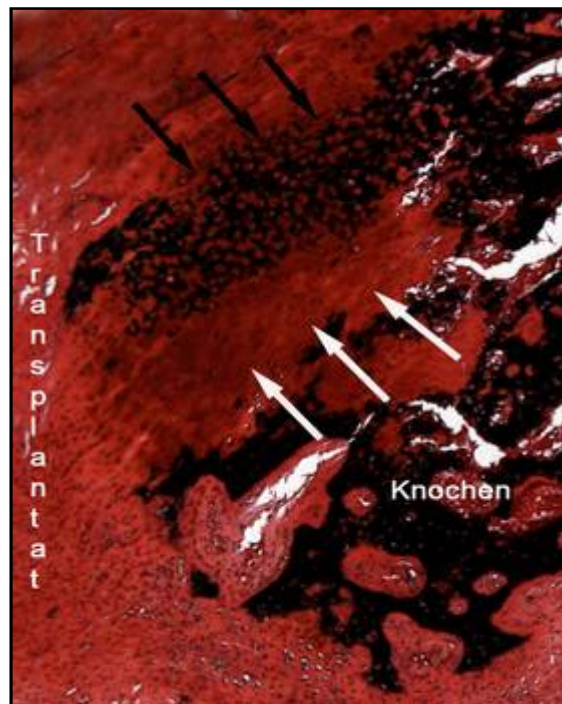


Abb. 3.8: Korrespondierende Darstellung der breiten Mineralisationsfront (schwarze Pfeile) neben noch nicht mineralisierten Knorpelsäulen (weiße Pfeile); 6 Wochen, Schaf 9-06, Tibia, SOvK x 100

3.2.1.2 Transplantat

Femur:

Die Transplantate waren bis auf eine Ausnahme nicht beurteilbar, da sie bis auf einen schmalen Saum im Rahmen der biomechanischen Testungen herausgerissen waren und nur randständig teilweise verblieben sind (Degloving). Die eine im Knochenkanal verbliebene Sehne zeigte im zentralen Anteil große avitale Bereiche (s. Abb. 3.9). In den Randbezirken war sie durch eine stark aufgelockerte Struktur und einen nur zum Teil orientierten Faserverlauf geprägt. Außerdem ließen sich dort neben vereinzelt Fibroblasten und –zyten auch Rundzellinfiltrate erkennen.

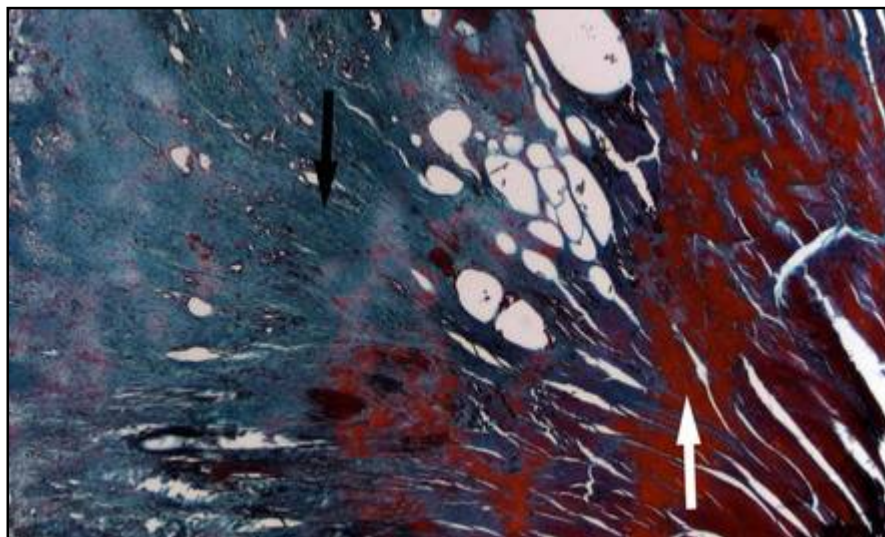


Abb. 3.9: Darstellung eines Transplantats mit zentralen avitalen Anteilen (weißer Pfeil) mit z.T. vakuoliger Degeneration sowie hyperzellulärem Randbereich (schwarzer Pfeil); 6 Wochen, Schaf 7-06, Femur, MG x50

Tibia:

Hier waren aus demselben Grund wie oben lediglich in 3 Fällen die Transplantate beurteilbar. Aber auch diese zeigten im zentralen Anteil in der Masson- Goldner-Färbung große rot gefärbte, zellarme Bereiche, die avitalem Sehngewebe entsprachen. In denen an der Knochenwand anliegenden Stücken präsentierten sich die verbliebenen Allografts etwas zellreicher, in der Struktur aufgelockert, im Faserverlauf orientiert. Zusätzlich zu den Rundzellinfiltraten, wies ein Präparat vereinzelt Fremdkörperriesenzellen auf, die sich am Tunnelboden befanden (s. Abb. 3.10).

3.2.1.3 Knochenumbau

Das Bild des Knochenumbaus war sowohl tibial als auch femoral vor allem durch das vermehrte Auftreten osteoklastärer Lakunen gekennzeichnet, die besonders am Tunnelboden stark ausgeprägt waren (s. Abb. 3.11). Innerhalb des Knochenkanals zeigten sich nur schwache Zeichen eines Knochenaufbaus. So ließen sich aktive Osteoblasten und Osteoidsäume nur sehr mäßig nachweisen, wobei keine Schwerpunkte bezüglich der Lokalisation zu erkennen waren. Lediglich außerhalb des Bohrtunnels war zum Teil die Knochenvorläufersubstanz etwas stärker ausgeprägt.

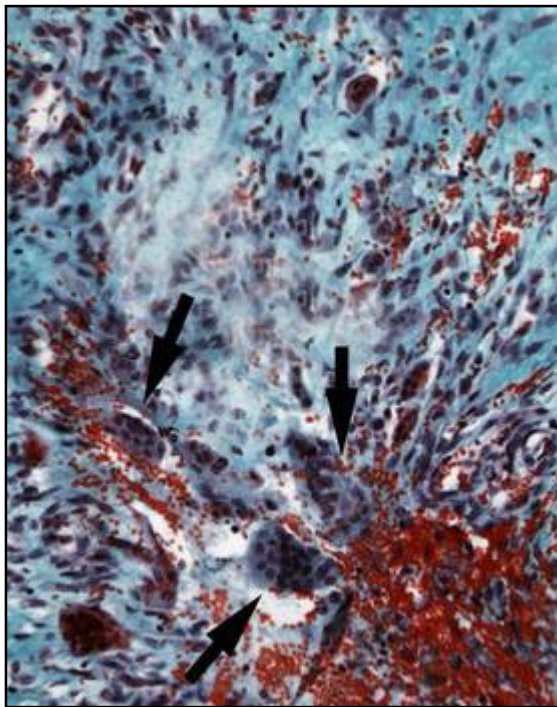


Abb. 3.10: Rundzellinfiltrate am Tunnelboden mit vereinzelt Fremdkörperriesenzellen (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 7-06, Tibia, MG x 400

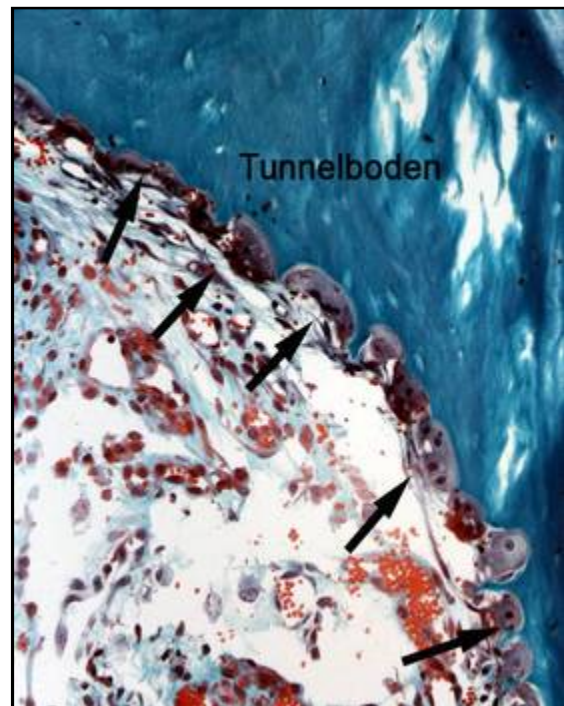


Abb. 3.11: Osteoklasten am Tunnelboden (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 2-06, Femur, MG x 400

3.2.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

In der 6- Wochengruppe zeigte sich mit Ausnahme der femoralen Calcein-Einlagerung eine kontinuierliche Anreicherung der fluoreszierenden Substanzen über die gesamte Länge des Knochenkanals. Eine zunehmende Stärke der

Fluoreszenz in Richtung des Tunnelbodens ließ sich andeutungsweise erkennen. Gesondert hervorzuheben sind die in einzelnen Fällen neu entstandenen inselartigen Areale von Geflechtknochen, die vor allem im Bereich von Tunnelmitte bis –boden in den Bohrkanal hineinragten und eine verstärkte Einlagerung der Fluorchrome nach drei bzw. fünf Wochen aufwiesen (s. Abb. 3.14).

Das nach einer Woche verabreichte Calcein- Grün zeigte insgesamt eine schwache Anreicherung im gesamten Bohrkanal. Während sich diese auf tibialer Seite eher kontinuierlich darstellte, war das Bild auf femoraler Seite durch eine punktuelle Anlagerung geprägt (s. Abb. 3.12). Dabei ließ sich keine klare Präferenz bezüglich der Lokalisation erkennen.

Das Xylenol- Orange, welches nach drei Wochen appliziert wurde, wies eine deutlich stärkere Fluoreszenz sowohl im affektierten Lamellenknochen, als auch im neugebildeten Geflechtknochen auf. Es imponierte durch eine regelmäßige Einlagerung, wobei diese aber tendenziell in Richtung Tunnelboden leicht zunahm (s. Abb. 3.13).

Das nach fünf Wochen intravenös injizierte Tetracyclin zeichnete sich im Vergleich zum Xylenol- Orange durch eine leicht abgeschwächte, aber im Verhältnis zum Calcein durch eine vermehrte Anreicherung aus. Zwar zeigte sich ein Schwerpunkt bei der Verteilung der fluoreszierenden Banden in Höhe des Tunnelbodens, trotzdem konnte man dennoch eine kontinuierliche Anlagerung im gesamten Bohrkanal mit zum Teil auch verstärkten Einlagerungen im Bereich des Tunneleingangs erkennen (s. Abb. 3.15).

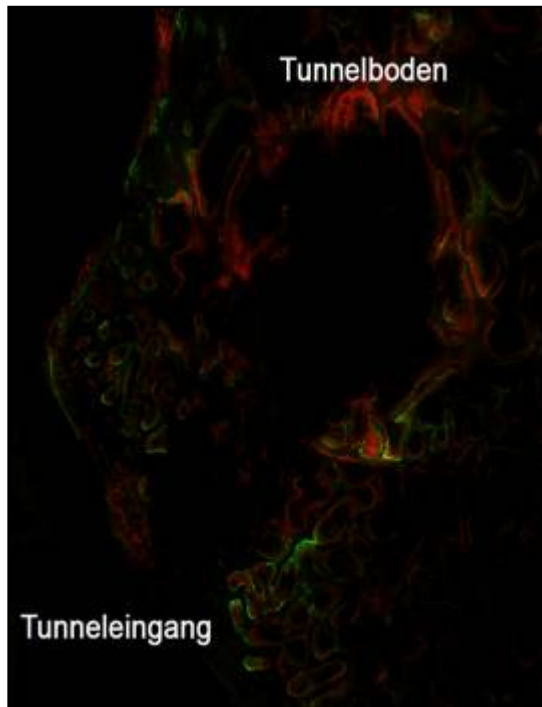


Abb. 3.12: Anlagerung von Calcein- Grün punktuell und Xylenol- Orange über gesamten Knochenkanal, tendenziell vermehrt am Tunnelboden I; 6 Wochen, Schaf 9-06, Femur

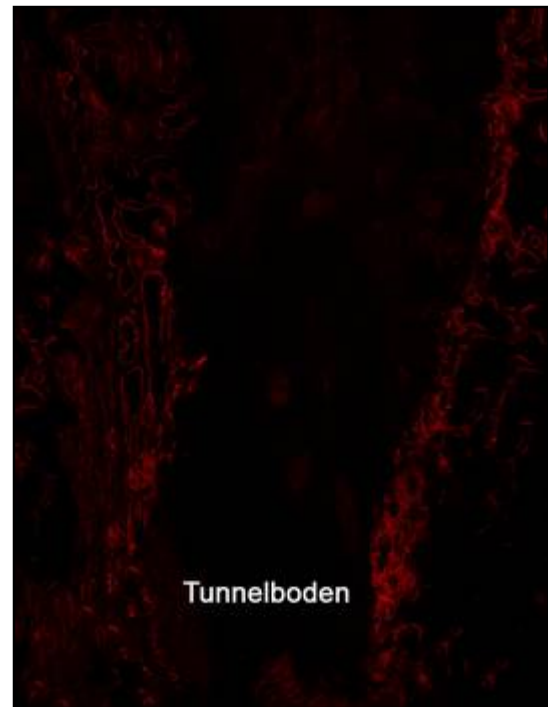


Abb. 3.13: Gleichmäßige Anlagerung von Xylenol- Orange über gesamten Knochenkanal; 6 Wochen, Schaf 4-06, Femur

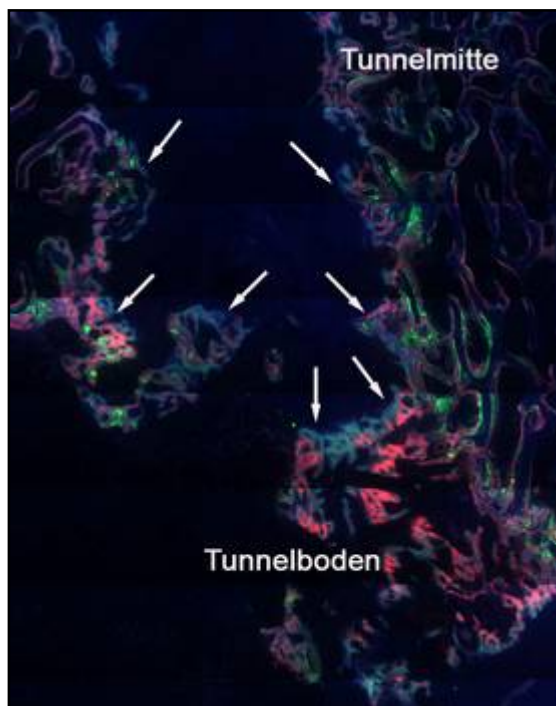


Abb. 3.14: Anlagerung aller drei Fluorochrome an die neugebildeten Knocheninseln (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 2-06, Tibia

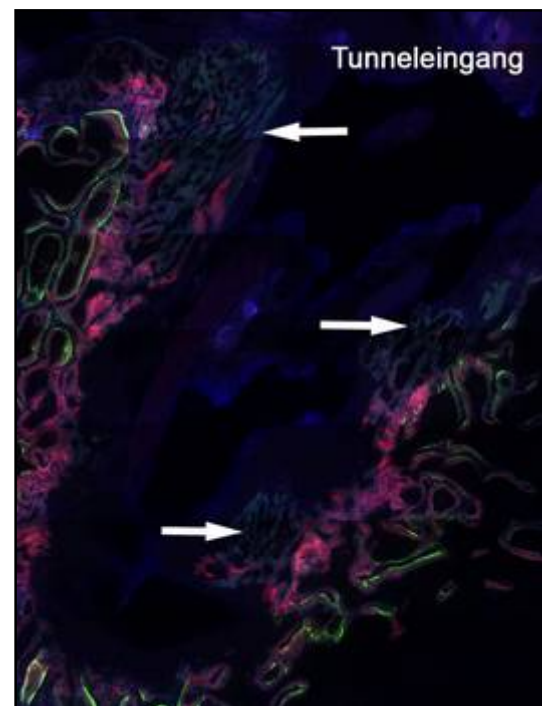


Abb. 3.15: Darstellung aller drei Fluorochrome, verstärkte Anlagerung von Tetracyclin in Tunnelmitte und v.a. im Eingangsbereich (Pfeile); 6 Wochen, Schaf 7-06, Tibia

3.2.2 Ergebnisse der 12- Wochengruppe

3.2.2.1 Knochen- Band- Einheilung

Femur:

Die Reife der direkten Bandinsertion entsprach weitestgehend der der Vorgruppe. So zeigte 1 Präparat keine Zeichen einer direkten Bandinsertion auf, während 2 weitere vereinzelte, unverkalkte Knorpelzellen aufwiesen (Grad I), die sich auf der anterioren Seite des Tunnelleingangs befanden. Ebenfalls in dieser Lokalisation konnten in 3 weiteren Fällen chondroide Zellen nachgewiesen werden, die allenfalls eine beginnende Mineralisation erkennen ließen, weshalb eine genaue Zuordnung nicht möglich war (Grad I-II). Bei 2 anderen gefärbten Schnitten waren die Kriterien für eine fortgeschrittene direkte Bandinsertion (Grad II) erfüllt, waren aber auch auf Ebene der Vorderseite des Knochenkanaleingangs beschränkt (s. Abb. 3.16). Eine Vielzahl von zu Säulen angeordneter Chondrocyten mit breiten Mineralisationsfronten (Grad III) zeigte sich auf der anterioren Fläche nahe des Tunnelbodens in einem der Präparate.

Die Entwicklung einer bindegewebigen Schicht, mit Sharpey- ähnlichen Fasern durchsetzt, zeigte im Verhältnis zur 6- Wochengruppe bezüglich der Quantität ein leicht fortgeschrittenes Bild (s. Abb. 3.17). Diese Schicht nahm an Breite in Richtung des Tunnelbodens zu und wies dort in 3 Fällen einige kreisrunde Aussparungen auf.

Tibia:

Die Knochen- Band- Verbindung erfuhr hier insgesamt gesehen eine weitere Reifung. So war in drei Fällen eine fortgeschrittene Bandinsertion (Grad II) festzustellen, die sich vor allem eingangs auf der anterioren Seite des Knochentunnels manifestierte. Bei einem anderen Präparat ließ sich an gleicher Stelle schon ein Übergang in Grad III feststellen (Grad II-III), wobei im Vergleich dazu auf der posterioren Seite die Verbindung zwischen Knochen und Sehne nicht so weit entwickelt war (Grad I). Bei 2 weiteren Schnitten ließen sich an der Vorderseite des Knochenkanals, nahe der Gelenkfläche, breite Zonen von mineralisierten und zu Säulen angeordneten Chondrocyten erkennen (Grad III), die sich aber auch zum Teil

bis zur Mitte und zum Boden des Tunnels erstreckten. An der posterioren Seite waren diese Merkmale noch nicht so stark ausgeprägt (Grad II- III). In 2 Fällen wiesen die Knochen- Ligament- Verbindung bereits einen weiteren Fortschritt in der Stufe ihrer Entwicklung erkennen. So zeigte zumindest 1 Präparat einen geordneten Vierzonen- Aufbau erkennen, in dem die Kollagenfasern der Bandstruktur scherengitterartig durch die unverkalkte Faserknorpel- und Kalkfaserknorpelschicht verliefen (Grad IV) und direkt am Knochen der posterioren Seite des Knochenkanaleingangs inserierten (s. Abb. 3.18- 3.19). Im anderen Fall war dies auf der anterioren Fläche zu beobachten, wobei diese Bandinsertion nicht vollends gereift erschien (Grad III-IV). Auf der jeweils gegenüberliegenden Seite war diese Entwicklungsstufe noch nicht erreicht, dennoch waren dort die Zeichen einer Bandinsertion II. Grades zu erkennen.

Die Ausbildung der bindegewebigen Schicht erschien gleichmäßig im gesamten Tunnelbereich etwas vermindert, war aber durch eine größere Anzahl von Sharpey-ähnlichen Fasern gekennzeichnet, die schwerpunktmäßig Richtung Tunnelboden verteilt waren und in den anliegenden Knochen einstrahlten.

Grad der Bandinsertion	Femur	Tibia
0	1	-
I	5 ^{*1}	-
II	2	4 ^{*2}
III	1	4 ^{*3}
IV	-	1

Tab. 3.2: Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der Knochen- Band-Einheilung der 12- Wochengruppe

^{*1} 3 der 5 Präparate befanden sich im Übergang zur fortgeschrittenen Bandinsertion;

^{*2} 1 der 2 Präparate befand sich im Übergang zur ausgeprägten Bandinsertion;

^{*3} 1 der 4 Präparate befanden sich im Übergang zur reifen Bandinsertion

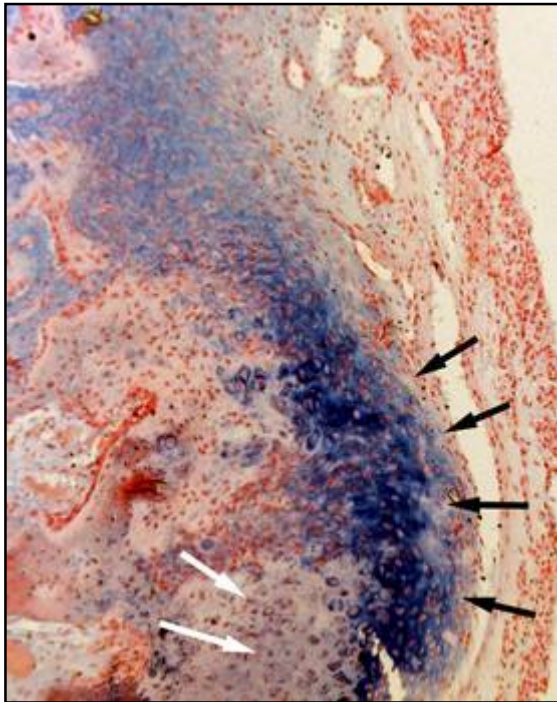


Abb. 3.16: Bandinsertion mit z.T. verkalktem (schwarze Pfeile) neben unverkalktem Knorpel (weiße Pfeile) im Bereich des anterioren Tunnelingangs; 12 Wochen, Schaf 2-12, Femur, AB x 200

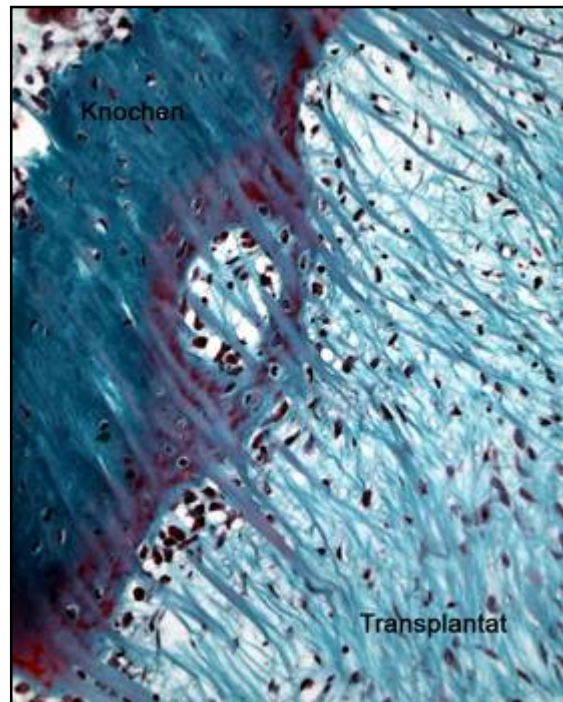


Abb. 3.17: Indirekte Bandinsertion über Sharpeysche Fasern im Bereich der posterioren Tunnelmitte; 12 Wochen, Schaf 3-12, Femur, MG x 400

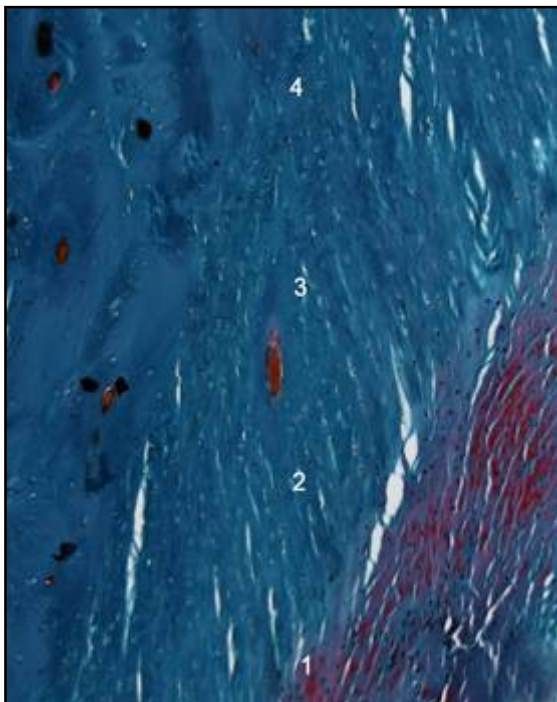


Abb. 3.18: Vierzonenaufbau einer reifen direkten Bandinsertion (Grad IV) im Bereich des posterioren Tunnelingangs; Kollagenfasern (1), unverkalkter Faserknorpel (2), Kalkfaserknorpel (3), Lamellenknochen (4); 12 Wochen, Schaf 8-12, Tibia. MG x 200

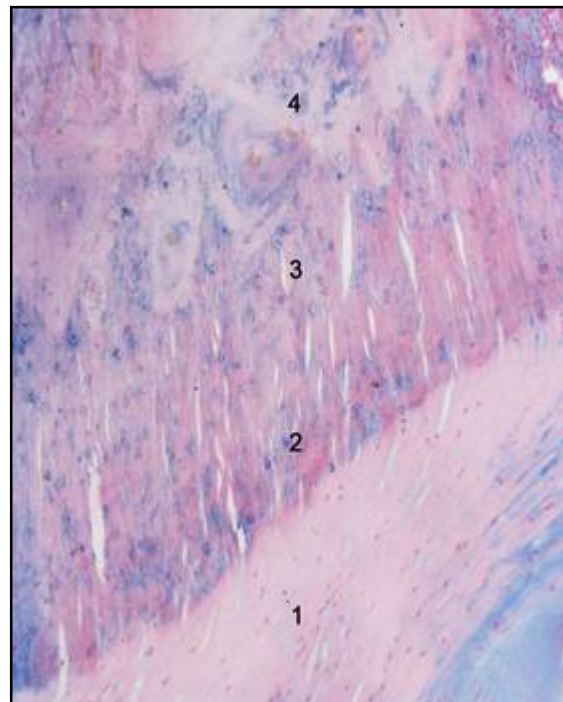


Abb. 3.19: Korrespondierender Bildausschnitt; Kollagenfasern (1), unverkalkter Faserknorpel (2), Kalkfaserknorpel (3), Lamellenknochen (4); 12 Wochen, Schaf 8-12, Tibia. AB x 200

3.2.2.2 Transplantat

Femur:

Vier transplantierte Sehnen waren im Knochenkanal verblieben und waren damit einer Beurteilung zugänglich. Sie zeigten allesamt ein fast identisches Bild aus einem zentralen avitalen Anteil, einer aufgelockerten teilweisen in Zugrichtung orientierten Faserstruktur und einem verstärkten Auftreten von zellulären Bestandteilen. Sie bestanden zum einen aus Fibroblasten und –zyten und andererseits aus einer Ansammlung von Rundzellinfiltraten, aber auch Fremdkörperriesenzellen, die sich vorwiegend in Nähe des verbliebenen Fadenmaterials gruppierten.

Tibia:

Im tibialen Knochen erschien das Transplantat besser integriert, so dass in 8 Tieren dies beurteilt werden konnten. Aber auch hier zeigten sich im Zentrum des Ligaments große Bereiche avitalen Gewebes sowie eine zum Teil vakuolige Degeneration (s. Abb. 3.20).

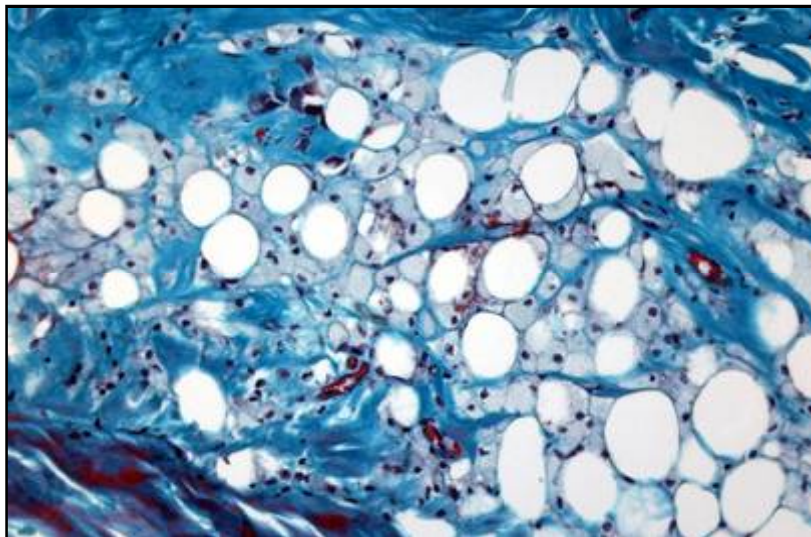


Abb. 3.20: Darstellung eines Transplantats mit vakuoliger Degeneration in zentralen Anteilen: 12 Wochen. Schaf 2-12. Tibia. MG x400

Jedoch wiesen die Randbezirke erhöhte Zahlen von Fibroblasten auf, die die der Fibrozyten überwogen. Der Aufbau zeigte sich aufgelockert aber größtenteils

orientierend strukturiert. Zudem ließen sich in der Nähe des Fadenmaterials einige Fremdkörperriesenzellen in den Rundzellinfiltraten erkennen.

3.2.2.3 Knochenumbau

Ein Knochenumbau im Sinne einer Neubildung ließ sich im gesamten Tunnel in Form von Osteoidanlagerungen feststellen, wobei die Intensität mit größerer Entfernung zum Eingang des Kanals noch zunahm. Osteoklastäre Lakunen zeigten sich dort ebenfalls gestärkt, jedoch führte das vermehrte Auftreten von aktiven Osteoblasten zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zuungunsten der Resorption. Eine Präferenz für die anteriore bzw. posteriore Seite ließ sich nicht erkennen (s. Abb. 3.21).

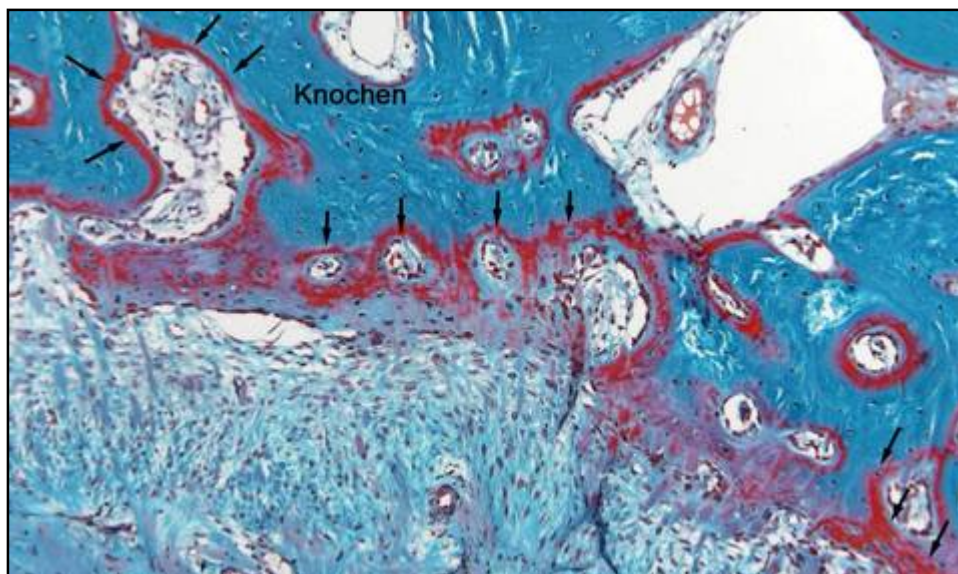


Abb. 3.21: Darstellung der zum Teil sehr kräftigen Osteoidanlagerungen im Bereich der Tunnelmitte; 12 Wochen, Schaf 9-12, Femur, MG x200

Bei den tibialen Schnitten ließ sich eine vermehrte Neubildung von Geflechtknochen aber auch verstärkt an gelenkflächennahen Bereichen des Kanals erkennen. Diese Verschiebung des Gleichgewichts bezüglich der Dynamik führte zu einer beginnenden Einengung des Tunneleingangs gegenüber Tunnelmitte und -boden.

3.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Insgesamt zeigte sich zumindest eine gleich bleibende Anreicherung der Fluorochrome im Bohrkanal, wobei die Fluoreszenz sich in manchen Bereichen sogar noch verstärkt darstellte. Dabei deutete sich eine Verschiebung der Intensität zugunsten des Tunneleingangsbereichs an.

Das nach sieben Wochen applizierte Calcein- Grün zeigte hier eine kontinuierliche Anreicherung im Verlauf des gesamten Knochenkanals, im Gegensatz zur 6-Wochengruppe sowohl auf tibialer als auch auf femoraler Seite (s. Abb. 3.22). Dabei ließ sich ein leichter Unterschied in der Einlagerung in Form breiterer, fluoreszierender Banden im Vergleich zur Vorgruppe erkennen, der sich mit zunehmender Entfernung vom Tunneleingang noch verstärkte (s. Abb. 3.24).

Eine Einlagerung des nach neun Wochen subkutan injizierten Xylenol- Oranges wies eine gleich bleibende Intensität der Fluoreszenz wie die des zuvor verabreichten Calceins auf. Wiederum zeichnete sich ein zunehmender Einbau dieses Fluorchroms im Bereich des Tunnelbodens ab, wobei es aber dieses Mal auch im Eingangsbereich zu einer verstärkten Anreicherung kam.

Das nach elf Wochen applizierte Tetracyclin ließ ebenfalls keine verminderte Einlagerung erkennen. Die im Vergleich zu den anderen angereicherten Substanzen ähnlich breiten Banden zeigte eine gleichmäßige Verteilung auf der gesamten Länge des Bohrkanals auf. Zwar war die Fluoreszenz im Tunnelboden weiterhin relativ intensiv, dennoch deutete sich eine Verlagerung des Schwerpunktes in den Bereich des Tunneleingangs an (s. Abb. 3.25).

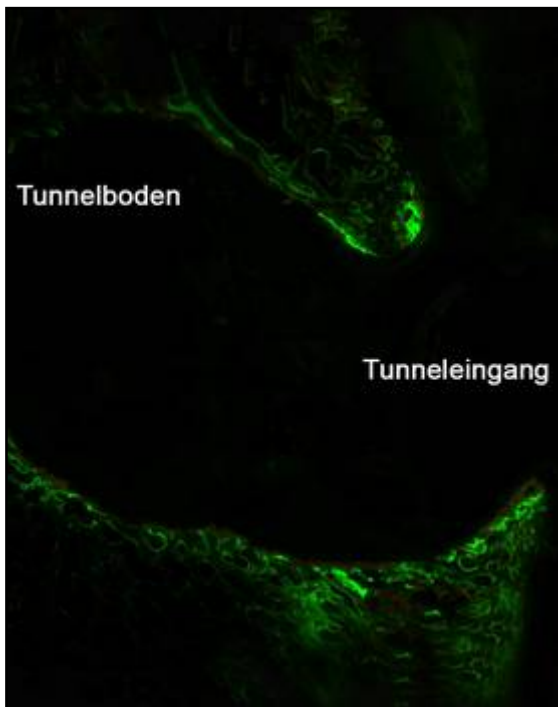


Abb. 3.22: Vermehrte Anlagerung des Calcein-Grün im Bereich des Tunneleingangs; 12 Wochen, Schaf 1-12, Femur

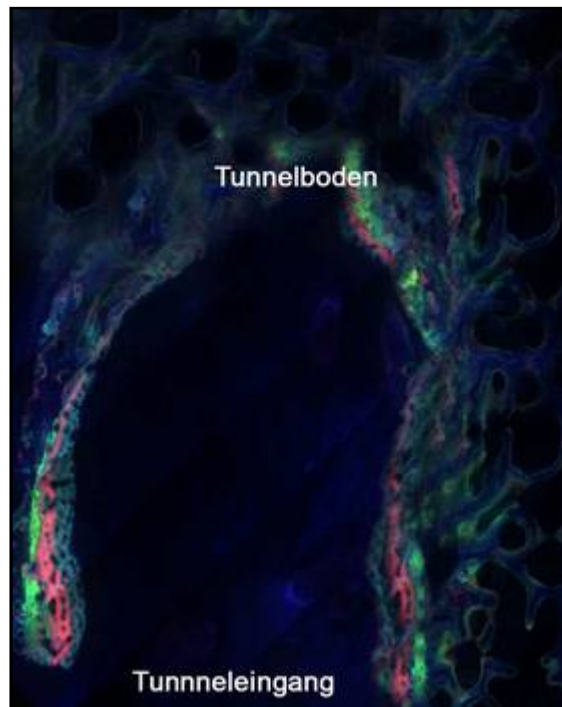


Abb. 3.23: Gleichmäßige Anlagerung aller drei Fluorochrome im gesamten Knochenkanal, bevorzugt aber im Bereich des Tunneleingangs und –bodens; 12 Wochen, Schaf 1-12, Femur

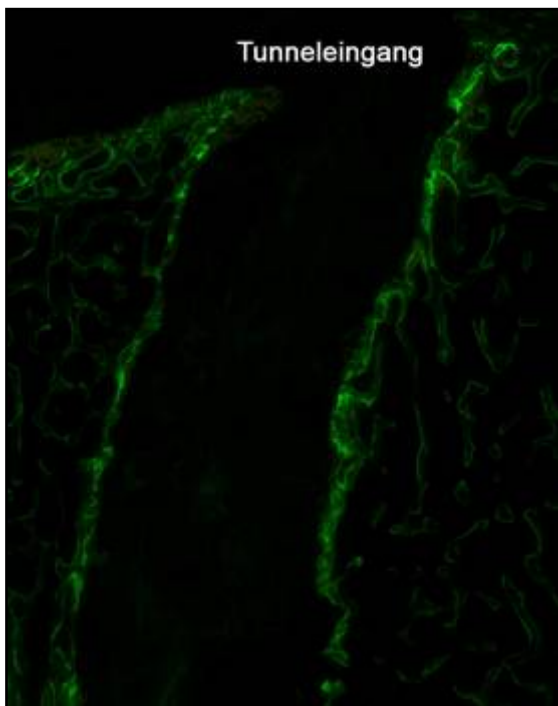


Abb. 3.24: Kontinuierliche Anlagerung des Calcein-Grün im gesamten Knochenkanal; 12 Wochen, Schaf 9-12, Tibia

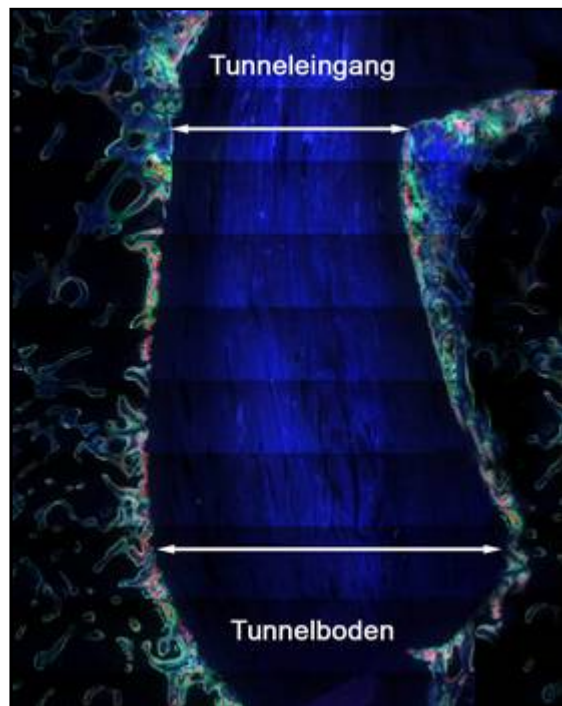


Abb. 3.25: Verstärkte Anlagerung aller drei Fluorochrome im Bereich des Tunneleingangs mit Einengung desselbigen; 12 Wochen, Schaf 8-12, Tibia

4 Diskussion

4.1 Knochen- Band- Einheilung

Ein solides knöchernes Einheilungsverhalten ist ein elementarer Faktor, der das Langzeitergebnis einer Rekonstruktion des Kreuzbandes wesentlich beeinflusst [151]. Dieses wurde für Weichteiltransplantate in einer Reihe von Arbeiten, sowohl in tierexperimentellen als auch an extraartikulären Modellen histologisch untersucht, wobei aber hauptsächlich autologe Transplantate verwendet wurden.

Die ossäre Integration von Allografts wurde zwar in einigen wenigen Studien untersucht, jedoch ist bei der Gegenüberstellung mit der hier vorgelegten Studie besonders darauf zu achten, dass nur die Arbeiten zum Vergleich herangezogen werden können, die eine extraartikuläre Verankerungstechnik verwendet haben und somit gleiche Voraussetzungen für die Einheilung des Transplantats bestanden.

Letztendlich existieren nur wenige Untersuchungen, die die Knochen- Band- Heilung von Allografts ausführlich histologisch beschreiben. An dieser Stelle sei auf die bei Kongressen bereits publizierte Beobachtungen einer Vorgruppe, die sich eingehend mit der ossären Integration von nicht behandelten allogenen Transplantaten in Relation zu autologen Grafts beschäftigt haben, hingewiesen [123]. Diese dient für die vorliegende Arbeit als Kontrollstudie, weswegen die Ergebnisse im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

Von Bedeutung ist es sicherlich auch, auf das Einheilungsverhalten mit Peressigsäure behandelte Knochenspongiosa einzugehen, da dieses bereits in diversen Studien intensiv untersucht worden ist und damit möglicherweise auch Erklärungsansätze für die in der aktuellen Arbeit gemachten Beobachtungen zu finden sind.

Die Untersuchung der Knochen- Band- Heilung freier Sehnen- transplantate anhand von autologen Material ist einer großen Anzahl von Studien untersucht worden [12, 51, 53, 114, 136, 142, 143, 148, 152, 157]. Hierbei soll exemplarisch auf zwei

Studien eingegangen werden, da die Verwendung von Autografts den Standard für die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes darstellt.

In einer Studie aus dem Jahre 2000 von Goradia et al. wurde das Einheilungsverhalten von gedoppelten Semitendinosustransplantaten in die knöcherne Umgebung nach VKB- Rekonstruktion bis 52 Wochen nach Operation an einem Schafsmodell untersucht [51]. Dabei wurden die Autografts femoral und tibial extraartikulär jeweils per Fixationsbutton fixiert. Im Unterschied dazu wurde bei der vorliegenden Arbeit, das Transplantat tibial an einer Knochenbrücke befestigt. Dennoch ist davon auszugehen, dass es dabei ähnlichen Kräften während der Einheilung ausgesetzt war. Die biomechanischen und histologischen Ergebnisse entsprachen weitestgehend den von Grana et al. bzw. Blickenstaff et al. am Kaninchenmodell gemachten Beobachtungen [12, 53]. Ab der 8. postoperativen Woche waren Sharpeysche Fasern zu erkennen, die die fibröse Zwischenschicht durchliefen und am Knochen ansetzten. So konnte hier die Ausbildung einer gereiften indirekten Knochen- Band- Insertion 24 Wochen postoperativ beschrieben werden, die bis zum Versuche keine weiteren Veränderung unterlag. Zwar konnte auch bei unserer Studie die Entwicklung einer indirekten Bandinsertion beobachtet werden, aber es zeigte sich bereits 6 Wochen postoperativ Anzeichen einer direkten Bandinsertion, die nach 12 Wochen eine weitere Reifung erfuhr. Der Versagensmodus in den biomechanischen Tests bis zur 12. Woche bestand bei der Studie von Goradia darin, dass das Transplantat aus dem Bohrtunnel glitt. Mit zunehmender Reifung der indirekten Knochen- Sehnen- Verbindung änderte sich dies in der Form, dass die Rekonstruktion ab der 24. postoperativen Woche durch ein Zerreißen des intraartikulären Transplantatanteils in der biomechanischen Testung versagte. Diese Änderung des Versagensmodus erfolgte in unserer Untersuchungen bereits nach 12 Wochen. Jedoch ist hier einschränkend zu sagen, dass im Vergleich zur bereits weiter oben erwähnten Vorgängerstudie die PES-behandelten Allografts insgesamt in allen biomechanischen Testungen im Verhältnis zu den tiefgefrorenen Allografts und den Autografts schlechter abschnitten, wobei die Unterschiede im Verlauf nach 12 Wochen immer deutlicher wurden.

Im Gegensatz zu den histologischen Ergebnissen von Goradia konnte eine Arbeitsgruppe um Weiler et al., die die extraartikuläre Verankerungstechnik mit der anatomischen Fixation mittels Interferenzschraube verglichen, bei erstgenannter Methode nach 24 Wochen Anzeichen einer direkten Bandinsertion beobachten [152]. Jedoch zeigte sich diese nur bei vier von sechs untersuchten Schafen und ausschließlich auf der anterioren Seite des tibialen Bohrtunnels, während bei der vorliegenden Arbeit alle Tiere nach 12 Wochen, tibial und femoral, Anzeichen einer direkten Bandinsertion aufwiesen, wobei sich auch hier der Reifungsgrad auf der tibialen Seite fortgeschrittener darstellte.

Eine Arbeitsgruppe um Petersen et al. konnte diese in Tierexperimenten erhobenen Befunde in ihrer Studie auf den Menschen übertragen [103]. So wurden bei Revisionseingriffen nach Reruptur einer VKB- Rekonstruktion sechs Biopsien von Hamstringsehnen und acht von Patellarsehnentransplantaten entnommen und histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die VKB- Ersatzplastik mittels der Hamstringsehnen wurde femoral per Fixationsbutton und tibial mit Hilfe einer Krampe jeweils extraartikulär fixiert. Die Gewebeproben wurden in einem Zeitraum von 6 bis 33 Monaten nach dem Primäreingriff entnommen. Dabei war zu jedem Zeitpunkt nur eine indirekte Knochen- Band- Insertion zu beobachten, in der polarisationsmikroskopisch erkennbare Sharpeysche Fasern eine Verbindung zwischen Transplantat und Geflechtknochen schufen.

Um die Studienlage bezüglich der knöchernen Einheilung autologer Sehnen- und Sehnen-Transplantate zusammenzufassen, ist die Entwicklung einer direkten Bandinsertion bei extraartikulärer Fixation eher selten. Erste Anzeichen finden sich frühestens nach 24 Wochen und dann auch nur in eingeschränktem Maße.

Die Anzahl der Arbeiten, die das knöchernen Einheilungsverhalten von allogenen im Vergleich zu autologen Transplantaten histologisch untersucht haben, ist begrenzt.

In einer 2006 veröffentlichten Studie vergleicht die Arbeitsgruppe um Zhang et al. das Einheilungsverhalten von autologen und allogenen freien Sehnen-Transplantaten

[160]. So untersuchten sie histologisch 6 und 12 Wochen, sowie 6 Monate nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes die Insertionsareale in den Kniegelenken von 12 Hunden. Dabei wurden in das rechte und linke Vorderbein eines Versuchstieres die Sehne des Musculus extensor digitorum transplantiert, wobei die eine Seite ein Transplantat autologen Ursprungs und die andere eins allogener Herkunft erhielt. Diese wurden über die an den Enden befindlichen Haltefäden an Ankerschrauben am tibialen bzw. femoralen Tunnelende befestigt. Nach 6 Wochen postoperativ zeigte sich in beiden Gruppen eine lockere Zwischenschicht zwischen Transplantat und Knochenwand. Ab der 12. postoperativen Woche organisierten sich die darin enthaltenen Kollagenfasern in der Autograft- Gruppe und es wurde die Entwicklung von vier Zonen der direkten Bandinsertion erkennbar mit der Ausbildung einer diskontinuierlichen Grenzlinie zwischen mineralisierten und unmineralisierten Faserknorpel. Bei den transplantierten allogenen Sehnen konnte eine solche Reifung nicht beschrieben werden. Zum Zeitpunkt 6 Monate nach Operation war in der autologen Gruppe eine reife direkte Bandinsertion zu beobachten. In den histologischen Präparaten der allogenen Gruppe zeigte sich lediglich eine gewellte, unregelmäßige Grenzlinie, wobei Anatomie und Reife der Insertion insgesamt denen der autologen Transplantate unterlegen war. Zwar konnte zum Untersuchungszeitpunkt 12 Wochen nach Operation neben der indirekten Bandinsertion, eine Entwicklung einer vierschichtigen Bandinsertion gesehen werden, die jedoch einerseits nur sehr schwach ausgebildet war und sich andererseits nur in der autologen Gruppe fand. Des Weiteren ist es natürlich schwierig die rein deskriptiven Ergebnisse mit unserer Auswertung anhand des semiquantitativen Scores zu vergleichen, zumal Zhang et al. keine biomechanischen Testungen durchgeführt haben und so eine Aussage über die Stabilität der Neobandinsertion nicht möglich ist.

Eine weitere aktuelle Studie von der Arbeitsgruppe um Soon et al. hat das Einheilungsverhalten von Weichteiltransplantaten allogenen Ursprungs in einem Kaninchenmodell untersucht [135]. Dabei wurden die vorderen Kreuzbänder der vorderen Extremitäten einerseits mit einem unbehandelten Allograft und andererseits mit einem mit mesenchymalen Stammzellen beschichteten Allograft rekonstruiert. Als

Transplantat dienten allogene Achillessehnen, welche dann femoral und tibial mittels einer Naht am Periost fixiert wurden. Die Untersuchungszeitpunkte wurden mit 2, 4 und 8 Wochen gewählt. Die Bandinsertion wurde histologisch und immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich ein Vorteil der beschichteten Allografts gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe sowohl in den biomechanischen Untersuchungen als auch in der Entwicklung einer Knochen-Band-Verbindung. Bezug nehmend auf unsere Studie ist besonders zu erwähnen, dass die Gruppe mit unbeschichteten Transplantaten nach 8 Wochen lediglich ein gereiftes Narbengewebe aufwies, welches von Sharpey ähnlichen Fasern durchsetzt war, während zum selben Zeitpunkt um die mit mesenchymalen Stammzellen behandelten Grafts bereits eine Schicht von mineralisiertem Knorpel zu erkennen war. Wie oben bereits erwähnt ist der Vergleich einer deskriptiven Auswertung mit unserer Arbeit schwierig, zumal die frühen Beobachtungszeitpunkte nach 2 und 4 Wochen postoperativ von uns nicht gewählt wurden. Daher ist das Ergebnis der 8-Wochengruppe zum Vergleich heranzuziehen, wo Anzeichen einer direkten Bandinsertion zu beobachten waren, die aber noch nicht in den typischen Vierzonen-Aufbau zeigten. Dies war in der vorliegenden Arbeit auch bereits 6 Wochen postoperativ zu erkennen. Eine Aussage über das erste Auftreten einer reifen direkten Bandinsertion konnte von Soon et al. nicht getroffen werden, da kein längerer Beobachtungszeitraum gewählt wurde. Angeführt sei hier noch, dass bei den Versagenstests, kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Allografts bestand, welches ein möglicherweise ein Hinweis auf die Lokalisation und das Ausmaß der Bandinsertion gibt, da vorwiegend die im Bereich des Tunneleingangs die Funktion des nativen Kreuzbandes übernimmt [51, 106]. Diese Aspekte werden in der Studie von Soon et al. nicht beschrieben.

In der bereits im Einleitungsteil erwähnte Vorgängerstudie [123] wurde das Einheilungsverhalten von autologen zu allogenen Weichteiltransplantaten untersucht. Dieser Vergleich mit der aktuellen Arbeit ist besonders aussagekräftig und soll daher ausführlich dargestellt werden, da die VKB-Rekonstruktion vom selben Operateur mit derselben Technik vorgenommen, das gleiche Transplantat verwandt wurde und die Präparate zudem auf dieselbe Art und Weise aufbereitet wurden. Hinzu kommt,

dass die Auswertung der histologischen Ergebnisse in enger Abstimmung anhand desselben semiquantitativen Scores vorgenommen wurde. Dabei wurden die Gruppen à 7 Schafe über einen Zeitraum von 52 Wochen untersucht. Als Untersuchungszeitpunkte wurden 6, 12 und 52 Wochen gewählt. Dabei konnten von den femoralen Präparaten jeweils nur sechs der histologischen Auswertung zugeführt werden.

Ähnlich wie bei der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Entwicklung einer direkten Bandinsertion auf der femoralen Seite verzögert und erreichte während des gesamten Beobachtungszeitraums in beiden Studien nicht das Niveau der tibialen Entwicklung, was sich vor allem bei den Transplantaten allogegen Ursprungs markant darstellte. So wiesen nach 6 Wochen sowohl bei den Allo- als auch bei den Autografts nur 1 von sechs femoralen Präparaten Anzeichen einer direkten Bandinsertion auf (Grad I). In den anderen 5 Fällen stellte sich lediglich eine fibröse Zwischenschicht dar, die im Bereich des Tunneleingangs von wenigen Sharpeyschen Fasern durchsetzt war. Diese fanden sich in unseren Beobachtungen zwar auch, jedoch schwerpunktmäßig im Bereich des Tunnelbodens. Im Tunneleingang bis – mitte ließen sich dahingegen bereits deutliche Anzeichen einer sich entwickelnden direkten Bandinsertion erkennen (bis hin zu Grad III).

Ähnlich stellte sich das Verhältnis auch auf der tibialen Seite dar. So wiesen nach 6 Wochen die autologen und die unbehandelten allogegen Grafts in vier bzw. fünf Fällen keine Anzeichen einer direkten Bandinsertion auf (Grad 0), in einem bzw. zwei Präparaten fanden sich vereinzelte, nicht mineralisierte Chondrocyten (Grad I). Lediglich in zwei der tibialen Knochentunnel der autologen Transplantate ließen sich eine Vielzahl von zum Teil mineralisierten Knorpelzellen erkennen (Grad II).

Diese fortgeschrittene Entwicklung einer direkten Bandinsertion bei den PES-Allografts erbrachte aber bezüglich der biomechanischen Testungen keine signifikanten Vorteile. Nach 6 Wochen beobachteten wir ähnliche biomechanische Eigenschaften in den Schubladentests bei den PES-sterilisierten Transplantaten im Vergleich zu den unsterilisierten Allografts und den Autografts. Es zeigte sich sogar im vorderen Schubladentest schon nach 6 Wochen eine signifikant größere Laxizität und eine signifikant geringere Steifigkeit der PES-behandelten Flexorensehnen zu den Autografts.

Diese Beobachtungen setzten sich in den biomechanischen Testungen nach 12 Wochen fort. Nach 12 Wochen fand sich in der PES-Gruppe bereits eine signifikant größere Laxizität und signifikant geringere Steifigkeit im kombinierten vorderen und hinteren Schubladentest gegenüber dem Autograft. Im vorderen Schubladentest ergab sich eine signifikant größere Laxizität und eine signifikant geringere Steifigkeit gegenüber den Transplantaten autologen Ursprungs sowie den unbehandelten Allografts.

Diese Ergebnisse der biomechanischen Testungen spiegelten nicht die Entwicklung der direkten Bandinsertion wieder. So war der Reifegrad der PES- Allografts bei den tibialen Präparaten fortgeschrittener als bei den unbehandelten Allografts und vergleichbar mit den histologischen Ergebnissen der Autografts nach 12 Wochen. Jedoch lässt die Änderung des Versagensmodus von einem Herausgleiten des Transplantats aus dem Bohrkanal nach 6 Wochen hin zu einem intraligamentären Reißen des PES- Allografts nach 12 Wochen eine Aussage über die mechanische Belastbarkeit im Sinne einer maximalen Versagenskraft der Neo- Bandinsertion nicht zu.

Nach 52 Wochen zeigten sowohl die autologen als auch die allogenen Transplantate bis auf eine Ausnahme den typischen Vierzonen- Aufbau einer direkten Bandinsertion (Grad IV). Dieser Beobachtungszeitraum wurde bei der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Grad der Bandinsertion	6 Wochen		12 Wochen		52 Wochen	
	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft
0	4	5	-	-	-	-
I	1	2	1	1	-	-
II	2	-	-	5	-	-
III	-	-	6	1	-	1
IV	-	-	-	-	7	6

Tab. 4.1: Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der tibialen Knochen-Band-Einheilung der Kontrollstudie der Auto- bzw. Allografts nach 6, 12 und 52 Wochen [123]

Grad der Bandinsertion	6 Wochen		12 Wochen		52 Wochen	
	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft
0	5	5	-	1	-	1
I	1	1	-	2	-	1
II	-	-	3	2	-	2
III	-	-	3	1	5	-
IV	-	-	-	-	1	2

Tab. 4.2: Zusammenfassende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der femoralen Knochen-Band-Einheilung der Kontrollstudie der Auto- bzw. Allografts nach 6, 12 und 52 Wochen [123]

Die ossäre Integration bei VKB- Rekonstruktionen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Besonders relevant ist die Auswahl und Herkunft des Transplantats sowie die Fixationsmethode im tibialen und femoralen Knochentunnel. Da es nur wenige Arbeiten gibt, die das knöcherne Einheilungsverhalten von Allografts beschreiben, wurden hier ebenfalls Studien zum Vergleich herangezogen, die Weichteiltransplantate autologen Ursprungs verwendeten. Bei allen Arbeiten wurde das Transplantat extraartikulär fixiert.

Im Vergleich zu allen anderen Studien weisen unsere histologischen Befunde Anzeichen einer direkten Bandinsertion zu einem deutlich früheren Zeitpunkt auf bzw. schritt deren Reifung auch zügiger voran. Lediglich die Arbeitsgruppe um Soon et al. konnte in der Gruppe der mit mesenchymalen Stammzellen beschichteten allogenen Transplantate nach 8 Wochen vereinzelte chondroide Zellen nachweisen [135]. Die Kontrollstudie zeigte ebenfalls Anzeichen einer direkten Bandinsertion, die aber zu einem späteren Zeitpunkt auftraten und an Qualität und Quantität den unseren gemachten Beobachtungen unterlegen waren.

In dem Vergleich mit den anderen Arbeiten wurde darauf geachtet, dass sich die Methoden und Voraussetzungen für die Einheilung möglichst wenig unterscheiden. Letztendlich ist der Vergleich mit der Kontrollstudie am aussagekräftigsten, da sie sich von unserer Arbeit nur in einem Punkt unterscheidet. Denn gegenüber den dort verwendeten fresh- frozen Allografts sind unsere Transplantate nach der Entnahme und vor dem erneuten Einsatz als VKB- Ersatz mittels des Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahrens behandelt worden. Das bedeutet, dass die Unterschiede in

der Knochen- Band- Insertion ausschließlich oder im Wesentlichen auf das Sterilisationsverfahren und den dort verwendeten Substanzen zurückzuführen sind.

Die mit dem Peressigsäure-Ethanol- Unterdruckverfahren sterilisierten Allografts wiesen in der vorliegenden Arbeit eine gegenüber den unbehandelten Transplantaten beschleunigte ossäre Integration auf. Wie bereits oben erwähnt wird dieses Verfahren bereits erfolgreich bei der Sterilisation von Knochenspongiosa verwendet. In einer Arbeit von Wildemann et al. wurden acht verschiedene Wachstumsfaktoren in mit PES- behandelten Knochentransplantaten quantifiziert, wobei drei verschiedene Methoden der Extraktion vorgenommen wurden. Dabei konnten BMP-2, BMP-4, IGF-I, VEGF, FGF α , TGF- β und PDGF nachgewiesen werden, während für FGF β der Nachweis nicht gelang. Bei Verwendung der Guanidin- Extraktion konnten dabei die größte Menge an Proteinen nachgewiesen werden. Einschränkend muss man hinzufügen, dass die Menge der nachgewiesenen Wachstumsfaktoren keinen direkten Schluss auf die Osteoinduktivität zulässt, sondern erst mit der Prüfung der Bioaktivität möglich wäre [154]. Jedoch konnte eine andere Arbeit eine gute Korrelation zwischen Osteoinduktivität und gemessener Menge an BMP-4 in demineralisierter Knochenmatrix in einem in-vivo- Modell nachweisen [62]. Hinzu kommen Studien, die das osteoinduktive Potential von knöchernen Allografts nachweisen konnten. So konnten Hansen et al. gute Ergebnisse für die Entstehung von neugebildetem Knochen bei Kraniotomien aufweisen, die mit PES- behandelte Knochenspongiosa aufgefüllt worden waren [59]. Fasst man diese Beobachtungen zusammen, kann man davon ausgehen, dass die in PES- behandelten Knochenspongiosa enthaltenen Wachstumsfaktoren ein osteoinduktives Potential besitzen, welches die ossäre Integration fördert.

Dies könnte einen Erklärungsansatz für die von uns erzielten Ergebnisse bezüglich der Knochen- Band- Einheilung des PES- behandelten Allograft darstellen, in dem die aus dem Sehngewebe freigesetzten Wachstumsfaktoren die Entwicklung einer direkten Bandinsertion positiv beeinflussen. Denn eine aktuelle immunhistochemische Untersuchung der Knochen- Band-Einheilung konnte einen Zusammenhang zwischen der Quantität von BMP-2 und BMP-7 und der mit der ossären Integration einhergehenden Neubildung knöcherner Strukturen im

Bohrtunnel nachweisen [81]. Des Weiteren untersuchte eine Arbeitsgruppe um Martinek et al. das Einheilungsverhalten von Weichteiltransplantaten, die mittels Gentransfer verändert wurden, nach VKB- Rekonstruktion in einem Kaninchenmodell. Dabei konnten sie zeigen, dass die BMP-2- Behandlung der Transplantate die Integration in den Knochentunnel signifikant verbesserten [90]. Diese Übertragung auf unser Modell ist sicherlich nur hypothetisch und lässt sich mittels unserer Studie nicht nachweisen, dennoch liefert dieser Vergleich einen möglichen Erklärungsansatz für das beobachtete Phänomen der beschleunigten Entwicklung einer direkten Bandinsertion. Weiteren Aufschluss könnte eine Analyse der Wachstumsfaktoren von PES- behandeltem Sehngewebe bringen.

Bei der Beantwortung unserer Forschungsfrage, inwieweit das Peressigsäure-Ethanol- Unterdruck- Verfahren die Knochen- Band Einheilung nach VKB- Rekonstruktion mit Allografts beeinflusst lässt sich festhalten, dass diese Form der Sterilisation die Ausbildung einer direkten Bandinsertion positiv beeinflusst. So konnte hier erstmalig bei der extraartikulären Fixation von Weichteiltransplantaten eine überwiegend reife direkte Bandinsertion bereits nach 12 Wochen nachgewiesen werden.

4.2 Transplantatremodeling

Ein weiterer wichtiger Punkt neben der Knochen- Band- Einheilung sind die morphologischen Veränderungen des Transplantats während der Einheilungsphase. So konnte in histologischen und biomechanischen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine mit dem Remodelingprozess einhergehende partielle Nekrose des intrakanalikulären Anteil des Transplantats zu einem Verlust der Steifigkeit der Rekonstruktion und damit letztendlichen zu einem Versagen der VKB- Rekonstruktion führen kann, wie es auch bei anderen Arbeiten mit extraartikulärer Verankerungstechnik beobachtet werden konnte [12, 24, 49, 51, 53, 142].

Nach sechs Wochen waren sämtliche Transplantate in der vorliegenden Studie bis auf einen schmalen Randsaum während der biomechanischen Testung aus dem Knochenkanal herausgeglitten. Dieses Phänomen wird als Degloving bezeichnet. Bemerkenswert waren die großen avitalen Zonen im zentralen Anteil des Transplantats. Dieser Versagensmodus wurde auch von anderen Autoren in der frühen Einheilungsphase bei der Verwendung von Autografts beschrieben [12, 24, 51, 142]. In der oben bereits erwähnten Arbeit von Soon et al. wurden die Mehrzahl (jeweils 72%) der Transplantate sowohl in der behandelten und unbehandelten Gruppe beim Versagenstest nach 2 und 4 Wochen aus dem Knochenkanal gezogen [135].

Nach 12 Wochen waren die Allografts in der vorliegenden Arbeit aufgrund des veränderten Versagensmodus im Sinne einer Ruptur der intraartikulären Bandstruktur im Bohrtunnel verblieben. Dies zeigte sich auch in der Studie von Soon et al., in der 6 von 7 bzw. 5 von 7 Transplantaten in den mit mesenchymalen Stammzellen behandelten bzw. den unbehandelten diesen Versagensmodus nach 8 Wochen aufwiesen, wobei die maximale Versagenkraft im Vergleich zu den 2- und 4- Wochengruppen sich nicht signifikant veränderte. Bei unseren biomechanischen Testungen verringerte sich jedoch die maximale Versagenkraft nach 12 Wochen. Sie war signifikant niedriger als nach 6 Wochen und im ebenfalls signifikant niedriger als die unbehandelten Allografts der Kontrollstudie [122].

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Schwachstelle in der frühen Einheilungsphase die Verbindung zwischen Transplantat und Knochentunnel darstellt und damit abhängig von der Geschwindigkeit der ossären Integration ist [51, 106]. Die von uns gemachten Beobachtungen weisen auf eine Schwäche des Transplantats und somit auf eine negative Beeinflussung des Sterilisationsverfahrens auf das Transplantatremodeling hin, obwohl es bei denen im Vorfeld durchgeführten in- vitro- Versuchen keinen Anhalt dafür gab [109]. Die Untersuchungen des Remodelings, der Revaskularisierung sowie der Kollagenanalyse (Dissertation Johannes Gonnermann bzw. Julia Kamp) zeigen signifikant verzögerte Entwicklungen in der Gruppe der PES- Allografts [120].

4.3 Relevanz der Untersuchungsergebnisse für den klinischen Alltag

Natürlich muss man hierbei im Vorfeld festhalten, dass im Tierexperiment erhobene Befunde nicht unmittelbar auf den Menschen zu übertragen sind. So muss z.B. davon ausgegangen werden, dass gewisse immunologisch- biologische Reaktionen sowie der Stoffwechsel eines Tieres von denen des Menschen abweichen und somit möglicherweise die Heilungsprozesse nach VKB- Rekonstruktion beschleunigt ablaufen. Das Schaf als Versuchstier stellt in unserer Studie mit einem Durchschnittsgewicht von 72 kg annähernd gleiche Voraussetzungen wie in der klinischen Belastungssituation, obwohl die Gewichtlast bei Vierbeinern natürlicherweise anders verteilt ist.

Des Weiteren unterscheidet sich das hier verfolgte postoperative Management von dem im klinischen Alltag durchgeführten angepassten Rehabilitationsprogramm, indem die Schafe hierbei das operierte unbegrenzt belasten durften und bereits innerhalb von zwei Wochen nach anfänglichem Schonhinken ein normales Gangbild und damit eine Vollbelastung aufwiesen. Ausgehend von dem Aspekt, dass die dabei auftretenden Kräfte als Promoter für die Entwicklung einer direkten Bandinsertion fungieren [157], weicht demzufolge die Dynamik der Einheilung des freien Sehnentransplantats im Tiermodell von der im Menschen ab.

Im Vergleich zu anderen Tierarten (z.B. Hund, Schwein oder Kaninchen) weist das Schaf bezüglich Anatomie, Morphologie sowie den biomechanischen Eigenschaften des Kniegelenks viele Parallelen zum Menschen auf [2, 64, 111], so dass es sich in der orthopädischen Forschung gegenüber anderen Tiermodellen durchgesetzt hat [2, 3, 14-16, 50-52, 64, 110, 111, 126, 148, 149]. Dabei erwiesen sich der Umgang und die Haltung der Schafe nach der Operation als vorteilhaft. Bei anderen bei VKB- Rekonstruktion verwendeten Tiermodellen wie z.B. dem Schwein [156] gestaltet sich das postoperative Handling schwierig. Bei Studien mit Hunden gibt es Hinweise für das vermehrte Auftreten von Knorpeldefekten nach VKB- Rekonstruktion [48]. Des Weiteren wurde auch in einigen Studien anhand von Kleintiermodellen die Transplantateinheilung untersucht [43, 54, 78, 85, 133, 153]. Jedoch ist eine Übertra-

gung der Ergebnisse auf den Menschen aufgrund der mit der Käfighaltung verbundenen minimalen postoperativen Belastung schwierig. Außerdem haben z.B. die dabei oft eingesetzten Kaninchen eine Neigung zur Automutilisation, wobei es Wundheilungsstörungen oder gar Tierverlusten kommen kann.

Bei Befestigung des Transplantats außerhalb des Gelenks, kann es bedingt durch die relative Bewegungsfreiheit des Transplantats im Tunnelbereich verbunden mit einer Aufweitung des Bohrtunnels zu einer Beeinträchtigung der Ausbildung einer Neoinsertion kommen, welches sich als Verzögerung der Einheilung zeigen kann. Diese wird als mögliche Ursache der Beobachtung einer erhöhten Auslockerungsrate bei extraartikulärer Fixation wie sie in klinischen Studien beobachtet wurde [61, 66, 70, 73, 94, 150] angeführt. In den etablierten Tiermodellen zur Untersuchung der Knochen- Band- Heilung hat sich jedoch das Modell der extraartikulären Verankerung durchgesetzt, da eine gelenknahe Verankerung eine Platzierung des Verankerungsobjektes am zu beobachtenden Knochen- Band- Interface erfordert und dieses und die histologische Analyse dadurch deutlich beeinträchtigt ist. Da vor allem in der Kontrollgruppe der nicht- sterilisierten allogenen Transplantate das identische Modell verwendet wurde, ist die Möglichkeit einer Aussage über den Einfluss des PES- Verfahrens auf die Knochen- Band- Heilung nicht eingeschränkt. Histologische Untersuchungen der Knochen- Sehnen- Einheilung von allogenen Transplantaten nach Sterilisation mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck-Verfahren existieren bisher nicht.

Die suffiziente Knochen- Band- Einheilung ist zwar ein wichtiges, aber nicht das einzige Kriterium, um den Erfolg des Sterilisationsverfahrens bei Behandlung von Sehnentransplantaten zur Rekonstruktionen des vorderen Kreuzbandes einzuschätzen. Hinzu kommen andere Teilaspekte, die im Rahmen dieser Studie ebenfalls mit untersucht wurden. So wurde die Revaskularisierung und das Transplantatremodeling auf das Gesamtergebnis untersucht, was letztendlich im Gesamten durch die biomechanischen Untersuchungen objektiviert werden konnte. Dabei zeigte sich eine deutliche nachteilige Beeinträchtigung des intraartikulären Umbaus sowie der biomechanischen Eigenschaften.

Diese negativen Ergebnisse überwogen die positiven Beobachtungen der Knochen-Band-Heilung, so dass aktuell die PES-Sterilisation des gesamten Weichteiltransplantates als Ersatz des vorderen Kreuzbandes nicht empfohlen werden kann.

Obwohl der Einsatz der Peressigsäure in diesem vorliegenden Modell der vorderen Kreuzbandrekonstruktion aufgrund seiner negativen Auswirkungen auf das intraartikuläre Transplantatremodeling und die Revaskularisierung nicht geeignet ist, lassen die Ergebnisse der Knochen-Band-Heilung möglicherweise einen Einsatz des Peressigsäure-Unterdruck-Verfahrens auf anderen Gebieten zu. So könnten die Vorteile der beschleunigten Knochen-Band-Heilung als lokal begrenzter Effekt genutzt werden, z.B. bei der lokalen Applikation der Peressigsäure auf dem Anteil des Transplantats, der im Bohrkanal liegt. Des Weiteren wäre neben der bereits etablierten Sterilisation von Knochenspongiosa eine Verwendung überall dort denkbar, wo eine Knochen-Band-Heilung bei extraartikulärer Befestigung notwendig ist wie z.B. bei operativen Eingriffen der posterolateralen bzw. posteromedialen Stabilisierung sowie bei der operativen Therapie von Patellarsehenrissen. Dabei besteht weiterer Forschungsbedarf in der Verifizierung der Hypothese, dass es über eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren analog zu den PES-behandelten Knochenspongiosa zu einer beschleunigten ossaren Integration des Transplantats kommt.

5 Zusammenfassung

Die Sterilisation von Allografts für die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes ist eine Grundvoraussetzung, um eine Übertragung von Infektionskrankheiten zu verhindern. Jedoch existieren zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Sterilisationsmethoden, die einerseits eine diesbezüglich ausreichende Sicherheit bieten, ohne andererseits die biologischen und biomechanischen Eigenschaften der behandelten Transplantate zu beeinträchtigen.

Das Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren hat sich bei der Sterilisation von Knochengewebe im klinischen Alltag bewährt und hat auch bei der Verwendung für Sehngewebe in einem in vitro- Versuch keine negative Beeinflussung der biologischen und biomechanischen Eigenschaften gezeigt. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, die die Knochen- Band- Einheilung während der frühen Heilungsphase von allogenen Bandtransplantaten als Ersatz des vorderen Kreuzbandes nach Sterilisation mit dem Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck- Verfahren in einem in-vivo Modell untersucht hat.

Bei insgesamt 18 Schafen wurde eine Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mit einer PES- sterilisierten, allogenen Weichteiltransplantat (Flexorensehne) vorgenommen und dabei das Transplantat extraartikulär fixiert. Als Standzeiten wurden sechs und zwölf Wochen gewählt. Neben den histologischen Untersuchungen der Knochen- Band- Einheilung wurden auch biomechanische Testungen durchgeführt sowie das Transplantatremodeling und die Revaskularisierung untersucht. Die Ergebnisse wurden in Bezug mit einer vorangegangenen Studie gesetzt, die eben diese Aspekte bei Autografts und fresh-frozen Allografts betrachtet haben.

Verglichen mit den fresh- frozen Allografts aus der Vorgängerstudie wiesen die PES- Allografts nach 6 und 12 Wochen eine weiter fortgeschrittene Knochen- Band- Heilung auf, vergleichbar mit den histologischen Ergebnissen der Autografts. Zum späteren Zeitpunkt war diese Entwicklung auf der tibialen Seite ausgeprägter als auf der femoralen. Dies lässt eigentlich vermuten, dass die verbesserte Bandinsertion auch verbesserte mechanische Eigenschaften der gesamten VKB- Rekonstruktion

beinhaltet. In unseren biomechanischen Testungen wiesen die PES- Allografts jedoch signifikant schlechtere strukturelle Eigenschaften auf. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Wichtigkeit der Untersuchungen der Knochen- Band- Einheilung einerseits sowie des intraartikulären Transplantatremodelings andererseits, wobei sich dieser Prozess bei den PES- behandelten Allografts im Vergleich zu den nicht-sterilisierten signifikant verzögert zeigte.

Daher kann aktuell die Verwendung des Peressigsäure- Ethanol- Unterdruck-Verfahrens zur Sterilisation des gesamten Weichteiltransplantates als Ersatz des vorderen Kreuzbandes nicht empfohlen werden.

6 Literatur

1. Aglietti, P, Buzzi, R, D'Andria, S, Zaccherotti, G (1993), *Patellofemoral problems after intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction*. Clin Orthop Rel Res, (288): 195-204.
2. Allen, MJ, Houlton, JE, Adams, SB, Rushton, N (1998), *The surgical anatomy of the stifle joint in sheep*. Vet Surg, 27 (6): 596-605.
3. Amendola, A, Fowler, P (1992), *Allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model. The effect of synthetic augmentation*. Am J Sports Med, 20 (3): 336-346.
4. Anderson, AF, Dome, D, Gautam, S, Awh, M, Rennirt, G (2001), *Correlation of antropometric measurements, strength, anterior cruciate ligament size, and intercondylar notch characteristics to sex differences in anterior cruciate ligament tears*. Am J Sports Med, 29: 58-63.
5. Arnoczky, SP (1983), *Anatomy of the anterior cruciate ligament*. Clin Orthop Rel Res, (172): 19-25.
6. Aune, AK, Holm, I, Risberg, MA, Jensen, HK, Steen, H (2001), *Four-strand hamstring tendon autograft compared with patellar tendon-bone autograft for anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 29 (6): 722-728.
7. Barrett, G, Stokes, D, White, M (2005), *Anterior cruciate ligament reconstruction in patients older than 40 years: allograft versus autograft patellar tendon*. Am J Sports Med, 33: 1505-1512.
8. Bartlett, R, Clatworthy, MG., Nguyen, TN (2001), *Graft selection in reconstruction of the anterior cruciate ligament*. J Bone Joint Surg, 83: 625-634.
9. Beart, D, Kyberd, PJ, O'Connor, JJ (1994), *Reflex hamstring contraction latency in anterior cruciate deficiency*. J Orthop Res, 12: 219-228.
10. Becker, W (1971), *[Electronmicroscopic studies of tendon insertion into bones]*. Arch Orthop Unfallchir, 69 (4): 315-329.
11. Benjamin, M, Evans, EJ, Copp, L (1986), *The histology of tendon attachments to bone in man*. J Anat, 149: 89-100.

12. Blickenstaff, KR, Grana, WA, Egle, D (1997), *Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model*. Am J Sports Med, 25 (4): 554-559.
13. Bonamo, J, Krinick, RM, Sporn, AA (1984), *Rupture of the patellar ligament after use of its central third for anterior cruciate reconstruction. A report of two cases*. J Bone Joint Surg Am, 66: 1294-1297.
14. Bosch, U, Decker, B, Kasperczyk, W, Nerlich, A, Oestern, HJ, Tscherne, H (1992), *The relationship of mechanical properties to morphology in patellar tendon autografts after posterior cruciate ligament replacement in sheep*. J Biomech, 25 (8): 821-830.
15. Bosch, U, Kasperczyk, WJ (1992), *Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction--a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model*. Am J Sports Med, 20 (5): 558-566.
16. Bosch, U, Kasperczyk, WJ, Oestern, HJ, Tscherne, H (1994), *The patellar tendon graft for PCL reconstruction. Morphological aspects in a sheep model*. Acta Orthop Belg, 60 (Suppl 1): 57-61.
17. Bouchard, C, Theriault, G, Gauthier, J, Morin, F, Simoneau, J (1993), *Fracture of the patella during rehabilitation of the knee extensor muscles following reconstruction of the anterior cruciate ligament: a brief report*. Clin J Sports Med, 3: 118-122.
18. Bright, R (1987), *Sterilization of human bone by irradiation*. In: Friedlaender GE et. al., Osteochondral allografts, biology, banking and clinical applications: 223-232.
19. Buck, B, Malinin, TI, Brown, MD (1989), *Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Clin Orthop Relat Res, 240: 129-136.
20. Bundesgesundheitsamt (1986), *Empfehlungen des BGA*. BGB, 1: 21-22.
21. Butler, DL, Noyes, FR, Grood, ES (1980), *Ligamentous restraints to anterior-posterior drawer in the human knee. A biomechanical study*. J Bone Joint Surg Am, 62 (2): 259-270.
22. Chen, C, Chen, WJ, Shih, CH (1999), *Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon-patellar bone autograft*. J Trauma, 46: 678-682.

23. Claes, L, Ludwig, J, Margevicius, KJ, Durselen, L (1995), *Biological response to ligament wear particles*. J Appl Biomater., 6: 35-41.
24. Clancy, WG Jr, Narechania, RG, Rosenberg, TD, Gmeiner, JG, Wisnefske, DD, Lange, TA (1981), *Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys*. J Bone Joint Surg Am, 63 (8): 1270-1284.
25. Clark, J, Stechschulte, DJ Jr (1998), *The interface between bone and tendon at an insertion site: a study of the quadriceps tendon insertion*. J Anat, 192: 605-616.
26. Comley, A, Krishnan, J (1999), *Donor site morbidity after quadriceps tendon harvest for rotator cuff repair*. Aust N Z J Surg., 69: 808-810.
27. Cooper, RR, Misol, S (1970), *Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study*. J Bone Joint Surg Am, 52 (1): 1-20.
28. Corry, IS, Webb, JM, Clingeleffer, AJ, Pinczewski, LA (1999), *Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. A comparison of patellar tendon autograft and four-strand hamstring tendon autograft*. Am Journal Sports Med, 27 (4): 444-454.
29. Crawford, C, Kainer, M, Jernigan, D, Banerjee, S, Friedman, C, Ahmed, F, Archibald, LK (2005), *Investigation of Postoperative Allograft-Associated Infections in Patients Who Underwent Musculoskeletal Allograft Implantation*. Clin Inf Dis, 41: 195-200.
30. Dandy, D, Gray, AJ (1994), *Anterior cruciate ligament reconstruction with the Leeds-Keio prosthesis plus extra-articular tenodesis. Results after six years*. J Bone Joint Surg, 76: 193-197.
31. DeLay, BS, Smolinski, RJ, Nicoletta, RJ, Bowman, D. *Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction: results of a survey*. in *68th Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2001. San Francisco, CA, USA.
32. Diermann, N, Schumacher, T, Schanz, S, Raschke, MJ, Petersen, W, Zantop, T (2009), *Rotational instability of the knee: internal tibial rotation under a simulated pivot shift test*. Arch Orthop Trauma Surg, 129: 353-358.
33. Dodds, JA, Arnoczky, SP (1994), *Anatomy of the anterior cruciate ligament: a blueprint for repair and reconstruction*. Arthroscopy, 10 (2): 132-139.

34. Dolgo-Saburoff, B (1929), *Über Ursprung und Insertion der Skelettmuskeln*. Anat. Anz., 68: 80-87.
35. Donath, K (1988), *Die Trenn- Dünnschliff- Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien*. Der Präparator, 34: 197-200.
36. Durselen, L, Claes, L, Ignatius, A, Rubenacker, S (1996), *Comparative animal study of three ligament prostheses for the replacement of the anterior cruciate and medial collateral ligament*. Biomaterials, 17: 977-982.
37. Eastlund, T (2006), *Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation*. Cell Tissue Bank, 7: 147-166.
38. Ejerhed, L, Kartus, J, Sernert, N, Kohler, K, Karlsson, J (2003), *Patellar tendon or semitendinosus tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction? A prospective randomized study with a two-year follow-up*. Am J Sports Med, 31 (1): 19-25.
39. Engebretsen, L, Benum, P, Fasting, O, Molster, A, Strand, T (1990), *A prospective, randomized study of three surgical techniques for treatment of acute ruptures of the anterior cruciate ligament*. Am J Sports Med, 18 (6): 585-590.
40. Feller, JA, Webster, KE, Gavin, B (2001), *Early post-operative morbidity following anterior cruciate ligament reconstruction: patellar tendon versus hamstring graft*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 9 (5): 260-266.
41. Fideler, Vangsness CT Jr, Lu, B, Orlando, C, Moore, T (1995), - *Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human*. Am J Sports Med, 23 (5): 643-646.
42. Fideler, BM, Vangsness, CT Jr, Moore, T, Li, Z, Rasheed, S (1994), *Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera*. J Bone Joint Surg Am, 76 (7): 1032-1035.
43. Forward, AD, Cowan, RJ (1963), *Tendon suture to bone*. J Bone Joint Surg Am, 45-A (4): 807-823.

44. Fromm, B, Kummer, W (1994), *Nerve supply of anterior cruciate ligaments and of cryopreserved anterior cruciate ligaments allografts: an new method for the differentiation of the nervous tissues*. Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc, 2: 118-122.
45. Gillquist, J, Odensten, M (1993), *Reconstruction of old anterior cruciate ligament tears with a Dacron prosthesis. A prospective study*. Am J Sports Med, 21: 358-366.
46. Girgis, FG, Marshall, JL, Monajem, A (1975), *The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis*. Clin Orthop Rel Res, (106): 216-231.
47. Glousman, R, Shields, C Jr, Kerlan, R, Jobe, F, Lombardo, S, Yocum, L, Tibone, J, Gambardella, R (1988), *Gore-Tex prosthetic ligament in anterior cruciate deficient knees*. Am J Sports Med, 16: 321-326.
48. Goertzen, M, Dellmann, A, Gruber, J, Clahsen, H, Burring, KF (1993), *[Homologous cruciate ligament transplantation as intra-articular ligament replacement]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 131 (2): 179-186.
49. Goradia, V, Grana, WA, Egle, DM. *Biomechanics of endoscopic ACL reconstructions: semitendinosus versus patellar tendon grafts*. in *16th Annual Meeting of the AANA*. 1997.Cleveland, Ohio, USA.
50. Goradia, VK, Rochat, MC, Grana, WA, Egle, DM (1998), *Strength of ACL reconstructions using semitendinosus tendon grafts*. Journal - Oklahoma State Medical Association, 91 (5): 275-277.
51. Goradia, VK, Rochat, MC, Grana, WA, Rohrer, MD, Prasad, HS (2000), *Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model*. Am J Knee Surg, 13 (3): 143-151.
52. Goradia, VK, Rochat, MC, Kida, M, Grana, WA (2000), *Natural history of a hamstring tendon autograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model*. Am J Sports Med, 28 (1): 40-46.
53. Grana, WA, Egle, DM, Mahnken, R, Goodhart, CW (1994), *An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model*. Am J Sports Med, 22 (3): 344-351.

-
54. Grassman, SR, McDonald, DB, Thornton, GM, Shrive, NG, Frank, CB (2002), *Early healing processes of free tendon grafts within bone tunnels is bone-specific: a morphological study in a rabbit model*. *Knee*, 9 (1): 21-26.
 55. Griffin, L, Agel, J, Albohm, MJ, Arendt, EA, Dick, RW, Garrett, WE, Garrick, JG, Hewett, TE, Huston, L, Ireland, ML, Johnson, RJ, Kibler, WB, Lephart, S, Lewis, JL, Lindenfeld, TN, Mandelbaum, BR, Marchak, P, Teitz, CC, Wojtys, EM (2000), *Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies*. *J Am Acad Orthop Surg*, 8: 141-150.
 56. Grüber J, WD, Lierse W (1986), *Der vordere Kreuzbandreflex (ACL Reflex)*. *Unfallchirurg*, 89: 551-554.
 57. Halata, Z, Haus, J (1989), *The ultrastructure of sensory nerve endings in the human anterior cruciate ligament*. *Anat Embryol*, 179: 415-422.
 58. Hamner, DL, Brown, CH Jr, Steiner, ME, Hecker, AT, Hayes, WC (1999), *Hamstring tendon grafts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: biomechanical evaluation of the use of multiple strands and tensioning techniques*. *J Bone Joint Surg Am*, 81 (4): 549-557.
 59. Hansen, A, Pruss, A, Gollnick, K, Bochentin, B, Denner, K, von Versen, R (2001), *Demineralized Bone Matrix-stimulated Bone Regeneration in Rats Enhanced by an Angiogenic Dipeptide Derivate*. *Cell Tissue Bank*, 2: 69-75
 60. Hertel, P (1996), *Frische und alte Kniebandverletzungen*. *Unfallchirurg*, 99: 686-700.
 61. Höher, J, Scheffler, SU, Withrow, JD, Livesay, GA, Debski, RE, Fu, FH, Woo, SL (2000), *Mechanical Behavior of Two Hamstring Graft Constructs for Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament*. *J Orthop Res*, 18 (3): 456-461.
 62. Honsawek, S, Powers, R, Wolfenbarger, L (2005), *Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model*. *Cell Tissue Bank*, 6: 13-23
 63. Hungervorst, T, Brand, RA (1998), *Current concepts review- Mechanoreceptors in joint function*. *J Bone Joint Surg Am*, 80: 1365-1378.

-
64. Hunt, P, Scheffler, SU, Unterhauser, FN, Weiler, A (2004), *A model of soft-tissue graft anterior cruciate ligament reconstruction in sheep*. Arch Orthop Trauma Surg, 16: 16.
 65. Hurov, JR (1986), *Soft-tissue bone interface: how do attachments of muscles, tendons, and ligaments change during growth? A light microscopic study*. J Morphol, 189 (3): 313-325.
 66. Ishibashi, Y, Rudy, TW, Livesay, GA, Stone, JD, Fu, FH, Woo, SL (1997), *The effect of anterior cruciate ligament graft fixation site at the tibia on knee stability: evaluation using a robotic testing system*. Arthroscopy, 13 (2): 177-182.
 67. Jackson, D, Grood, E, Goldstein, J, Rosen, M, Kurzweil, P, Cummings, J (1993), *Comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model*. Am J Sports Med, 21: 176-185.
 68. Jackson, D, Windler, GE, Simon, TM (1990), *Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene*. Am J Sports Med, 18 (1): 1-10.
 69. Jackson, DW, Corsetti, J, Simon, TM (1996), *Biologic incorporation of allograft anterior cruciate ligament replacements*. Clin Orthop Rel Res, (324): 126-133.
 70. Jansson, KA, Harilainen, A, Sandelin, J, Karjalainen, PT, Aronen, HJ, Tallroth, K (1999), *Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with the hamstring autograft and endobutton fixation technique. A clinical, radiographic and magnetic resonance imaging study with 2 years follow-up*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 7 (5): 290-295.
 71. Jensen, K, Klein, W (1990), *Probleme und Komplikationen beim künstlichen Bandersatz*. Arthroskopie, 3: 15-23.
 72. Jonsson, H, Riklund-Ahlström, K, Lind, J (2004), *Positive pivot shift after ACL reconstruction predicts later osteoarthritis: 63 patients followed 5-9 years after surgery*. Acta Orthop Scand, 75 (5): 594-599.
 73. Jørgensen, U, Thomsen, HS (2000), *Behavior of the graft within the bone tunnels following anterior cruciate ligament reconstruction, studied by cinematic magnetic resonance imaging*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, (8): 32-35.

-
74. Kainer, M, Linden, JV, Whaley, DN, Holmes, HT, Jarvis, WR, Jernigan, DB, Archibald, LK (2004), *Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts*. N Engl J Med., 350: 2564-2571.
 75. Kartus, J, Magnusson, L, Stener, S, Brandsson, S, Eriksson, BI, Karlsson, J (1999), *Complications following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. A 2-5-year follow-up of 604 patients with special emphasis on anterior knee pain*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 7 (1): 2-8.
 76. Kartus, J, Stener, S, Lindahl, S, Engstrom, B, Eriksson, BI, Karlsson, J (1997), *Factors affecting donor-site morbidity after anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone autografts*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 5: 222-228.
 77. Kennedy, JC, Weinberg, HW, Wilson, AS (1974), *The anatomy and function of the anterior cruciate ligament. As determined by clinical and morphological studies*. J Bone Joint Surg Am, 56 (2): 223-235.
 78. Kernwein, GA (1942), *A study of tendon implantations into bone*. Surg Gynecol Obstet, 75: 794-796.
 79. Klein, W, Jensen, KU (1992), *Synovitis and artificial ligaments*. Arthroscopy, 8: 116-124.
 80. Knese, KH, Biermann, H (1958), *Die Knochenbildung an Sehnen und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen*. Z Zellforsch., 49: 142-187.
 81. Kohno, T, Ishibashi, Y, Tsuda, E, Kusumi, T, Tanaka, M, Toh, S (2007), *Immunohistochemical demonstration of growth factors at the tendon-bone interface in anterior cruciate ligament reconstruction using a rabbit model*. J Orthop Sci, 12: 67-73.
 82. Kummer, B, Yamamoto (1988), *Funktionelle Anatomie der Kreuzbänder*. Arthroskopie, 1: 2-10.
 83. Kusswetter, W, Refior, HJ (1985), *[Comparative light and scanning electron microscopy studies of the morphologic structure of ligament insertions into the bone]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 123 (5): 876-879.

-
84. Lipscomb, AB, Johnston, RK, Snyder, RB, Warburton, MJ, Gilbert, PP (1982), *Evaluation of hamstring strength following use of semitendinosus and gracilis tendons to reconstruct the anterior cruciate ligament*. Am J Sports Med, 10 (6): 340-342.
 85. Liu, SH, Panossian, V, Al-Shaikh, R, Tomin, E, Shepherd, E, Finerman, GA Lane, JM (1997), *Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing*. Clin Orthop Rel Res, (339): 253-260.
 86. Lomas, R, Jennings, LM, Fisher, J, Kearney, JN (2004), *Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts*. Cell Tissue Bank, 5 (4): 149-160.
 87. Lutz, B, Malecki, JM, Morse, AC, Wiersma S, Perrotta, D (2001), *Septic arthritis following anterior cruciate ligament reconstruction using tendon allografts- Florida and Louisiana, 2000*. In MMWR Morb Mortal Wkly Rep., National Center for Infectious Diseases. 1081-1083.
 88. Maletius, W, Gillquist, J (1997), *Long-term results of anterior cruciate ligament reconstruction with a Dacron prosthesis. The frequency of osteoarthritis after seven to eleven years*. Am J Sports Med, 25 (3): 288-293.
 89. Markolf, KL, Mensch JS, Amstutz HC (1976), *Stiffness and laxity of the knee- the contribution of the supporting structures*. J Bone Joint Surg Am, 58: 583-593.
 90. Martinek, V, Latterman, C, Usas, A, Abramowitch, S, Woo, S, Fu, F, Huard, J (2002), *Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study*. J Bone Joint Surg Am, 84: 1123-1131
 91. Menschik, A (1974), *[Mechanics of the knee-joint. 1 (author's transl)]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 112 (3): 481-495.
 92. Mickelsen, P, Morgan, SJ, Johnson, WA, Ferrari, JD (2001), *Patellar tendon rupture 3 years after anterior cruciate ligament reconstruction with a central one third bone-patellar tendon-bone graft*. Arthroscopy, 17: 648-652.
 93. Miyasaka, KC, Daniel, DM, Stone, ML, Hirshman, P (1991), *The incidence of knee ligament injuries in the general population*. Am J Knee Surg, 4 (1): 3-8.

-
94. Nebelung, W, Becker, R, Merkel, M, Ropke, M (1998), *Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with semitendinosus tendon using Endobutton fixation on the femoral side.* Arthroscopy, 14 (8): 810-815.
 95. Nikolaou, PK, Seaber, AV, Glisson, RR, Ribbeck, BM, Bassett, FH 3rd (1986), *Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique.* Am J Sports Med, 14 (5): 348-360.
 96. Noyes, FR, Barber-Westin, S (1993), *Allograft reconstruction of the anterior and posterior cruciate ligaments: Report of ten-year experience and results.* Instr Course Lect, 42: 381-396.
 97. Odensten, M, Gillquist, J (1985), *Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction.* J Bone Joint Surg Am, 67 (2): 257-262.
 98. Ostrowski, K (1968), *Free radicals in bone grafts sterilized with ionizing radiation.* Sborn Ved Prac Lek, Fak Karlov Univ (Suppl): 561-563.
 99. Park, MJ, Lee, MC, Seong, SC (2001), *A comparative study of the healing of tendon autograft and tendon-bone autograft using patellar tendon in rabbits.* Int Orthop, 25 (1): 35-39.
 100. Pässler, H, Stadler, J, Berger, R (1987), *Ergebnisse der operativen Behandlung von 200 veralteten Kreuzbandrupturen mit einem Kunststoffband.* Hefte zu Unfallheilkd, 189: 963.
 101. Paulos, L, Rosenberg, TD, Drawbert, J, Manning, J, Abbott, P (1987), *Infrapatellar contracture syndrome. An unrecognized cause of knee stiffness with patella entrapment and patella infera.* Am J Sports Med, 15: 331-341.
 102. Petersen, R, Shelton, W, Bomboy, A (2000), *Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction.* Arthroscopy, 17: 9-13.
 103. Petersen, W, Laprell, H (2000), *Insertion of autologous tendon grafts to the bone: a histological and immunohistochemical study of hamstring and patellar tendon grafts.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 8 (1): 26-31.
 104. Petersen, W, Tillmann, B (2002), *[Anatomy and function of the anterior cruciate ligament].* Orthopade, 31 (8): 710-718.

105. Petersen, W, Tillmann, B (1999), *Structure and vascularization of the cruciate ligaments*. Anat Embryol (Berl), 200: 325-334.
106. Pinczewski, LA, Clingeffer, AJ, Otto, DD, Bonar, SF, Corry, IS (1997), *Integration of hamstring tendon graft with bone in reconstruction of the anterior cruciate ligament*. Arthroscopy, 13 (5): 641-643.
107. Poehling, G, Curl, WW, Lee, CA, Ginn, TA, Rushing, JT, Naughton, MJ, Holden, MB., Martin, DF., Smith, BP. (2005), *Analysis of outcomes of anterior cruciate ligament repair with 5-year follow-up: allograft versus autograft*. Arthroscopy, 21: 774-785.
108. Pruss, A, Perka, C, Degenhardt, P, Maronna, U, Büttner-Janz, K, Paul, B, Muller, K, Klumpp, C, Bruck, JC, von Versen, R (2002), *Clinical efficacy and compatibility of allogeneic avital tissue transplants sterilized with a peracetic acid/ethanol mixture*. Cell Tissue Bank, 3 (4): 235-243.
109. Pruss, A, Göbel, UB, Pauli, G, Kao, M, Seibold, M, Monig, HJ, Hansen, A, von Versen, R (2003), *Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue*. Ann Transplant, 8 (2): 34-42.
110. Radford, WJ, Amis, AA, Kempson, SA, Stead, AC, Camburn, M (1994), *A comparative study of single- and double-bundle ACL reconstructions in sheep*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2 (2): 94-99.
111. Radford, WJP, Amis, AA, Stead, AC (1996), *The ovine stifle as a model for human cruciate ligament surgery*. Vet Comp Orthop Traumatol, 9: 134-139.
112. Richmond, J, Manseau, CJ, Patz, R, McConville, O (1992), *Anterior cruciate reconstruction using a Dacron ligament prosthesis. A long-term study*. Am J Sports Med, 20: 24-28.
113. Roberts, TS, Drez, D Jr, McCarthy, W, Paine, R (1991), *Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients*. Am J Sports Med, 19 (1): 35-41.
114. Rodeo, SA, Arnoczky, SP, Torzilli, PA, Hidaka, C, Warren, RF (1993), *Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog*. J Bone Joint Surg Am, 75 (12): 1795-1803.

115. Rosenberg, T, Franklin, JL, Baldwin, GN, Nelson, KA (1990), *Extensor mechanism morbidity associated with patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 18: 560-565.
116. Rosenberg, T, Franklin, JL, Baldwin, GN, Nelson, KA (1992), *Extensor mechanism function after patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 20: 519-525.
117. Rosenberg, TD, Franklin, JL, Baldwin, GN, Nelson, KA (1992), *Extensor mechanism function after patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 20 (5): 519-526.
118. Sajovic, M, Vengust, V, Komadina, R, Tavcar, R, Skaza, K (2006), *A prospective, randomized comparison of semitendinosus and gracilis tendon versus patellar tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction: five-year follow-up*. Am J Sports Med, 34: 1933-1940.
119. Sautin, E (1963), *Sterilization of bony tissue by Co 60 gamma rays*. Radiobiology, 3: 621-625.
120. Scheffler, SU, Gonnermann, J, Kamp, J, Przybilla, D, Pruss, A (2008), *Remodeling of ACL allografts is inhibited by peracetic acid sterilization*. Clin Orthop Relat Res, 466: 1810-1818.
121. Scheffler, SU, Scherler, J, Pruss, A, von Versen, R, Weiler, A (2005), *Biomechanical comparison of human bone-patellar tendon-bone grafts after sterilization with peracetic acid ethanol*. Cell Tissue Bank, 6 (2): 109-115.
122. Scheffler, SU, Schmidt, T, Gangéy, I, Dustmann, M, Unterhauser, F, Weiler, A (2008), *Fresh-frozen free-tendon allografts versus autografts in anterior cruciate ligament reconstruction: delayed remodeling and inferior mechanical function during long-term healing in sheep*. Arthroscopy, 24 (4): 448-458.
123. Scheffler, SU, Unterhauser, FN, Keil, J, Weiler, A, *Comparison of tendon-to-bone-healing after soft-tissue autograft and allograft ACL reconstruction in a sheep model*. in *12th ESSKA 2000 Congress*. 2006. Innsbruck, Österreich.
124. Schneider, H (1956), *Zur Struktur der Sehnenansatzonen*. Z. Anat., 119: 431-456.

-
125. Schneider, S, Seither, B, Tonges, S, Schmitt, H (2006), *Sports injuries: population based representative data on incidence, diagnosis, sequelae, and high risk groups*. Br J Sports Med, 40: 334-339.
 126. Seitz, H, Hausner, T, Schlenz, I, Lang, S, Eschberger, J (1997), *Vascular anatomy of the ovine anterior cruciate ligament. A macroscopic, histological and radiographic study*. Arch Orthop Trauma Surg, 116 (1-2): 19-21.
 127. Senst, W (1974), *Beitrag zur feingeweblichen Struktur der Knochen- Band-Verbindung*. Zentralblatt für Chirurgie, 9: 275-279.
 128. Sharpey, W (1856), *Elements of anatomy, ed. J.Q.t. edition*. Walton and Moberly, London.
 129. Sheh, MY, Butler, DL, Stoffer, D (1985), *Correlation between structure and material properties in human knee ligaments and tendons*. Am Soc Mech Eng AMD, 68: 17-20.
 130. Shelbourne, K, Gray, T (1997), *Anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon graft followed by accelerated rehabilitation. A two-to nine-year followup..* Am J Sports Med, 25: 786-795.
 131. Shelbourne, K, Trumper, RV (1997), *Preventing anterior knee pain after anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med., 25: 41-47.
 132. Shelton, W, Papendick, L, Dukes, AD (1997), *Autograft versus allograft anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy, 13: 446-449.
 133. Shoemaker, SC, Rechl, H, Campbell, P, Kram, HB, Sanchez, M (1989), *Effects of fibrin sealant on incorporation of autograft and xenograft tendons within bone tunnels. A preliminary study*. Am J Sports Med, 17 (3): 318-324.
 134. Silvaggio, VJ, Fu, FH, Georgescu, HI, Evans, CH (1993), *The induction of IL-1 by freeze-dried ethylene oxide-treated bone-patellar tendon-bone allograft wear particles: an in vitro study*. Arthroscopy, 9 (1): 82-86.
 135. Soon, M, Hassan, A, Hui, JHP, Goh, JCH, Lee, EH (2007), *An Analysis of Soft Tissue Allograft Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in a Rabbit Model: A Short-Term Study of the Use of Mesenchymal Stem Cells to Enhance Tendon Osteointegration*. Am J Sports Med, 35: 962-971.

136. St Pierre, P, Olson, EJ, Elliott, JJ, O'Hair, KC, McKinney, LA, Ryan, J (1995), *Tendon-healing to cortical bone compared with healing to a cancellous trough. A biomechanical and histological evaluation in goats.* J Bone Joint Surg Am, 77 (12): 1858-1866.
137. Starke, R, Hackensellner, HA, von Versen, R (1984), [*Experimental studies of the sterilization of transplantation material with peracetic acid*]. Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe, 17 (5): 254-258.
138. Steinbrück, K (1999), *Epidemiologie von Sportverletzungen, 25-Jahres Analyse einer sportorthopädischen Ambulanz.* Sportverl Sportschad, 13: 38-52.
139. Steiner, ME, Hecker, AT, Brown, CH Jr, Hayes, WC (1994), *Anterior cruciate ligament graft fixation. Comparison of hamstring and patellar tendon grafts.* Am J Sports Med, 22 (2): 240-247.
140. Takeda, Y, Xerogeanes, JW, Livesay, GA, Fu, FH, Woo, SL (1994), *Biomechanical function of the human anterior cruciate ligament.* Arthroscopy, 10 (2): 140-147.
141. Tom, J, Rodeo, SA (2002), *Soft tissue allografts for knee reconstruction in sports medicine.* Clin Orthop Relat Res (402): 135-156
142. Tomita, F, Yasuda, K, Mikami, S, Sakai, T, Yamazaki, S, Tohyama, H (2001), *Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-Patellar tendon-Bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction.* Arthroscopy, 17 (5): 461-476.
143. Unterhauser, N, Dahne, M, Schlichting, K, Weiler, A (2006), *Comparison of tendon-to-bone-healing using soft tissue autografts and BPTB-autografts in a sheep-model of ACL-reconstruction.* In *12th ESSKA 2000 Congress:* Innsbruck, Österreich
144. Viola, RW, Sterett, WI, Newfield, D, Steadman, JR, Torry, MR (2000), *Internal and external tibial rotation strength after anterior cruciate ligament reconstruction using ipsilateral semitendinosus and gracilis tendon autografts.* Am J Sports Med, 28 (4): 552-555.

-
145. Vorlat, P, Verdonk, R, Arnauw, G (1999), *Long-term results of tendon allografts for anterior cruciate ligament replacement in revision surgery and cases of complex injuries*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 7: 322.
 146. Wagner, M, Kaab, MJ, Schallock, J, Haas, NP, Weiler, A (2005), *Hamstring tendon versus patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction using biodegradable interference fit fixation: a prospective matched-group analysis*. Am J Sports Med, 33: 1327-1336.
 147. Weiler, A, Förster, C, Falk, R, Schmidmaier, G, Südkamp, NP, *Locally applied Platelet-derived growth factor-BB ameliorates structural properties of a free tendon graft anterior cruciate ligament reconstruction*. in *Proceedings of the 47th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*. 2001. San Francisco, CA, USA.
 148. Weiler, A, Hoffmann, RF, Bail, HJ, Rehm, O, Südkamp, NP (2002), *Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep*. Arthroscopy, 18 (2): 124-135.
 149. Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A, Abel C, Südkamp NP, Hoffmann RF (2002). *Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep*. Arthroscopy. 18(2): 113-123.
 150. Weiler, A, Scheffler, SU, Südkamp, NP (2000), *[Current aspects of anchoring hamstring tendon transplants in cruciate ligament surgery]*. Chirurg, 71 (9): 1034-1044.
 151. Weiler, A, Scheffler, SU, Hoher, J (2002), *Transplantatauswahl für den primären Ersatz des vorderen Kreuzbandes*. Orthopäde, 31 (8): 731-740.
 152. Weiler, A, Unterhauser, FN, Faensen, B, Hunt, P, Bail, HJ, Haas, NP, *Comparison of tendon-to-bone healing using extracortical and anatomic interference fit fixation of soft tissue grafts in a sheep model of acl reconstruction*. In *Proceedings of the 48th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*. 2002. Dallas, TX, USA.

-
153. Whiston, TB, Walmsley, R (1960), *Some observations on the reaction of bone and tendon after tunneling of bone and insertion of tendon*. J Bone Joint Surg, 42-B (2): 377-386.
 154. Wildemann, B, Kadow-Rohmacker, A, Pruss, A, Haas, N, Schmidmaier, G (2007), *Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods*. Cell Tissue Bank., 8: 107-114.
 155. Woo, SL, Inoue, M, McGurk-Burleson, E, Gomez, MA (1987), *Treatment of the medial collateral ligament injury. II: Structure and function of canine knees in response to differing treatment regimens*. Am J Sports Med, 15 (1): 22-29.
 156. Xerogeanes, JW, Fox, RJ, Takeda, Y, Kim, HS, Ishibashi, Y, Carlin, GJ, Woo, SL (1998), *A functional comparison of animal anterior cruciate ligament models to the human anterior cruciate ligament*. Ann Biomed Eng, 26 (3): 345-352.
 157. Yamakado, K, Kitaoka, K, Yamada, H, Hashiba, K, Nakamura, R, Tomita, K (2002), *The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel*. Arthroscopy, 18 (1): 82-90.
 158. Yasuda, K, Tsujino, J, Ohkoshi, Y, Tanabe, Y, Kaneda, K (1995), *Graft site morbidity with autogenous semitendinosus and gracilis tendons*. Am J Sports Med, 23 (6): 706-714.
 159. Zantop, T, Schumacher, T, Diermann, N, Schanz, S, Raschke, MJ, Petersen, W (2007), *Anterolateral rotational knee instability: role of posterolateral structures*. Arch Orthop Trauma Surg, 127 (9): 743-752.
 160. Zhang, C, Fan HB, Xu, H, Li, QH, Guo, L (2006), *Histological comparison of fate of ligamentous insertion after reconstruction of anterior cruciate ligament: autograft vs allograft*. Chin J Traumatol., 9: 72-76.
 161. Zou, S, Dodd, RY, Stramer, SL, Strong, DM (2004), *Probability of viremia with HBV, HCV, HIV, and HTLV among tissue donors in the United States*. N Engl J Med, 351: 751-759.

7 Anhang

7.1 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

7.2 Danksagung

Zunächst einmal möchten ich Prof. Dr. med. Haas für die Überlassung des Themas und die Unterstützung danken.

Meinem Betreuer Dr. med. Sven Scheffler danke ich für die Hilfestellungen in allen Fragen während der Durchführung der Arbeit sowie der der Schaffung einer kameradschaftlichen Atmosphäre in der Gruppe.

Mein besonderer Dank geht an Dr. med. vet. Karin Schlichting, die als Tiermedizinerin das Projekt begleitet hat, und durch ihre stetige Unterstützung bei Fragen und Problemen eine unersetzliche Hilfe war.

Für eine wirklich interessante und auch sehr schöne Zusammenarbeit während des experimentellen Teils möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Julia Kamp, Johannes Gonnermann und Sebastian Metzloff bedanken. Weiterer Dank geht auch an die Kollegen der Kontrollstudie, an Judith Keil, Moritz Dustmann und ganz besonders Tanja Schmidt für die Hilfestellung bei der Durchführung der Arbeit.

Ich möchte mich auch für die große Unterstützung seitens der medizinisch-technischen Assistenten bedanken. Der Dank geht besonders an Gabriele Hartung und Marzena Princ sowie Camilla Bergmann und Martin Wolny.

Meinen Eltern möchte ich für die stete und liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit danken.

Großer Dank gebührt auch meiner kleinen Familie und ganz besonders meiner Frau Sabrina für die Entbehrungen, das Verständnis und vor allem für die Liebe, die mir den notwendigen Halt und die Kraft verliehen hat.

7.3 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Tassilo Böhm, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Als Hilfsmittel bei der Durchführung der Studie und Verfassung der Schrift dienten mir sowohl die darin angegebenen Materialien und Geräte sowie die medizinische Literaturdatenbank Medline der U.S. National Library of Medicine.

Berlin- Charlottenburg, 27.10.2009