

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

DISSERTATION

**Untersuchung des Langzeitmodellings humaner autologer freier  
Sehnentransplantate nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes**  
- humane Biopsiestudie -

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Barenthin, geborene Fiedler

aus Dresden

Datum der Promotion: 04.09.2015

*Meinen lieben Eltern gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Motivation</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Anatomie des VKB</b>	<b>2</b>
1.2.1 Makroskopische Anatomie	2
1.2.2 Mikroskopische Anatomie	3
<b>1.3 Funktion des VKB</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Blutversorgung des VKB</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Innervation des VKB</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Kreuzbandverletzungen</b>	<b>8</b>
1.6.1 Pathomechanismus	8
1.6.2 State-of-the-Art Therapie	8
<b>1.7 Remodeling und Ligamentisierung</b>	<b>11</b>
1.7.1 Initiale Phase: Phase der partiellen Nekrose und Degeneration	11
1.7.2 Reparativ- proliferative Phase	12
1.7.3 Remodelingphase	13
<b>1.8 Myofibroblasten</b>	<b>14</b>
<b>1.9 Revaskularisierung</b>	<b>16</b>
<b>1.10 Limitierungen bisheriger Studien</b>	<b>17</b>
<b>1.11 Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>1.12 Hypothesen</b>	<b>19</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Studiendesign und Patienten</b>	<b>20</b>
2.1.1 Transplantatwahl	23
2.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien	23
2.1.3 Klinische Studie (vs. Tierstudie)	24
<b>2.2 Operative Vorgehen</b>	<b>25</b>
2.2.1 Operation und Rehabilitation	25
<b>2.3 Probenentnahme und histologische Aufarbeitung</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Konventionelle Färbungen</b>	<b>28</b>

<b>2.5 Immunhistologie</b>	<b>29</b>
2.5.1 Immunhistologische Färbung der Myofibroblasten	29
2.5.2 Immunhistologische Faktor VIII Färbung	31
<b>2.6 Auswertungen der Daten</b>	<b>32</b>
2.6.1 Deskriptive Auswertung	32
2.6.2 Bindegewebszellen und Myofibroblasten	32
2.6.3 Faktor VIII Auswertung	33
2.6.4 Statistik	34
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Deskriptive Auswertung</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Quantitative Auswertung</b>	<b>37</b>
3.2.1 Gesamtzellzahl	38
3.2.2 Immunhistologie der Myofibroblasten	39
3.2.3 Immunhistologie der Gefäße	42
<b>4 Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Zusammenfassung der Hauptbefunde dieser Studie</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Vergleich zu der Studienlage der aktuellen Literatur</b>	<b>46</b>
<b>4.3 Limitierungen dieser Studie</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Schlussfolgerung</b>	<b>55</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>6 Summary</b>	<b>58</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>73</b>

<b>9 Anhang</b> .....	<b>74</b>
<b>9.1 Färbetechniken</b> .....	<b>74</b>
<b>9.2 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>77</b>
<b>9.3 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>78</b>
<b>9.4 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>79</b>
<b>9.5 Lebenslauf</b> .....	<b>80</b>
<b>9.6 Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>82</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Motivation*

Mit einer jährlichen Inzidenz von einer Verletzung pro 1000 Einwohner zählt die Ruptur des vorderen Kreuzbandes (VKB) zu den häufigsten Bandverletzungen des Menschen [1, 2].

Das vorwiegend durch Bänder gesicherte Kniegelenk ist vor allem bei sportlichen Aktivitäten großen Belastungen und Hebelwirkungen ausgesetzt und dadurch besonders anfällig für degenerative Veränderungen und Verletzungen. Das vordere Kreuzband verhindert eine anteriore Translation der Tibia gegenüber dem Femur und dient demnach der Stabilisierung und Führung des Kniegelenkes. Ist das vordere Kreuzband rupturiert und damit insuffizient, führt dies zu einer massiven Instabilität, verbunden mit erheblichen Einschränkungen der Gelenkfunktion [3]. Es resultiert langfristig eine sekundäre Degeneration von Menisken und Gelenkknorpel, die das Arthroserisiko steigern [4, 5]. Zusätzlich zeigt, im Gegensatz zu anderen Bandstrukturen, ein rupturiertes vorderes Kreuzband eine eingeschränkte Heilungspotenz [6, 7]. Gerade im Hinblick auf eine zunehmende Lebenserwartung und den steigenden Anspruch an sportlicher Betätigung, auch im fortgeschrittenem Alter, wird eine operative Rekonstruktion durch eine Kreuzbandersatzplastik empfohlen und in den meisten Fällen vorgenommen [8].

In den Vereinigten Staaten werden jährlich mehr als 300.000 Kreuzbandeingriffe durchgeführt und demnach sind sie das Land mit der weltweit größten Anzahl an Kreuzbandoperationen [9]. In Deutschland ist die Kreuzbandersatzplastik mit ca. 14.000 Operationen pro Jahr die am häufigsten durchgeführte bandplastische Operation am Bewegungsapparat und erlangt dadurch auch eine volkswirtschaftliche Bedeutung [10].

Bei der Transplantatauswahl stehen autologe (körpereigen) und allogene (körperfremden) Sehnentransplantate zur Verfügung. In den meisten Kliniken gilt das autologe, freie Patellarsehnedrittel mit zwei Knochenblöcken (BPTB) auf Grund seiner rigiden initialen ossären Verankerung als sog. „Golden Standard“ [11, 12]. In den letzten Jahren jedoch konnten sich die Hamstringsehnen, insbesondere die Semitendinosus-

und Gracilissehne (STG), durch ihre geringere Entnahmemorbidität und verbesserten Fixationstechniken als Transplantatalternative immer mehr durchsetzen [10, 13].

Wichtig für eine schnelle Wiedererlangung der Stabilität und Belastbarkeit des Kniegelenkes und das Langzeitüberleben des Transplantats ist die Transplantateinheilung.

Mit zunehmendem Einsatz von Hamstringsehnen als Kreuzbandersatz, stellt sich die Frage nach dem zeitlichen und qualitativen Verlauf des humanen Remodelings freier Sehnentransplantate. Gerade im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen aus Tierstudien, die einen Abschluss des Remodelings nach max. einem Jahr zeigten [11, 14-16], wohingegen die meisten bisherigen humanen Studien einen deutlich verlängerten Remodelingprozess zeigten [17, 18].

Für die Intensität und Dauer der Rehabilitation und Nachbehandlung sind jedoch genaue Kenntnisse über die histologischen Bandumbauvorgänge und den zeitlichen Verlauf des Remodelings beim Menschen von erheblicher Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einheilungs- und Reifungsprozess freier Hamstringsehnen nach Kreuzbandersatz über einen Zeitraum von 10 Jahren. Sie soll mittels histologischer und immunhistochemischer Färbemethoden zur weiteren Aufklärung bisher offener Fragen zum Remodeling und zur Revaskularisierung beitragen.

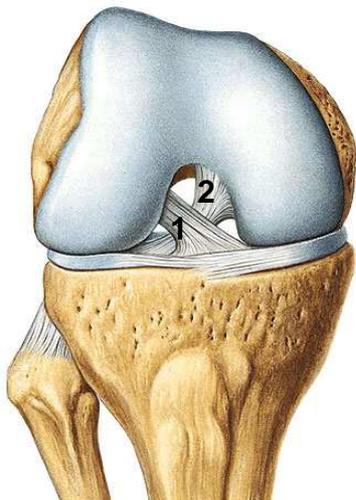
## **1.2 Anatomie des VKB**

### **1.2.1 Makroskopische Anatomie**

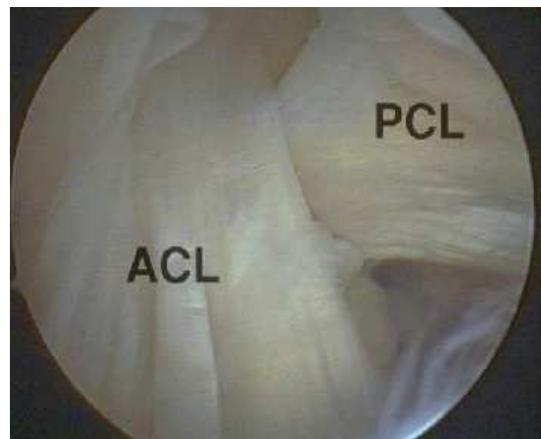
Das VKB verbindet zusammen mit dem hinteren Kreuzband (HKB) Femur und Tibia. Beide liegen intracapsulär, jedoch extrasynovial. Das VKB entspringt weit posterior in der Fossa intercondylaris, dorsal an der Innenseite des lateralen Femurkondylus und inseriert anterolateral des Tuberculum intercondylare mediale der Tibia (*Abb. 1*).

Seine Länge beträgt 31 - 41 mm [19-22]. Im Insertionsbereich beschreibt das VKB einen Halbkreis und ist im Durchmesser in etwa 16 - 24 mm breit, wobei die Querschnittsfläche im mittleren Drittel des VKB mit einem Durchmesser von 11 mm

geringer ist [19, 21, 23, 24], als an seinen tibialen und femoralen Ansatzpunkten (femoral: ca. 113 mm<sup>2</sup>; tibial: ca. 136 mm<sup>2</sup>) [25]. In seinem Verlauf kreuzt das VKB ventral das HKB und fächert sich nach tibial hin auf. Von einigen Autoren wird das VKB in zwei Bündel aufgeteilt, nämlich dem anteromedialen (AM) und dem posterolateralen (PL) Bündel, wodurch sich eine nach außen gerichtete spiralförmige Drehung von 55° ergibt [26]. Diese Faserbündel lassen sich jedoch beim Menschen nur funktionell und nicht makroskopisch voneinander trennen.



**Abb. 1:** menschliche Kniegelenk 1: vordere Kreuzband 2: hintere Kreuzband. Aus [27]



**Abb. 2:** Blick ins menschliche Knie  
ACL: VKB, PCL: HKB

## 1.2.2 Mikroskopische Anatomie

### Zelluläre Bestandteile

Histologisch lassen sich zwei Formen von Bindegewebszellen unterscheiden: die inaktiven, spindelförmigen Fibrozyten und die aktiven, Extrazellulärmatrix bildenden, rund bis ovoiden Fibroblasten. Beide gehören zu den ortsständigen Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft und liegen perlschnurartig zwischen den longitudinal ausgerichteten kollagenen Fasern. Im Rahmen des Remodelingprozesses sind Fibroblasten von entscheidender Bedeutung, da sie mittels Kollagenasen den Auf- und Abbau der Extrazellulärschubstanz regulieren [28, 29]. Außerdem befinden sich im

Bandgewebe neben den Bindegewebs- und Gefäßzellen einige Immunabwehrzellen, wie die Mastzellen, Plasmazellen, Granulozyten und Leukozyten.

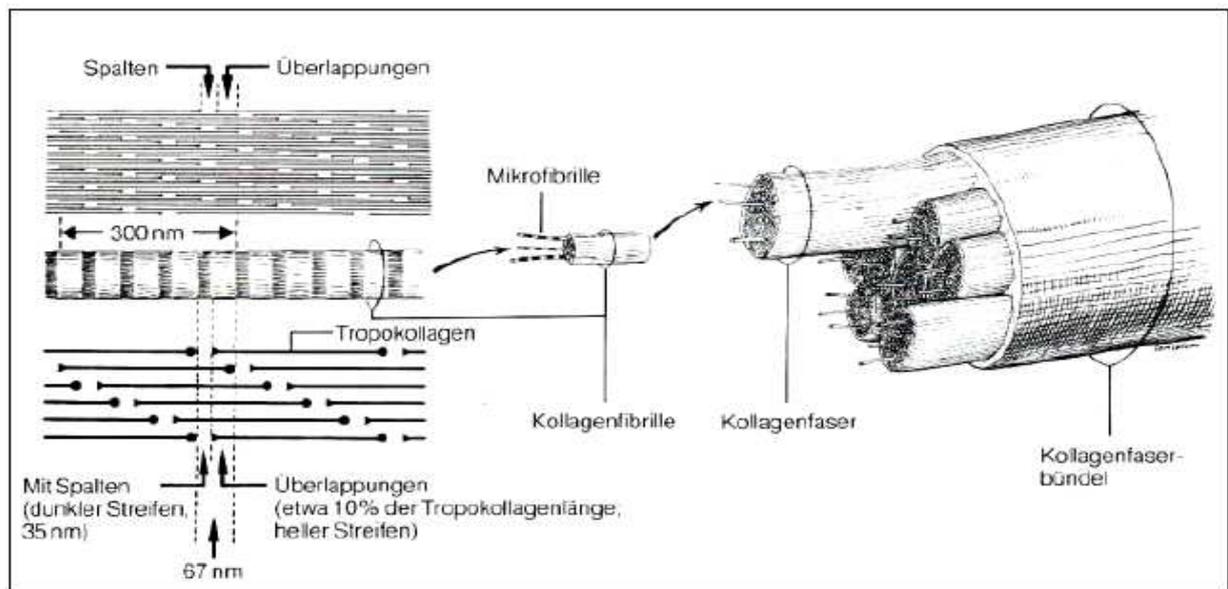
### **Extrazellulärmatrix**

Die von Fibroblasten synthetisierte Extrazellulärmatrix besteht aus der Grundsubstanz sowie aus Bindegewebsfasern, die ca. 75% der Trockenmasse ausmachen. Die Fasern des vorderen Kreuzbandes bestehen zum Hauptteil aus straffem Bindegewebe und unterteilen sich in multiple Faszikel, die zu 90% aus kollagenen Typ I Fasern und 10 % aus elastischen und retikulären Typ III Fasern bestehen [5, 30]. Während das Kollagen Typ I mit für die hohe Zugfestigkeit des Gewebes verantwortlich ist, schützt das Kollagen Typ III (retikuläre Fasern) durch dessen viskoelastische Eigenschaften die Blutgefäße. So ermöglicht dieser Aufbau eine Rekrutierung unterschiedlicher Faserbündel während der Bewegung [22]. Die die Grundsubstanz durchflechtenden, nicht parallel verlaufenden Netze von Kollagenfibrillen (150 nm Durchmesser) gruppieren sich zu Fasern (1 - 20 µm Durchmesser), welche gebündelt eine subfaszikuläre Einheit bilden (100 - 250 µm Durchmesser) (Abb. 3). Diese subfaszikulären Einheiten werden vom so genannten Endotenon, einem lockeren Bindegewebe umhüllt. Die Frequenz des wellenförmigen Faserverlaufes nennt man „Kollagen-Crimp“ [5, 30-32]. Ca. 20 Subfaszikel bilden einen Faszikel, der vom so genannten Epitenon umhüllt wird. Der Faszikeldurchmesser kann dabei zwischen 250 µm und mehreren Millimetern schwanken. Alle Faszikel zusammen bilden letztendlich das Ligament und sind vom Paratenon umgeben [23]. Sie verlaufen direkt und in sich verdreht vom femoralen zum tibialen Ansatz [33-35].

Die Geschwindigkeit des ständigen Kollagenauf- und abbaus ist mutmaßlich bandspezifisch und von einigen Umweltbedingungen abhängig [36]. So wird beispielsweise die Kollagenfaserlänge durch den Spannungszustand beeinflusst. Das heißt z.B. dass sich bei längerer Ruhigstellung die Fasern verkürzen und sich in einem Streckverband verlängern.

Die Grundsubstanz besteht aus der interstitiellen Flüssigkeit (Wasser), Proteoglykanen und Glykoproteinen. Sie wird von den nichtfibrillären Bestandteilen der EZM gebildet. Wasser spielt für die Gleitmechanismen der Kollagenfasern und für die viskösen Eigenschaften des Bandes eine wichtige Rolle.

Proteoglykane sind für die Organisation der Extrazellulärmatrix von großer Bedeutung. Sie können durch ihren hydrophilen Charakter Wasser binden [32] und extrazellulär einzelne Schritte der Fibrillogenese steuern. Glycoproteine, wie das Fibronectin und das Laminin, tauschen über Oberflächenintegrine Signale zwischen EZM und Zellen aus, so dass über die EZM die Zellfunktion beeinflusst werden kann. Weiterhin unterstützen sie die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes.



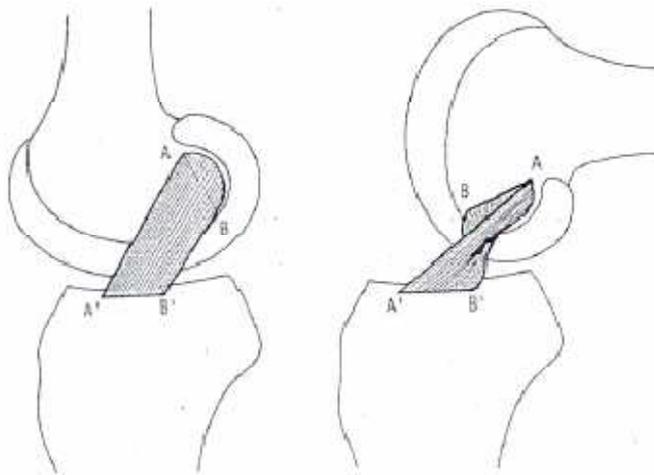
**Abb. 3:** Aufbau des Kollagenfaserbündels. Aus [32]

### 1.3 Funktion des VKB

Das VKB gilt zusammen mit dem hinteren Kreuzband (HKB) als zentraler Pfeiler des Kniegelenkes und leistet einen wichtigen Beitrag zur Gelenkstabilisation und Kinematik. Dabei übernimmt das VKB in der Sagittalebene, während tibialer anteroposteriorer Translationsbewegungen gegenüber dem Femur, sein Hauptfunktion. Am stärksten wird das VKB bei 0-30° Beugung belastet [37]. Während das anteromediale-Bündel (AMB) konstant die Flexions- und Extensionsbewegungen stabilisiert, spannt sich das posterolaterale-Bündel (PLB) vor allem bei Extension, da es in Beugstellung um das AM-Bündel rotiert und dabei entspannt (Abb. 4) [23, 37].

In der Frontal- und Transversalebene fungieren die Kreuzbänder als sekundäre Stabilisatoren. Sie wirken vor allem bei innenrotatorischen, aber auch bei außenrotatorischen, sowohl varischen wie auch valgischen Kräften entgegen, wobei die

Hauptfunktion von den Kollateralbändern und der Kapsel übernommen wird [38]. Zudem sind die Kreuzbänder mit wichtigen Propriozeptoren ausgestattet, die dem Gehirn die Stellung des Kniegelenkes im Raum mitteilen und über Reflexbögen die Spannung der verschiedenen Muskelgruppen regulieren. Damit limitiert das VKB die Rotation des Gelenkes und dient „aktiv“ dem Schutz vor exzessiven Translationsbewegungen.

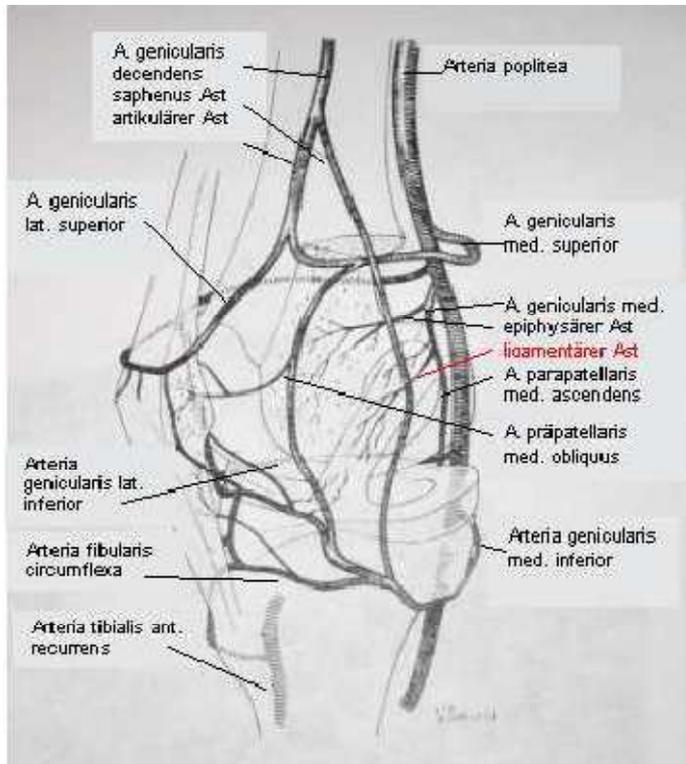


**Abb. 4:** Die proximal entspringenden Fasern des VKB ziehen nach anteromedial, die distal entspringenden Fasern nach posterolateral. Dadurch entspannt sich das posterolaterale Bündel bei Flexion. Aus [19]

#### 1.4 Blutversorgung des VKB

Die Blutgefäßversorgung des vorderen Kreuzbandes erfolgt zum Hauptteil aus der A. media genus, distal zusätzlich aus den Aa. inferiores laterales und mediales genus (Abb. 5). Beide Gefäßstämme entspringen aus der A. poplitea und gelangen durch den infrapatellären Fettkörper in das Gelenk, wo sie im Bereich der Kreuzband-umhüllenden Synovia ein horizontal ausgerichtetes periligamentäres und ein in Septen verlaufendes longitudinales intraligamentäres Gefäßnetz bilden [39], die miteinander kommunizieren. Dabei stellt sich die Gefäßverteilung im VKB inhomogen dar. Während sich innerhalb der Faserknorpelzone der vordere Anteil des mittleren Drittels avaskuläre Bereiche zeigen [22] sind der proximale und distale Bandbereich von einer besseren

Durchblutung gekennzeichnet. Zudem steht das periligamentäre Gefäßnetz der Synovia mit dem Periost und dem endostalen Raum in Verbindung [40-42].



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des VKB. Aus [16]

### 1.5 Innervation des VKB

Die Innervation des VKB erfolgt zum Hauptteil über feine Äste des N. articularis posterior. Er entspringt dem N. tibialis und erreicht über die dorsale Umschlagfalte der Synovialis das Gelenk. Zusammen mit den Gefäßen ziehen die Nerven, in bindegewebige Septen verlaufend, entlang des peri- und endoligamentären Netzwerkes zu den Kreuzbändern [23, 43]. Hier befinden sich verschiedene sensorische Nervenendigungen wie Ruffini-Körperchen, Vater-Pacini-Körperchen, Golgi-Sehnenorgane und freie Nervenendigungen [43-45], wobei diese nur ca. 1% des Kreuzbandvolumens ausmachen [45, 46].

Durch neuronale Rückkopplungsmechanismen spielen diese Mechano-, Proprio- und Schmerzrezeptoren für die Stabilität des Kniegelenkes und beim Schutz vor unphysiologischen Bewegungen eine große Rolle.

## **1.6 Kreuzbandverletzungen**

### **1.6.1 Pathomechanismus**

Etwa 7% aller traumatischen Schädigungen und mehr als 30% aller Distorsionen betreffen das Kniegelenk, wobei das vordere Kreuzband hierbei fünf- bis zehnmal häufiger betroffen ist als das hintere Kreuzband. Ferner sind kombinierte Kapsel-Band-Läsionen wesentlich häufiger als Schäden einer einzelnen Bandstruktur. Häufigster Verletzungsmechanismus ist das Valgus-Flexions-Außenrotationstrauma mit der typischen Kombination einer Ruptur des medialen Seitenbandes, der dorsomedialen Kapselschale unter Einbeziehung des Innenmeniskushinterhornes und des vorderen Kreuzbandes. Dieses früher als "unhappy triad" bezeichnete Verletzungsbild wird heute anteromediale Kniegelenkinstabilität genannt. Neben Sportarten mit schnellen Richtungswechseln, z.B. beim Fußball oder bei anderen Ballsportarten weist vor allem der Ski Alpinsport eine hohe Inzidenz von VKB-Verletzungen auf.

Wohingegen beim selteneren Flexion-Varus-Innenrotationstrauma neben dem VKB zusätzlich die anterolateralen Kapsel-Band-Strukturen mitbetroffen sein können, sind bei anteriorer Translationsbewegung, d.h. bei direkter dorsaler Krafteinwirkung auf die Tibia bei fixiertem Fuß oder bei plötzlicher Innenrotation vielmehr isolierte Kreuzbandverletzungen zu erwarten [20, 47].

### **1.6.2 State-of-the-Art Therapie**

Prinzipiell stehen zur Versorgung einer VKB-Ruptur und -Insuffizienz verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Es lässt sich die konservative Therapie von der operativen Rekonstruktion unterscheiden. Je nach individuellen Gegebenheiten, dem Status der klinischen Knieinstabilität, der Art der Verletzung (komplette/inkomplette Ruptur, isolierte oder kombinierte Verletzung), dem Aktivitätsniveau und dem Alter des

Patienten lässt sich die Indikation für eine operative oder konservative Versorgung stellen, wobei das Hauptkriterium auf dem Ausmaß der Instabilität liegt.

Einige Studien haben gezeigt, dass eine konservative Behandlung einer VKB-Ruptur mit einer erhöhten Inzidenz von Meniskusläsionen und degenerativen, arthrotischen Gelenkveränderungen einhergeht [48-51]. Besonders bei kombinierten Verletzungsmustern mit Meniskenbeteiligung oder weiteren Bandstrukturen ist das Auftreten einer posttraumatischen Früharthrose signifikant erhöht [48, 52-54]. Allerdings konnte bislang eine signifikante Verminderung degenerativer Veränderungen durch eine operative Versorgung in Langzeitstudien nicht nachgewiesen werden [49, 55, 56]. Im Vergleich zur konservativen Versorgung wurde jedoch eine signifikant höhere langfristige Kniestabilität bei zeitlich verzögertem Auftreten einer Arthrose beobachtet [57, 58].

#### Operative Rekonstruktion

Vor allem bei jüngeren, körperlich aktiven Patienten und bei Personen, die berufsbedingt einer hohen Belastung der Kniegelenke ausgesetzt sind, aber auch, abhängig vom beabsichtigten Aktivitätsniveau, bei Patienten höheren Alters wird allgemein eine operative Versorgung nach VKB-Ruptur empfohlen.

#### Autografts

Hierfür stehen sowohl das mittlere Drittel der Patellarsehne (Lig. Patellae, BTBP), die sog. Hamstringsehnen, insbesondere die Semitendinosus- und Gracilissehne als auch das zentrale Drittel der Quadrizepssehne und der Tractus iliotibialis zur Verfügung.

Man unterscheidet dabei zwischen knochenblocktragenden Transplantaten, den BTBP und freien Sehnenplastiken.

Da die Verwendung von autologen Transplantaten bisher zu guten Langzeitergebnissen geführt hat, gilt der Einsatz von Autografts in Europa derzeit als Goldstandard. Dabei stellen das Patellarsehnentransplantat (Bone-Tendon-Bone-Plastik) und die Semitendinosus-Gracilis-Plastik („Hamstrings“) die am häufigsten eingesetzten Transplantate bei vorderer Kreuzbandrekonstruktion dar.

### Bone-Tendon-Bone-Plastik (Patellarsehnentransplantat)

Über viele Jahre hat sich der VKB-Ersatz mit einem Patellarsehnentransplantat (Bone-Tendon-Bone-Plastik) bewährt. Die angeführten Vorteile dieses Transplantats sind die gute maximale Reißfestigkeit der Sehne, die Möglichkeit einer primär stabilen Fixierung mit Interferenzschrauben und die zuverlässige Knochen-Knocheneinheilung im Bohrkanal und der damit verbundenen postoperativen Stabilität [8, 59-64]. Als nachteilig stehen die durch die Entnahmestelle resultierenden femoropatellaren Schmerzen (bis 40%) und der Kraftverlust (bis 60%) zur Diskussion [64-68], wobei Risiken, wie die einer Patellarfraktur, einer Patellarsehnenruptur oder einer Verkürzung der verbleibenden Patellarsehne eher selten beschrieben werden [60, 67, 69]. Des Weiteren wird in einzelnen Studien ein postoperatives Streckdefizit mit einer Inzidenz von mehr als 10% angegeben [70]. Deshalb konnten sich vor allem die Hamstringsehnen in den letzten Jahren als Transplantatalternative durchsetzen.

### Semitendinosus-Gracilis-Sehnen-Plastik (Hamstringsehnen-Plastik)

Vorteilhaft freier Sehnenplastiken ist die gegenüber BTBP geringere Entnahmemorbidität [71], so dass es zu keinem zusätzlichen Trauma für den Streckapparat des Kniegelenkes kommt und dadurch keine Entnahme-Defekt-Arthropathie impliziert wird [71]. Die geringe Kraftverminderung der ischiokruralen Muskulatur durch die Entnahme zum Beispiel der Semitendinosussehne wird kritisch diskutiert [62, 72, 73], ist aber durch die Regenerationsfähigkeit der Hamstringsehnen nach ca. 9 Monaten nicht mehr zu beobachten [74, 75]. Die üblicherweise benutzten mehrsträngigen Sehnentransplantate der Mm. semitendinosus et gracilis verfügen über eine sehr hohe Reißfestigkeit [60, 76]. Die Besonderheit der Vierfachbündelung besteht darin, dass alle vier Sehnenchen über die Sehnen Schlaufen optimal vorgespannt werden können und sich die Krafteinleitung später im Knie gleichmäßig auf alle Schenkel verteilen kann [76]. Dies bedingt eine extrem hohe Gesamtbelastbarkeit dieses Sehnenimplantates. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die mehrsträngigen Sehnentransplantate besser in der Lage sind, das mehrbündelige vordere Kreuzband zu ersetzen und so die komplexe Kniekinematik bei verschiedenen Beugegraden zu rekonstruieren, was für eine Stabilisierung des Kniegelenkes über den gesamten Bewegungsumfang von Vorteil ist [67, 77, 78].

Frühere Nachteile der freien Sehnentransplantate im Sinne einer Transplantatlockerung wurden durch bessere Verankerungstechniken deutlich minimiert und treten zunehmend in den Hintergrund [10]. So kann das Sehnentransplantat beispielsweise durch eine direkte Fixierung mittels Interferenzschrauben oder Pins fest mit dem Knochen verankert werden [77, 79, 80]

### Allografts

Neben den bereits genannten Transplantaten, kommen hierfür die Achillessehne und seltener die Sehne des M. tibialis anterior in Betracht [81]. Allografts gewinnen aufgrund fehlender Entnahmemorbidity und kürzerer Operationsdauer sowie niedrigerer Kosten an immer größerem Interesse [82]. In Amerika ist der Einsatz allogener Spendermaterialien bereits Routine geworden, wohingegen der Gebrauch in Europa nur einen geringen Anteil bei Verwendung von VKB-Rekonstruktionen darstellt [83, 84]. Hauptnachteil der Allografts ist die Gefahr der Krankheitsübertragung vom Spender auf den Empfänger. Derzeit existiert kein Sterilisationsverfahren, das eine 100%ige Sterilität garantieren kann ohne dabei das Transplantat zu schädigen. Außerdem ist durch das Fehlen von umfangreichen Gewebebanken in Europa die Einsatzmöglichkeit begrenzt.

## **1.7 Remodeling und Ligamentisierung**

Beim Kreuzbandersatz durchlaufen die Transplantate einen typischen Einheilungs- bzw. Umbauprozess, der in drei Phasen eingeteilt werden kann und die Phasen der Nekrose, der Revaskularisierung und Fibroblastenproliferation sowie der Kollagensynthese umfasst.

### **1.7.1 Initiale Phase: Phase der partiellen Nekrose und Degeneration**

Postoperativ findet eine partiell ischämische Nekrose und Degeneration des freien avaskulären Transplantates statt. Dies ist mit einer Abnahme der biomechanischen und viskoelastischen Eigenschaften der Transplantate verbunden. Definitionsgemäß sind in dieser Phase charakteristische ultrastrukturelle Zellveränderungen, wie

Mitochondrienschwellung, Dilatation und Degranulation des endoplasmatischen Retikulums sowie zytoplasmatischen Lipideinschlüsse und eine Desintegration der Kollagenfibrillen, zu sehen. Während dieser Phase konnte keine Revaskularisierung beobachtet werden [85-87]. Sind im Transplantatzentrum noch Nekrosen mit Zell- und Strukturverlust zu sehen, kommt es bereits peripher zwischen der 1. und 2. Woche nach VKB-Ersatz [88, 89] zu einer Invasion eines zell- und gefäßreichen Granulationsgewebes mit Entzündungszellen wie Monozyten, Leukozyten und Makrophagen, die unter anderem Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und Wachstumsfaktoren synthetisieren. Schon nach zwei bis vier Wochen post operationem wurden alle ursprünglichen intrinsischen Zellen des Transplantates durch extrinsische Zellen ersetzt [86], wobei man annimmt, dass die Zellen entweder von der entstehenden synovialen Hülle oder von Resten des nativen VKB oder vom Knochenmark stammen [85, 86]. Für diese frühe Phase des Bandremodelings gibt es bisher keine humanen Biopsiestudien.

### **1.7.2 Reparativ- proliferative Phase**

Diese auch als Revitalisierungsphase bezeichnete Phase ist von einer überschießenden Zellproliferation (Hyperzellularität), von einer von peripher nach zentral verlaufenden Revaskularisierung, ausgehend von einer neu gebildeten Synovialhülle und dem Hoffa'schen Fettkörper und einem Organisationsverlust der EZM gekennzeichnet. Die meisten charakteristischen Veränderungen dieser Phase ereignen sich zwischen der 4. und 12. postoperativen Woche. Um die 6. postoperative Woche sind sowohl große Zellhaufen als auch azelluläre Bereiche vorhanden, die vor allem im Transplantatzentrum zu finden sind. In dieser Phase spielen Myofibroblasten (MFB) (*siehe 1.8 Myofibroblasten*) eine wichtige Rolle, die aus Fibroblasten entstehen (*Abb. 6*) [90] und durch aktivierte Makrophagen zur Differenzierung angeregt werden. Sie sind in der Lage durch sezernierte Kollagenasen Extrazellulärmatrix (EZM) abzubauen und sie durch neues Kollagen zu ersetzen [90-92]. Zudem enthalten sie kontraktile Aktin- und Myosin-Filamente, wie das  $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA) (*Abb. 6c*) [93], wodurch größere mechanische Kräfte auf die Umgebung übertragen werden können. Die zunehmend einsprossende Kapillarisation und Revaskularisierung (*siehe 1.9 Revaskularisierung*) scheint mit den abnehmenden mechanischen Eigenschaften

des Transplantates im Zusammenhang zu stehen [94, 95], wobei der Zeitpunkt der größten Gefäßdichte dem der geringsten mechanischen Belastbarkeit entspricht [95]. In dieser Phase wurde in einigen Studien der gefäßstimulierende Einfluss einiger Wachstumsfaktoren, wie der des PDGF-BB und des VEGF nachgewiesen [96, 97], wobei der VEGF noch bis zu einem Zeitpunkt von 24 Wochen post operationem von aktivierten Fibroblasten exprimiert wurde [96]. Weiterhin ist neben einer Zunahme des Kollagens Typ III bei gleichzeitig geringerem mittlerem Fibrillendurchmesser, ein Anstieg des Fibronectin- und GAG-Gehaltes zu verzeichnen. Während erst am Ende der reparativ- proliferativen Phase auch zentrale Transplantatbereiche zunehmend rezellularisiert und revaskularisiert sind, gehen hingegen peripher die Zell- und Gefäßzahlen bereits zurück.

### **1.7.3 Remodelingphase**

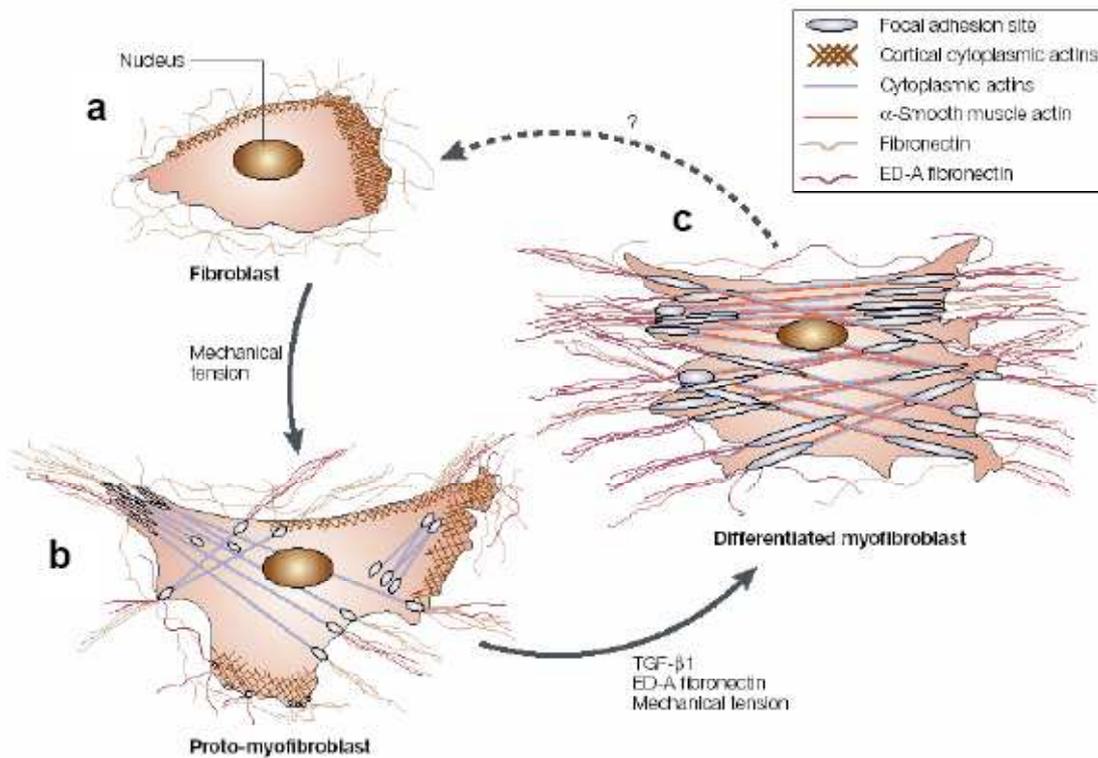
Diese bis zu mehreren Jahren andauernde Phase schließt an die Proliferationsphase an. Für das Ende dieser Phase ist kein klarer Zeitpunkt definierbar. Sie ist durch eine weitere Organisation der extrazellulären Matrix, einer Normalisierung des Zellgehaltes und einer zunehmenden Longitudinalausrichtung der Kollagenfaserbündel gekennzeichnet. Weiterhin kommt es zu einer Abnahme des Kollagen Typ III und des Fibronectingehaltes, sowie zu einer zunehmenden Verbesserung der Zugfestigkeit des Transplantates, obwohl sich der mittlere Kollagendurchmesser nicht ändert. Am Ende dieser Phase findet man ein strukturell, biochemisch und histologisch bandähnliches Gewebe vor [28].

Über die Dauer des Remodelingprozesses existieren unterschiedliche Daten. Stellten Amiel et al. im Kaninchenmodell bereits 30 Wochen nach VKB-Ersatz einen Umbau zu einem bandähnlichen Gewebe fest [11], konnten Falconiero beim Menschen und Goradia et al. ihrer Studie im Schafsmodell einen Abschluss diesen Prozesses erst nach einem Jahr beobachten [15, 98]. Lane et al. bestätigte dies für autologe Transplantate beim Menschen [99], währenddessen Rougraff et al. über diesen Zeitraum hinaus Zeichen für weitere Reifungsvorgänge und degenerative Zonen in den humanen autologen Transplantaten fand. Er konnte erst nach 3 Jahren ein vollständig remodeliertes Gewebe feststellen [17].

Während Unterhauser et al. in seiner Studie am Schafsmodell einen Abschluss der Ligamentisierung hinsichtlich der Gesamtzellzahl und der Gefäßdichte sogar schon nach 24 Wochen zeigte [16], wurde in einer Nachfolgestudie am Schafsmodell deutlich, dass auch nach 52 Wochen nicht der Gefäßstatus des native VKB`S erreicht wurde, jedoch eine zunehmende homogene Anordnung des Gewebes erfolgte. In Bezug auf die Anzahl der Myofibroblasten war nach 12 Wochen ein Höhepunkt erreicht, im weiteren Verlauf bis zur 52. Woche fiel die Zell- und Myofibroblastenzahl dann stetig ab und es erfolgte eine Angleichung in Richtung des nativen VKB [100, 101].

### **1.8 Myofibroblasten**

Myofibroblasten (MFB) sind Zellen, die sich histologisch als Fibroblasten und glatte Muskelzellen repräsentieren und deren Eigenschaften in sich vereinen [102]. Im Rahmen des Remodeling-Prozesses sind sie in der Lage die „alte“ Extrazellulärmatrix (EZM) des Transplantates durch sezernierte Kollagenasen abzubauen und durch neues Kollagen zu ersetzen [90-92]. Sie enthalten zudem kontraktile Aktin- und Myosin-Filamente, wie das  $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA), welches als wichtigstes Charakteristikum der Myofibroblasten gilt (*Abb. 6c*) [93]. Entlang der Zellachse verlaufen sie gebündelt und bilden sog. „Stressfasern“, die sich intrazellulär parallel ausrichten [103]. ASMA ist nicht nur ein Markerprotein für Myofibroblasten, sondern auch in glatten Muskelzellen und Perizyten der Kapillarwände ist das Protein nachweisbar [103, 104].



**Abb. 6:** a) undifferenzierte Fibroblast b) Unter mechanischer Belastung differenziert der Fibroblast zum Proto-Myofibroblast c) der differenziert Proto-Myofibroblast. Aus [90]

Aufgrund von dem nachgewiesenen kontraktile Einfluss der MFB auf die ECM (anhand von in-vitro Studien) [105, 106] [107, 108] nahm man an, dass die MFB in der Lage seien eine Gewebekontraktion zu induzieren und so einen positiven Einfluss auf die in-situ Spannung nehmen zu können [109]. Drei Jahre später wurden MFB auch im nativen und rupturierten humanen VKB nachgewiesen [110, 111]. Murray und Spector zeigten, dass das Einheilen eines gerissenen humanen VKB mit einer gesteigerten Expression von ASMA einhergeht [110] [111]. Weiler et al. dokumentierten 2002 erstmals Myofibroblasten während des Transplantatremodelings nach VKB-Ersatz im Schafsmodell. [112].

Dustmann et al. konnten in ihrer Studie am Schafsmodell 12 Wochen nach VKB Ersatz einen signifikanten Unterschied der Myofibroblastenzahl zwischen Autografts und Allografts beobachten, wobei die Anzahl in den autologen Transplantaten (170,6 /mm<sup>2</sup>) die der allogenen Transplantate (93,9 /mm<sup>2</sup>) übertraf [101]. Ferner konnte er im Gegensatz zu Weiler und Unterhauser et al. im Hinblick auf die höhere Myofibroblastenzahl keine gesteigerte Kontraktion der Gewebestruktur zeigen [101]. Andererseits fanden Weiß et al. eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der

MFB und der Kontraktionsaktivität. Außerdem konnte er Myofibroblasten als regulären Bestandteil der postmortem entnommenen autologen Sehnentransplantaten nachweisen [113].

Ungeachtet dessen stellen die MFB einen Indikator des Remodelingprozess dar und scheinen durch ihre sekretorische Aktivität eine wichtige Rolle beim Ligamentisierungsprozess zu spielen.

### **1.9 Revaskularisierung**

Die Revaskularisierung von freien Sehnentransplantaten nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes ist eine biologische Grundvoraussetzung für das Langzeitüberleben des Transplantates und die ablaufenden Remodelingprozesse [39, 85, 114]. Dabei wurde in der Vergangenheit die Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten intensiv untersucht [11, 39, 85, 89, 100, 114-116].

Es konnte gezeigt werden, dass das Transplantat im Gegensatz zum nativen Kreuzband zunächst keinerlei Blutversorgung besitzt. Erst in der 4. bis 12. postoperativen Woche [16, 85, 95, 114] ist in der als reparativ-proliferativ bezeichnete 2. Phase des Bandremodelings eine Repopulation des Transplantates und eine von peripher nach zentral fortschreitende Revaskularisierung zu beobachten [16, 96, 100]. Die Transplantate sind zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum nativen VKB als hyperzellulär und hypervaskulär zu bezeichnen. Weiler und Tohyama et al. konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der zunehmend einsprossenden Kapillarisation und Revaskularisierung und den abnehmenden mechanischen Eigenschaften des Transplantates zeigen [94, 95]. Dabei entspricht der Zeitpunkt der größten Gefäßdichte dem der geringsten mechanischen Belastbarkeit [95], der bei ca. sechs Wochen postoperativ nach VKB-Rekonstruktion liegt. Zusätzlich wurde in einigen Studien der gefäßstimulierende Einfluss einiger Wachstumsfaktoren wie der des PDGF-BB und des VEGF nachgewiesen [96, 97], wobei der VEGF noch bis zu einem Zeitpunkt von 24 Wochen post operationem von aktivierten Fibroblasten exprimiert wurde [96]. Unterhauser et al. konnten durch gezielte Detektion der Gefäßwandendothelien mittels Faktor VIII Antikörper bereits sechs Wochen nach VKB-Ersatz eine maximale Gefäßdichte im subsynovialen Bereich feststellen, die nach ca.

12 Wochen post operationem auch intermediär und zentral zu sehen war. Im weiteren Verlauf nahm die Gefäßanzahl wieder ab, so dass der Gefäßstatus nach ca. 24 Monaten dem des nativen VKB glich [16]. Schmidt et al. konnten bei ihren Untersuchungen am Schafsmodell bei der Auswertung der Gefäßdichte autologer Transplantate nach 52 Wochen tendenziell einen Rückgang der Gefäße zu Werten des nativen vorderen Kreuzbandes zeigen, ohne diesen Status jedoch zu erreichen [100]. Es lagen weiterhin subsynovial und zentral signifikant mehr Gefäßanschnitte als im nativen VKB vor [100].

### ***1.10 Limitierungen bisheriger Studien***

Der Remodellingprozeß autologer Kreuzbandtransplantate wurde bereits in zahlreichen tierexperimentellen und einigen klinischen Studien untersucht. Jedoch wurden größtenteils knochenblocktragende Patellarsehnentransplantate untersucht, so dass Informationen zum Remodeling autologer freier Sehnenplastiken nur begrenzt vorhanden sind [17, 117, 118]. Die Erkenntnisse über den Heilungsprozess beruhen in erster Linie auf Tiermodellen [15, 16, 86, 89, 94, 100, 101, 119-123]. Es gibt nur wenige humane Biopsiestudien, bei denen teils nur geringe Fallzahlen pro Zeitpunkt [17, 98, 99, 117, 118, 124] oder nur begrenzte postoperative Zeiträume [98, 124] ausgewertet wurden.

In den meisten Tierstudien konnte gezeigt werden, dass der Remodeling-Prozess nach 24 Wochen bis zu einem Jahr abgeschlossen ist [11, 14, 98], wohingegen die meisten humanen Biopsiestudien Hinweise für eine längere Dauer des Remodelings beim Menschen lieferten [17, 18]. Im Gegensatz zu den von den meisten Autoren [99] [11, 14, 98], postulierte Rougraff bei humanen VKB-Plastiken ein Remodelingabschluss nach 3 Jahren [17]. Auch hinsichtlich der Art und des Verlaufes des Remodelings wurden immer wieder Hinweise für Unterschiede zwischen den Ergebnissen tierexperimenteller und humaner Studien gefunden.

Die zuvor in Tiermodellen beschriebenen Phasen der Bandeinheilung wurden auch in humanen Biopsiestudien gefunden [125, 126]. Allerdings scheint dabei das humane Remodeling verlangsamt abzulaufen [17]. Ein kompletter Ersatz des Transplantates

durch einwandernde Zellen, wie in Tiermodellen beobachtet, konnte bislang im einheilenden humanen VKB Ersatz nicht gezeigt werden [125, 126].

Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse wird heute beim Menschen in Korrelation mit klinischen Beobachtungen und Untersuchungen von einer Dauer für das Remodeling autologer Transplantate nach VKB-Ersatz von ca. 12 Monaten ausgegangen [98].

Ein weiteres Problem beim Vergleich vorhandener Studien stellen die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden dar. Hinsichtlich der Revaskularisierung wurde in fast allen Studien mit Methoden gearbeitet, die für eine Darstellung der Revaskularisierung auf kapillärer Ebene nicht geeignet waren. Erst mit der Anwendung der immunhistochemischen Faktor-VIII-Färbemethode konnte Unterhauser et al. selbst kleinste Kapillaren, auch im Endstromgebiet klar identifizieren [16]. Er beobachtete eine Angleichung des Gefäßstatus an das native VKB nach ca. 24 Monaten. Auch Schmidt et al. konnte bei ihrer Ein-Jahres-Auswertung der Gefäßdichte autologer Transplantate am Schafsmodell zwar nach 52 Wochen einen tendenziellen Rückgang der Gefäße zu Werten des nativen VKB zeigen, jedoch ohne diesen Status erreicht zu haben, so dass ein verlängertes Remodeling über diesen Zeitraum hinaus zu vermuten ist [100]. Betrachtet man die teils gegensätzlichen bzw. unterschiedlichen Ergebnisse der vorhandenen Studien hinsichtlich des Bandremodelings, so muss man davon ausgehen, dass es Unterschiede der Revaskularisierung und Rezellularisierung zwischen Tier und Mensch gibt und dass der Verlauf des Remodelings humaner freier autologer Sehnenplastiken bisher nicht vollständig aufgeklärt ist.

### **1.11 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Langzeitremodeling und den Ligamentisierungsprozess von humanen freien autologen Hamstringsehnen nach Ersatz des VKB weiter aufzuklären. Bisherige Studien zu diesem Thema waren zum Großteil in vivo Tierstudien [15, 16, 86, 89, 94, 100, 101, 119-123]. In humanen Studien wurde meistens ein anderes Transplantat, wie beispielsweise die Patellarsehne untersucht [17, 117, 118]. Jedoch kommen im klinischen Alltag zunehmend auch knochenblockfreie Hamstringsehnentransplantate zum Einsatz.

Zudem wurde in den meisten Studien mit konventionellen Färbemethoden gearbeitet, die eine quantitative Auswertung der Myofibroblasten und der Gefäßdichte teils unmöglich machten bzw. erschwerten. Ferner fehlen humane Biopsiestudien, die in großer Stückzahl mit der dadurch erst möglichen statistischen Analyse die biologischen Veränderungen untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden humane Biopsien aus dem mittleren Drittel knochenblock-freier Hamstringsehnen verwendet. Es erfolgten histologische und immunhistologische Färbungen, die sowohl eine deskriptive als auch semiquantitative Untersuchung der zellulären und strukturellen Umbauvorgänge im Gewebe ermöglichten.

### **1.12 Hypothesen**

1: Die Revaskularisierung und Rezellularisierung des humanen vorderen Kreuzband-Transplantates zeigt eine geringere Intensität auf im Sinne einer Verlangsamung als im in-vivo Tiermodell.

2: Es zeigen sich zeitlich zuzuordnende qualitative und quantitative Unterschiede des Bandremodelings im Verlauf der ersten 52 postoperativen Wochen.

3: Das Bandremodeling des humanen vorderen Kreuzbandersatzes ist nach 52 Wochen nicht abgeschlossen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign und Patienten**

An der Klinik Eindhoven in den Niederlanden wurden in einem Zeitraum von 2001 bis 2007 vom Leiter der Knieorthopädie, Dr. med. Janssen, im Rahmen von Second-Look Arthroskopien bei 42 Patienten Gewebebiopsien aus der Übergangzone von Transplantaten des vorderen Kreuzbandes in einem Zeitraum von 6 bis 117 Monate nach primärem Kreuzbandersatz entnommen. Von weiteren 11 Patienten, die sich einer VKB-Rekonstruktion unterziehen lassen mussten, wurden von drei Patienten 17 Proben aus den Überresten der Hamstringsehnen (n=17) und von acht Patienten jeweils eine Probe vom nativen VKB (n=8) entnommen, die als Kontrollgruppen dienten. Die Rekonstruktion erfolgte durch einen erfahrenen Operateur mit einem freien autologen Hamstringsehnentransplantat. Die Operationstechnik war für alle Patienten gleich.

Alle Biopsien wurden aus dem intraligamentären mittleren Anteil/Übergangzone der Transplantate entnommen. Die Rehabilitation erfolgte bei allen Patienten gleich. Alle Patienten zeigten einen komplikationslosen Heilungsverlauf. Die Sekond-Look Arthroskopie stand nicht mit der initialen VKB Rekonstruktion im Zusammenhang. Das gewonnene Material wurde zunächst histologisch aufgearbeitet und anschließend wurden die hier im Weiteren vorgestellten histologischen Untersuchungen durchgeführt. Die Zustimmung der Patienten und ein Votum der Ethikkommission des Máxima Medical Center Eindhoven-Veldhoven, in den Niederlanden lagen vor. Ziel dieser Studie ist die histologische Untersuchung dieses Gewebes zur deskriptiven und semiquantitativen Analyse der zellulären Umbauvorgänge im Rahmen des Bandremodelings.

Hierzu wurden die Proben der 42 Patienten in drei Gruppen, je nach Zeitpunkt ihrer Entnahme nach VKB-Rekonstruktion eingeteilt: Gruppe 1 = 6-12 Monate, Gruppe 2 = 13 bis 24 Monate, Gruppe 3 = größer 24 Monate (*siehe Tab.1 und 2*). Außerdem dienten Biopsien von Überresten der Hamstringsehnen nach VKB-Rekonstruktion (HAT; n=17) und native VKB (n=8) als Kontrollgruppen. Diese Patienten standen nicht mit den Gruppen 1-3 im Zusammenhang. Die Biopsien der Hamstringsehnen-Kontrollgruppe wurden am Ende des VKB-Rekonstruktion und die Biopsien der nativen VKB vor der VKB-Rekonstruktion gewonnen.

	<b>Alter</b> Median (Spannweite) Mittelwert (SD)		<b>Geschlecht</b> (m/f)		<b>KT 1000 133N</b> verletzt - nicht verletzt Mittelwert (SD)
<b>Gruppe 1</b> 6-12 Monate (n=15)	28,0 (19-54) 31,07 (11,77)	p=0,461	9 / 6	p=0,932	0,80 (0,78)
<b>Gruppe 2</b> 13-24 Monate (n=16)	25,5 (17-46) 27,69 (8,69)		10 / 6		0,63 (0,72)
<b>Gruppe 3</b> > 24 Monate (n=11)	29,00 (21-37) 29,00 (6,26)		7 / 10		1,00 (0,78)

**Tab. 1:** Demographie (Alter, Geschlecht) aller Gruppen, KT 1000 Resultate (133N Unterschiede zwischen verletztem und nicht verletztem Bein)

	<b>Zeitintervall zwischen Probenentnahme und VKB Rekonstruktion (Monate)</b>	<b>sportliche Aktivitätslevel</b> W=Wettkampf F=Freizeit A=bewegungsarm	<b>Grund für die Sekond Look Arthroskopie</b>
<b>Gruppe 1</b> Bioplate 6-12 Monate (n=15)			
1	6	W (Fußball)	Materialentfernung
2	6	W (Fußball)	Laterale Menishektomie/Knorpeldebridement
3	7	W (Basketball)	Knorpeldebridement
4	7	W (Fußball)	Mediale Menishektomie, (Insuffizienz der Meniskusnaht)
5	7	W (Fußball)	Laterale Menishektomie
6	7	W (Fußball)	Mediale Menishektomie
8	8	F (Tennis)	Materialentfernung
7	9	W (Fußball)	Mediale Menishektomie
9	9	F (Tennis)	Materialentfernung
10	9	F (Ski)	Materialentfernung

11	10	F (Tennis)	Mediale Menishektomie
12	11	F (Fußball)	Knorpeldebridement
13	11	F (Fußball)	Materialentfernung
14	11	W (Feldhockey)	Entfernung freier Knorpelkörper
15	12	F (Reiten)	Mediale Menishektomie
<b>Gruppe 2</b>			
Bioplate 13-24 Monate (n=16)			
1	13	W (Fußball)	Knorpeldebridement
2	14	F (Tennis)	Materialentfernung
3	14	F (Ski)	Knorpeldebridement
4	14	W (Fußball)	Materialentfernung
5	14	F (Skating)	Laterale Menishektomie
6	16	W (Fußball)	Materialentfernung
7	16	F (Ski)	Materialentfernung
8	17	W (Fußball)	Materialentfernung
9	17	F (Volleyball)	Laterale Menishektomie
10	18	A	Knorpeldebridement /Mikrofraktur
11	20	F (Fußball)	Partielle mediale Menishektomie
12	21	W (Fußball)	Materialentfernung
13	21	W (Fußball)	Mediale Menishektomie und Materialentfernung
14	22	W (Fußball)	Mediale Menishektomie
15	23	W (Fußball)	Materialentfernung
16	24	W (Fußball)	Mediale Menishektomie
<b>Gruppe 3</b>			
Bioplate > 24 Monate (n=11)			
1	26	W (Basketball)	Mediale Menishektomie
2	30	W (Feldhockey)	Materialentfernung

3	31	F (Radfahren)	Knorpeldebridement
4	31	A	Entfernung freier Knorpelkörper
5	34	W (Fußball)	Knorpeldebridement
6	37	W (Fußball)	Materialentfernung
7	48	F (Ski)	pain medial knee, no cause found
8	53	F (Tennis)	Ruptur des lateralen Retinakulums
9	77	W (Fußball)	Materialentfernung
10	79	W (Fußball)	Mediale Menishektomie
11	117	W (Fußball)	Laterale Menishektomie

**Tab. 2:** Zeitintervall zwischen Probenentnahme und VKB Rekonstruktion, sportliche Aktivitätslevel und der Grund für die Sekond Look Arthroskopie für die Gruppen 1-3

### 2.1.1 Transplantatwahl

Für unsere Untersuchungen wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen das vordere Kreuzband mit einer Hamstringsehne rekonstruiert wurde. Die Hamstringsehnen sind der Patellarsehne wegen der geringeren Entnahmemorbidität überlegen [71]. Außerdem entsteht kein zusätzliches Trauma für den Streckapparat des Kniegelenkes, wodurch keine Entnahme-Defekt-Arthropathie impliziert wird.

### 2.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien waren:

1. Vorherige VKB-Rekonstruktion von einem erfahrenen Orthopäden mittel Vierfach-Hamstringtransplantat, bestehend aus einer Doppelstrang-Semitendinosus- und einer Doppelstrang-Gracilis-Sehne, mit Mulch-Schraube im Femur und mit einer sog. WasherLoc Fixierung in der Tibia<sup>1</sup>.
2. Keine Anzeichen von abnormer Beweglichkeit bei der klinischen Untersuchung, auch nicht bei der Untersuchung unter Narkose während der Second-Look Arthroskopie. Ein normales Knie mit normaler Laxheit/Beweglichkeit wird definiert als Knie ohne klinische

<sup>1</sup> Arthrotec, Warsaw, IN, USA

Schublade, KT 1000 < 3mm Unterschied bei 133N<sup>2</sup> im Seitenvergleich mit negativem Pivot-shift-Test.

3. Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

Ausschlusskriterien waren:

1. Mangelnde Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Studie.
2. Vorherige VKB-Rekonstruktion von einem anderen Orthopäden oder andere Methode der Transplantatfixierung.
3. Anormale Instabilität/Beweglichkeit der körperlichen klinischen Untersuchung oder während der Untersuchung unter Narkose bei der Second-Look Arthroskopie.
4. Anormale Instabilität/Beweglichkeit des Kniegelenkes wurde definiert als positive Schublade, KT-1000 > 3mm, Unterschiede bei 133N<sup>3</sup> im Seitenvergleich oder bei positivem Pivot-shift-Test. Cyclops-Syndrom, ein Streckdefizit oder andere Gründe, die mit möglichen Problemen der Kreuzbandplastik in Beziehung stehen.
5. Unzureichende Gewebeprobe für die histologische Analyse.

### **2.1.3 Klinische Studie (vs. Tiermodell)**

In der orthopädischen Forschung hat sich das Schaf hinsichtlich seiner anatomischen Ähnlichkeit zum menschlichen Kniegelenk als Versuchstier durchaus bewährt [75, 131]. Die jedoch unterschiedlichen, teils kontroversen Ergebnisse zwischen humanen und tierexperimentellen Studien bezüglich des Remodelings lassen annehmen, dass ein freies Sehnen transplantat im Tiermodell anderen Remodeling- und Reifungsbedingungen unterliegt als im humanen Knie und daher beispielsweise mit einer unterschiedlichen Revaskularisierung einhergeht [11, 14, 98] [17, 18]. Während des Remodelingprozess des Sehnen transplantates, haben biologischen Einflüsse, wie die synoviale Transplantatumgebung und der Hoffa'sche Fettkörper, sowie postoperative Hämorrhagie und Inflammation, einen wichtigen Einfluss auf zelluläre Repopulation und Revaskularisierung. Des Weiteren sind Faktoren wie die Transplantatwahl, -fixierung, -isometrie und Kollagenbündelorientierung, sowie das postoperative Management von entscheidender Bedeutung. Dabei weist jedes

---

<sup>2</sup> MEDmetric Co., San Diego, CA., USA

<sup>3</sup> MEDmetric Co., San Diego, CA., USA

Tiermodell grundsätzlich einige Limitierungen auf, vor allem in der Kontrolle über die postoperative Gewichtsbelastung. Es ist bekannt, dass die mechanische Belastbarkeit des Transplantates bei fehlender oder übermäßiger Zugbelastung durch eine Änderung der Kollagenstruktur signifikant reduziert wird [127]. Deshalb wird eine Transplantatvorspannung vor Fixierung empfohlen [127]. Es ist also davon auszugehen, dass im Tiermodell im Vergleich zum Menschen ein intensiveres Remodeling bei inadäquater Transplantatvorspannung und -positionierung stattfindet [128].

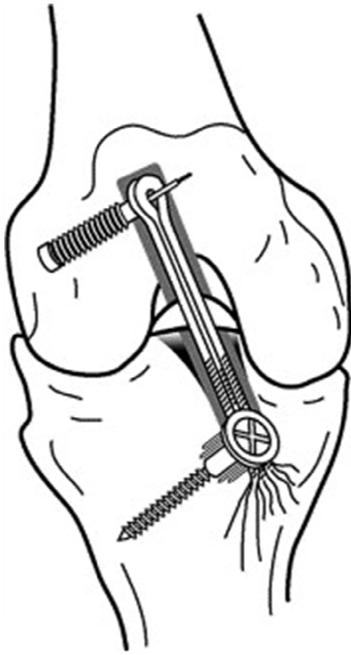
## **2.2 Operatives Vorgehen**

### **2.2.1 Operation und Rehabilitation**

Die vorausgegangene VKB-Rekonstruktion wurde nicht nur vom gleichen leitenden Orthopäden durchgeführt, sondern auch die OP-Technik war für alle Patienten auch derer, die als Kontrollgruppe fungierten, identisch. Die Operation (ACLR) erfolgte in den Jahren zwischen 1997 und 2007 unter standardisierten sterilen Bedingungen mit einem Vierfach-Hamstringtransplantat, bestehend aus einer Doppelstrang-Semitendinosus- und einer Doppelstrang-Gracilis-Sehne, welches mittels Mulch-Schraube im Femur und mit einer sog. WasherLoc Fixierung in der Tibia verankert wurde<sup>4</sup>. Zum Zeitpunkt der Fixierung lag die Spannung des Hamstringtransplantates bei 90-100 N, gemessen bei voller Knieextension. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wurden alle Kniegelenke klinisch untersucht. Mit klinischen Tests wie dem Lachman Test (< 3 mm) und Pivot Shift wurden im Vorfeld Instabilitätsanzeichen ausgeschlossen. Weitere Hinweise zu Untersuchungsergebnissen wie Schwellung, Knieschmerz und Bewegungseinschränkung bestanden nicht.

---

<sup>4</sup> OP-Technik von S.M. Howell, MD. Fixationsmaterialien von Arthrotec, Warsaw, IN., USA



**Abb. 7:** Schematische Darstellung einer VKB Plastik mittels Bone Mulch-Schraube im Femur und WasherLoc Verankerung in der Tibia. [129]

Alle Patienten, einschließlich die der Kontrollgruppen, gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Gewebeentnahme sowie zur histologischen Aufarbeitung. Die Biopsien der nativen VKB-Kontrollgruppe wurden von Patienten, die nicht mit Gruppen 1-3 im Zusammenhang standen entnommen und sich einer VKB-Rekonstruktion nach einem akuten vorderem Kreuzbandriss des femoralen Anteils (spätestens 8 Wochen nach Verletzung) unterzogen. Daher war es möglich, Gewebeproben von dem intakten zentralen Anteil des nativen vorderen Kreuzbandes zu erhalten. Nachdem die Biopsien des nativen VKB entnommen wurden, wurde das verbleibende Gewebe entfernt, um die VKB-Rekonstruktion fortzusetzen. Außerdem dienten Biopsien von Überresten der Hamstringsehnen nach VKB-Rekonstruktion als weitere Kontrollgruppe. Sie standen ebenfalls nicht mit den Gruppen 1-3 im Zusammenhang und wurden am Ende des VKB-Rekonstruktion gewonnen.

Ab dem ersten postoperativen Tag wurde ein standardisiertes forciertes Rehabilitationsprogramm begonnen, in dem eine schmerzadaptierte Vollbelastung unter Nutzung von Gehstützen für die ersten 2 postoperativen Wochen verwendet wurden. Neben den aktiven Bewegungsübungen bei der Physiotherapie, wurde das Knie

zusätzlich passiv in einer Motorschiene<sup>5</sup> um 90 Grad flektiert. Übungen in der geschlossenen Kette wurden ebenfalls am ersten Tag nach der Operation verordnet. Kriterien für das Absetzen der Physiotherapie war eine aktive Kniebeugung über 90 Grad, die Fähigkeit, selbstständig ohne Gehstützen in Vollbelastung gehen zu können. Dann war uneingeschränkte Bewegungsfreiheit erlaubt. Es wurden keine Knieorthesen verwendet. Nach der stationären Entlassung wurde die Physiotherapie ambulant 2-3 mal pro Woche gemäß einem standardisierten Nachbehandlungsprotokoll fortgesetzt. Demnach durfte die Knieextension uneingeschränkt in der geschlossenen und in der offenen Kette geübt werden. Während eine Wiederaufnahme des Laufens auf ebener Strecke bereits nach acht bis zehn Wochen erlaubt wurde, wurde das Verrichten schwerer körperlicher Arbeit erst nach drei Monaten bewilligt. Das Ausüben wettbewerbsfähiger Kontaktsportarten hingegen wurde erst nach 4-6 Monaten zugelassen.

### **2.3 Probenentnahme und histologische Aufarbeitung**

Bei 67 Patienten wurde in einem Zeitraum von 2001 bis 2007 Biopsien des Transplantates 6-117 postoperative Monate nach VKB Ersatz gewonnen. Die Proben wurden in einer Second-Look Arthroskopie gewonnen, die nicht mit der initialen VKB Rekonstruktion im Zusammenhang standen.

Es wurde eine Drei-Portal Arthroskopie durchgeführt (anteromediale, anterolaterale und superomediale Pforte). Neben der klinischen Untersuchung unter Narkose, wurde auch die Funktionalität des VKB-Transplantates während der Arthroskopie geprüft, d.h. ob das Transplantat straff gespannt und die femoralen und tibialen Insertionsstellen intakt sind. Danach wurde eine Gewebeprobe von einem der vier Stränge des Transplantates genommen. Die Synovialschicht wurde im mittleren Abschnitt des Transplantates eröffnet. Eine arthroskopische Stanze wurde durch die anteromediale Pforte eingeführt, um eine Probe der oberflächlichen Transplantatfasern der Hamstringsehnen zu gewinnen. Hierbei wurde im Speziellen darauf geachtet, dass nicht nur eine Probe der Synovialschicht, sondern tatsächlich der oberflächlichen Bandfasern entnommen

---

<sup>5</sup> OrthoRehab, Oakville, Ontario, Kanada

wurde. Nach der Biopsieentnahme wurden weitere Verfahren wie eine Menishektomie, Knorpeldebridement oder eine Hardware-Entfernung durchgeführt.

Alle gewonnenen Proben waren ca. 2-3 mm groß und wurden durch den Pathologen für 2-3 Tage in 4% Formaldehyd Lösung<sup>6</sup> fixiert. Anschließend wurden sie für mindestens 15 min gewässert, danach folgte die automatische Entwässerung über 67 Stunden<sup>7</sup> im Entwässerungsautomaten und die Einbettung in Paraffin<sup>8</sup>. Mit einem Mikrotom<sup>9</sup> wurden von den fertigen Gewebeblöcken 4 µm dünne Serienschritte angefertigt, die anschließend auf silanisierte Adhäsions-Objektträger<sup>10</sup> aufgezogen wurden.

## **2.4 Konventionelle Färbungen**

Alle zu färbenden Schnitte wurden in 100 % Xylol für zweimal 10 Minuten gebracht, um anschließend in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 80% ,70%) für je 2 Minuten entparaffiniert zu werden.

Als konventionelle Färbungen für die deskriptive Auswertung dienten die Hämatoxylin/Eosin-Färbung<sup>11</sup> (HE) und die Masson-Goldner Trichromfärbung<sup>12</sup> (MG). Die HE-Färbung ist besonders für die deskriptive Analyse der Kernmorphologie und der Zellverteilung geeignet, wobei der azidophile Farbstoff Hämatoxylin die Zellkerne blau darstellt und der basophile Farbstoff Eosin die Interzellulärsubstanz und das Cytoplasma rosa anfärbt. Die Masson-Goldner Färbung ermöglicht die Beurteilung der Extrazellulären Matrix, die Anordnung des Kollagens und der bindegewebigen Septen. Hierbei werden die Zellkerne bräunlich-schwarz, das Zytoplasma ziegelrot und das Bindegewebe grün dargestellt.

---

<sup>6</sup> Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

<sup>7</sup> Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

<sup>8</sup> Paraplast Plus®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA

<sup>9</sup> Leica RM 2125, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

<sup>10</sup> HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

<sup>11</sup> Hämatoxylin, Papanicolaous Lösung 1a Harris´, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

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

<sup>12</sup> Orange g Differenzierungslösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

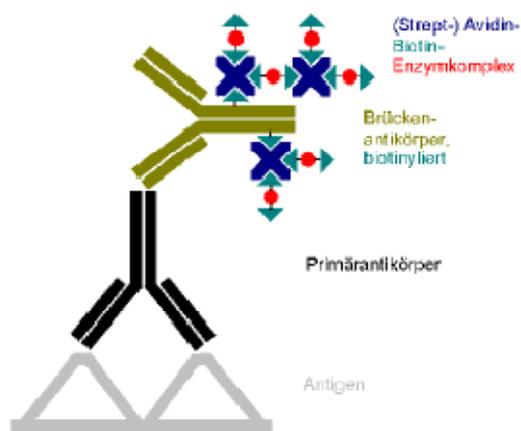
Lichtgrün, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

Weigerts Eisenhämatoxylin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

## 2.5 Immunhistologie

Mit der Immunhistologie können Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden und so antigene Strukturen von Zellen und Gewebe identifiziert und besser dargestellt werden.

Grundsätzlich werden heutzutage poly- und monoklonale Antikörper unterschieden sowie Detektionssysteme aus verschiedenen Antikörper-Farbstoff-Kombinationen [130, 131]. Mittels indirekter Methode und dem Avidin-Biotin Komplexes konnte in unserer Studie die entstandene Antigen-Antikörper-Verbindung optisch dargestellt werden. (Abb. 8) [61].



### (Strept-) Avidin-Biotin-Complex ABC-Methode

**Abb. 8:** Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbemethode mit biotinyliertem Sekundärantikörper und Avidin-Biotin-Komplex. Aus [66]

### 2.5.1 Immunhistologische Färbung der Myofibroblasten

Das in den Myofibroblasten enthaltene  $\alpha$ -smooth muscle Aktin (ASMA) ist für die kontraktile Eigenschaften verantwortlich und lässt sich immunhistochemisch anfärben [103]. Alle Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und rehydriert. Es folgte bei Raumtemperatur eine 20-minütige Inkubation mit equinem Normalserum<sup>13</sup>, um

<sup>13</sup> Normal Horse Serum, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

unspezifische Hintergrundfärbungen weitgehend zu verhindern [131]. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen Anti-ASMA-Primärantikörper<sup>14</sup> in einer Verdünnung von 1:100 bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wurde nach zweimaligem Spülen mit PBS-Puffer<sup>15</sup> ein biotinylierter Sekundärantikörper<sup>16</sup> für 30 Minuten aufgetragen, der an den Primärantikörper bindet. Nach einem weiteren Spülvorgang mit PBS-Puffer erfolgte die Inkubation mit ABC-Komplex<sup>17</sup> (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex) für 50 Minuten. Dieses Reagenz bindet wiederum an den biotinylierten Sekundärantikörper, während die alkalische Phosphatase als Markerenzym verwendet wurde. Anschließend wurde mit einem Chromogenpuffer<sup>18</sup> gespült und das Substrat Vector® Red<sup>19</sup> (gelöst in 100 mM - 200 mM Tris-HCl, pH 8,2 - 8,5) aufgebracht, welches von der alkalische Phosphatase zu einem Chromogen umgesetzt wird und die markierten ASMA-Moleküle rot anfärbt. Die Farbreaktion wurde unter Sichtkontrolle in einer Pufferlösung gestoppt. Die Zellkerne wurden schließlich noch mit Hämatoxylin nach Mayer (1:2) gegengefärbt. Anschließend wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach Verbringung in Xylol mit Vitro-Clud®<sup>20</sup> eingedeckelt.

Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Während bei jeder Färbung als Negativ-Kontrolle ein Schnitt mit Puffer anstelle des Antikörpers inkubiert wurde, dienten die glatten Gefäßmuskelzellen eines jeden Schnittes als interne Positiv-Kontrolle.

## 2.5.2 Immunhistologische Faktor VIII Färbung

Die immunhistochemische Markierung des Faktor VIII, der in Endothelzellen und somit in den Gefäßwänden selbst kleinster Kapillaren nachweisbar ist, diente der Darstellung der Revaskularisierung der Transplantate.

---

<sup>14</sup> Smooth Muscle Actin, Klon 1A4, DAKO A/S, Glostrup, Denmark

<sup>15</sup> 3L 175 Phosphatpuffer Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

<sup>16</sup> Vectastain®, Biotinylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG, Made in Horse, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>17</sup> ABC kit, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>18</sup> Trizma® Base T-1503, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA  
Trizma® Hydrochloride T-3253, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA  
Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt

<sup>19</sup> Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>20</sup> Vitro-Clud®, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland  
Säurefuchsin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

Dazu erfolgte nach der Entparaffinierung und zweimaliger Spülung à 5 Minuten in PBS-Puffer<sup>21</sup> pH 7,2, die Demaskierung des Antigens durch eine 10 minütige Vorbehandlung mit Pronase<sup>22</sup> bei 37 °C. Anschließend erfolgte eine Spülung unter Leitungswasser für 10 Minuten und Verbringung in Pufferlösung. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbungen wurden die Schnitte dann mit einem Normalserum<sup>23</sup> 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Normalserum lediglich abgekippt wurde, kam direkt der polyklonale Faktor VIII Antikörper<sup>24</sup> in einer Verdünnung von 1:200 darauf. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 4°C. Am Folgetag wurde nach zweimaligen Spülen im PBS-Puffer der biotinylierte Zweitantikörper<sup>25</sup> aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Spülvorgang mit PBS-Puffer erfolgte die Inkubation mit ABC-Komplex<sup>26</sup> mit alkalischer Phosphatase als Reporterenzym für 50 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Spülen wurde das Reagenz Vector® Red<sup>27</sup> (gelöst in 100 mM – 200 mM Tris-HCl, pH 8,2 - 8,5) aufgetragen, welches als Substrat Neofuchsin54 enthält und von der alkalische Phosphatase zu einem roten Chromogen reduziert wird. Somit stellten sich die zu detektierende Strukturen der Gefäßkapillaren rot dar. Als die gewünschte Farbreaktion war, wurde diese unter Sichtkontrolle in einer Pufferlösung gestoppt. Die Zellkerne wurden schließlich noch mit Hämatoxylin nach Mayer (1:2) gegengefärbt. Anschließend wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach Verbringung in Xylol mit Vitro-Clud®<sup>28</sup> eingedeckelt. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Während bei jeder Färbung als Negativ-Kontrolle ein Schnitt mit Puffer anstelle des Antikörpers inkubiert wurde, diente gut vaskularisierte Schafshaut als Positiv-Kontrolle.

---

<sup>21</sup> 3L 175 Phosphatpuffer Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

<sup>22</sup> Protease, Sigma, Nr.: P- 5147

<sup>23</sup> Normal Horse Serum, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>24</sup> Dako Rabbit Anti- Human von Willebrandt Factor, DAKO Glostrup, Dänemark, Kat.-Nr.: M0851

<sup>25</sup> Vectastain®, Biotinylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG, Made in Horse, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>26</sup> ABC kit, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>27</sup> Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>28</sup> Vitro-Clud®, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

## **2.6 Auswertung der Daten**

Die histologische Analyse der Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines konventionellen Lichtmikroskops<sup>29</sup> und einer angeschlossenen Kamera<sup>30</sup>. Die Dokumentation ermöglichte ein digitales Bildanalyzesystem<sup>31</sup>.

### **2.6.1 Deskriptive Auswertung**

Zur deskriptiven Auswertung wurden die Transplantate bei Vergrößerungen von 1,6; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100 beurteilt. Während mit der Masson-Goldner Färbung die Kollagenanordnung und das Vorhandensein bindegewebiger Septen analysiert werden konnte, diente die HE-Färbung vor allem zur Beurteilung der Zellverteilung (peripher, zentral) sowie der Zell- und Kernmorphologie (rund, ovoid, spindelförmig) und deren Größe. Des Weiteren wurde anhand der immunhistochemisch gefärbten Schnitte die Vaskularisierung der Präparate sowie die Verteilung und Gestalt der Myofibroblasten evaluiert. Bei der Auswahl der ROI's wurde versucht, sowohl möglichst große Teile auch möglichst repräsentative Bereiche des Präparates in die Auswertung einzubeziehen. Dazu wurden die Präparate zunächst im Gesamten gemustert und anschließend die ROI'S nach oben genannten Kriterien ausgewählt.

### **2.6.2 Bindegewebszellen und Myofibroblasten**

Anhand der immunhistochemisch gefärbten Transplantate erfolgte die quantitative Analyse der Zellen und der Myofibroblasten mit Hilfe eines computergestützten Datenanalyzesystems<sup>32</sup>. Dazu wurden die Schnitte unter das Mikroskop<sup>33</sup> verbracht, mit Hilfe einer Kamera<sup>34</sup> gescannt und das Bild auf den Rechner übertragen. Das Auszählen der Zellen in je 8 bis 10 ROI's in beliebiger Größe (mm<sup>2</sup>) erfolgte in 10-facher Vergrößerung und in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die Anzahl der ASMA-negativen Bindegewebszellen (Fibroblasten und Fibrozyten) und im zweiten

---

<sup>29</sup> DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

<sup>30</sup> Sony Color Video Camera, Modell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

<sup>31</sup> KS 400 3.0, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland

<sup>32</sup> KS 400 3.0, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland

<sup>33</sup> DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

<sup>34</sup> Sony Color Video Camera, Modell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

Schritt die Anzahl der ASMA-positiven Myofibroblasten ermittelt. ASMA wird jedoch nicht nur von den MFB exprimiert, sondern auch von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen. Daher mussten die Myofibroblasten zusätzlich durch ihre morphologische Gestalt (ovoide Zellform) und ihrer Lage (intraligamentär ungleich verteilt) im Gewebe differenziert werden. Wenn sich eine Zelle nicht eindeutig den Myofibroblasten zuordnen ließ, wurde diese Zelle als ASMA-negativ gewertet. Zudem wurden Zellen, die nahe an Gefäßen lagen, nicht als ASMA-positiv mitgezählt. Das Auszählen erleichterte ein Bildanalyse-System (Axiovision), das durch Addition der von mir markierten ASMA-positiven und ASMA-negativen Zellen die Gesamtzellzahl/mm<sup>2</sup> sowie die Myofibroblastenzahl/mm<sup>2</sup> ermittelte.

### **2.6.3 Faktor VIII Auswertung**

Anhand der immunhistochemisch gefärbten Transplantate erfolgte die quantitative Analyse der Gefäße. Das Auszählen der Gefäße erfolgte je nach Präparatgröße in je 8 bis 10 ROI's erfolgte in mit Hilfe eines computergestützten Datenanalyse-Systems<sup>35</sup>. Dazu wurden die Schnitte unter das Mikroskop<sup>36</sup> verbracht, mit Hilfe einer Kamera<sup>37</sup> gescannt und das Bild auf den Rechner übertragen. Zunächst erfolgte eine Beurteilung des gesamten Transplantates in 50facher Vergrößerung, in der die Qualität des Schnittes, der Färbung, das Vorhandensein und die Dicke der synovialen Deckschicht sowie die Gefäßverteilung evaluiert wurden. Das Auszählen der Faktor VIII positiven Gefäßanschnitte erfolgte in je 8 bis 10 ROI's mit einer beliebigen Größe (mm<sup>2</sup>), wobei versucht wurde, möglichst große und repräsentative Teile des Präparates in die Auswertung mit einzubeziehen.

Aus der Zahl der detektierten Gefäßanschnitte sowie der ausgewerteten Fläche konnte nun mit Hilfe des Bildanalyse-System (Axiovision) die Zahl der Gefäße pro Fläche (mm<sup>2</sup>) ermittelt werden.

---

<sup>35</sup> KS 400 3.0, Zeiss

<sup>36</sup> DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

<sup>37</sup> Sony Color Video Camera, Moell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

#### **2.6.4 Statistik**

Zur statistischen Datenanalyse wurde zunächst der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Da keine Normalverteilung vorlag, erfolgte die weitere Analyse mittels nicht parametrischer Testverfahren. Dabei wurde zum statistischen Vergleich der Gruppen über die Zeit der Kruskal-Wallis Test, durchgeführt. Anschließend erfolgte der Mann-Whitney-U-Test zum paarweisen Vergleich innerhalb einer Gruppe. Die Korrektur erfolgte mittels Bonferroni-Holm Korrektur. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Für den Vergleich der Geschlechter wurde der Pearsons' Chi-square Test durchgeführt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Deskriptive Auswertung**

Anhand der Biopsien war eine Einteilung der Präparate in periphere, intermediäre oder zentrale Abschnitte nicht möglich. Auch eine Längs- oder Querschnittzuordnung konnte nicht vorgenommen werden.

##### Native Strukturen

Im nativen vorderen Kreuzband zeigten sich die Zellen gleichmäßig über das gesamte Präparat verteilt und zwischen den Kollagenfasern longitudinal ausgerichtet. Die Zellkerne stellten sich größtenteils stabförmig, aber auch teils ovoid dar (Abb. 9a). Die Gefäße waren gleichmäßig verteilt und lagen in bindegewebige Septen eingebettet. Es war eine deutliche geordnete, parallel ausgerichtete Kollagenstruktur erkennbar (Abb. 9a). Eine ein- bis zweilagige synoviale Deckschicht war vorhanden.

In den nativen Flexorsehnen waren subjektiv weniger Zellen als in den Kreuzbändern zu finden. Es lag ebenfalls eine gleichmäßige Zellverteilung vor. Die Zellen lagen ebenfalls longitudinal angeordnet zwischen den Kollagenfaserbündeln. Die Zellkerne waren spindelförmig, schmal und länglich. Wenige in bindegewebige Septen eingebettete Gefäße durchzogen die Sehne. Es war eine zwei- bis vierlagige synoviale Deckschicht vorhanden.

##### Gruppe 1 (6-12 Monate)

Die Transplantate zeigten in ihrer Zell- und Gefäßverteilung mit teils hyperzellulären und azellulären Bereichen eher ein inhomogenes Bild. Im Vergleich zu den nativen Kontrollgruppen waren die Zellen deutlich größer. Die Zellkerne waren vor allem in den hyperzellulären Bereichen rund bis ovoid, während die Zellkerne der einzeln liegenden Zellen eher spindelförmig waren. Die Gefäßverteilung war sehr ungleichmäßig und variierte stark vom jeweiligen Präparat, jedoch war der Gefäßgehalt im Vergleich zu den nativen Strukturen deutlich höher. Bindegewebsstraßen waren nicht zu erkennen. Die Kollagenstruktur erschien vom 6. bis zum 9. postoperativen Monat deutlich ungeordnet. Erst ab dem 10. postoperativen Monat zeigte sich in der Kollagenstruktur zunehmend

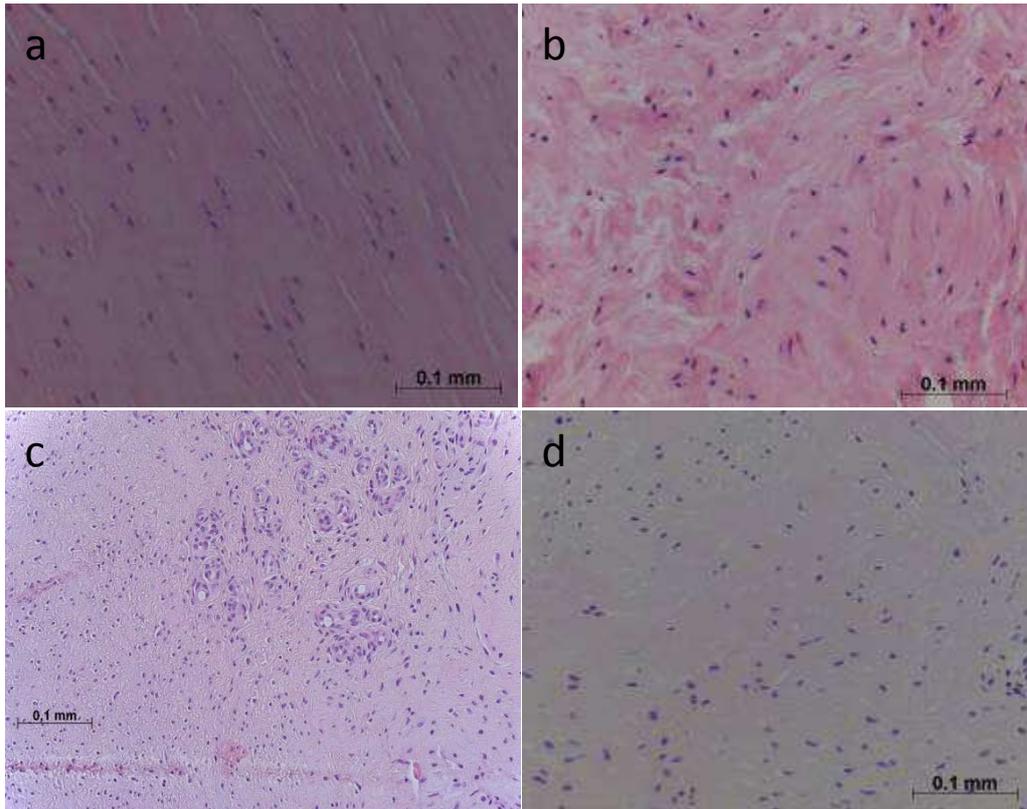
eine grobe Ordnung. Die Transplantate waren teils von einer bis zu 9-15 lagigen synovialen Hülle umgeben.

### Gruppe 2 (13-24 Monate)

In dieser Gruppe zeigte sich in den meisten Präparaten zunehmend eine homogene Zellverteilung über das ganze Transplantat (Abb. 9c). Azelluläre Bereiche waren kaum vorhanden. Zum Teil fand man besonders in der Umgebung von Gefäßen hyperzelluläre Bereiche, aber auch hypozelluläre Bereiche. Es waren überwiegend kleine rundovale Zellkerne zu erkennen. Der Gefäßgehalt war deutlich höher im Vergleich zu den nativen Strukturen und zu der vorhergehenden Gruppe 1. Die Gefäße waren über das ganze Transplantat zu finden. Sie verliefen in bindegewebigen Straßen, teilweise lagen sie frei im Transplantat. Die Kollagenstruktur zeigte sich teils geordneter, aber auch noch teils ungeordnet. Es lag zunehmend eine longitudinale Ausrichtung vor. Bei zwei Präparaten konnte aufgrund der Probengröße keine Beurteilung der Kollagenstruktur vorgenommen werden. Die synoviale Deckschicht war ein- bis zweilagig.

### Gruppe 3 (> 24 Monate)

Bei diesen Transplantaten war eine gleichmäßige Zellverteilung über das ganze Transplantat vorhanden (Abb. 9d). Die Zellkerne waren weitestgehend schmal und länglich. Jedoch erschienen sie kleiner bzw. kürzer als die Zellkerne der nativen Strukturen. Die Gefäße waren in allen Bereichen des Transplantats zu finden. Allerdings lagen starke Unterschiede zwischen den einzelnen Proben vor, so dass der Gefäßgehalt vor allem bis zu drei Jahren nach der VKB Rekonstruktion teils deutlich höher als bei den nativen Strukturen. Deutlich niedriger war der Gefäßgehalt hingegen ab drei Jahre aufwärts. Es waren zum Teil keine Gefäße vorhanden. Eine Kollagenseptenbildung war zwar zu erkennen, jedoch nicht so deutlich wie bei den nativen VKB`s. Die Kollagenstruktur stellte sich zum Hauptteil geordnet dar, vereinzelt jedoch auch noch ungeordnet. Die Dicke der synovialen Deckschicht hatte sich auf ein bis zwei Lagen normalisiert.



**Abb. 9:** HE Färbung: a) Hamstringsehne: mit longitudinaler Kollagenausrichtung, moderate Zelldichte und geringer Fibroblastenaktivität. b) Gruppe 1: deutlich ungeordnete Kollagenausrichtung, ansteigende Zelldichte, ovoide Zellmorphologie. c) Gruppe 2: weiterhin zunehmende Zell- und Gefäßdichte. d) Gruppe 3: zunehmend geordnete Kollagenstruktur.

### 3.2 Quantitative Auswertung

Grundsätzlich ist zu bemerken, dass sich die Aussagen über die Anzahl der Gesamtzellen und der Myofibroblasten auf den Medianwert beziehen. Dieser stellt das Lagemaß dar. Da jedoch in den ersten 12 Monaten insgesamt kaum Gefäße vorhanden waren, betrug der Medianwert hier aus statistischen Gründen null. Deshalb wurde bei den Gefäßen zusätzlich der Mittelwert angegeben. Zur Verdeutlichung sind die Mediane der einzelnen Gruppen, als auch die Mittelwerte der einzelnen Gruppen zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien in einer Tabelle aufgeführt.

### 3.2.1 Gesamtzellzahl

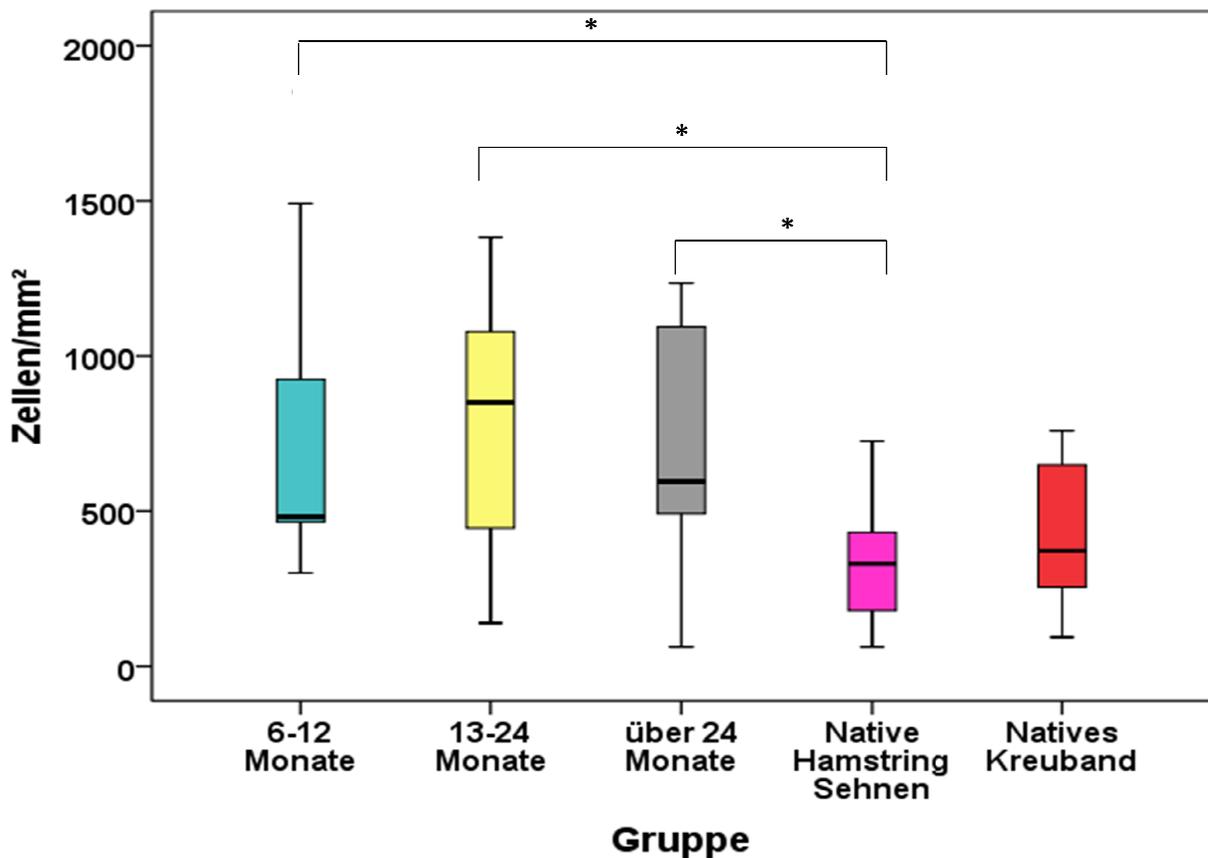
Bei den nativen Kreuzbändern und den Flexorsehnen zeigten sich die Zellen über das gesamte Präparat gleichmäßig verteilt und longitudinal zwischen den Kollagenfasern ausgerichtet. Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass es bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl starke Unterschiede zwischen den einzelnen Proben bzw. Patienten gab, so dass teils ausgedehnte Bereiche ohne Zellen bzw. Areale mit wenigen Zellen zu sehen war. Dies kam auch in einer hohen Standardabweichung zum Ausdruck.

Die Zellzahl des nativen Kreuzbandes war mit 371,78 /mm<sup>2</sup> (Median) geringfügig höher als die Zellzahl der nativen Flexorsehnen (Median 330,43 /mm<sup>2</sup>). Dies stimmt auch mit der deskriptiven Auswertung überein. In Gruppe 1 ist die Zellzahl mit 482,04 /mm<sup>2</sup> (Median) im Vergleich zu den nativen Flexorsehnen ( $p=0,036$ ) signifikant angestiegen. In diesem Zeitraum ist eine ungleichmäßige Zellverteilung mit teils azellulären Arealen und teils lokalisierten Zellhaufen zu sehen. Von Gruppe 1 zu Gruppe 2 850,85 /mm<sup>2</sup> (Median) stieg die Gesamtzellzahl weiter deutlich an, ohne dass signifikante Unterschiede zu verzeichnen waren. Außerdem lag eine zunehmend gleichmäßigere Zellverteilung vor. Im Vergleich zur nativen Flexorsehne war weiterhin eine signifikant erhöhte Zellzahl zu finden ( $p=0,005$ ). Im weiteren Verlauf kam es zu einer nicht signifikanten Abnahme der Zellzahl (595,61 /mm<sup>2</sup>) in Gruppe 3, in der die geordnete Struktur nahezu wieder hergestellt war und eine gleichmäßige Zellverteilung aufwies. Im Vergleich zur nativen Flexorsehne war die Zellzahl jedoch weiterhin signifikant erhöht ( $p=0,043$ ). Im Vergleich zum nativen Kreuzband war die Zellzahl ebenfalls in jeder Gruppe erhöht, es lagen jedoch keine signifikanten Unterschiede vor.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Zellzahl des remodelitem Gewebes auch noch nach zwei Jahren deutlich höher war als die der nativen Strukturen.

Gesamtzellzahl/mm <sup>2</sup>	Gruppe 1 (6-12 M.)	Gruppe 2 (13-24 M.)	Gruppe 3 ( >24 M.)	Native Hamstring- Sehnen (n=17)	Natives Kreuz- Band (n=8)
<b>Mittelwert (MW)</b>	736,34	789,49	718,18	327,57	535,75
<b>Spannweite</b>	1550,65	1243,49	1173,18	663,31	1545,90
<b>Median</b>	482,04	850,85	595,61	330,43	371,87
<b>Standardabweichung</b>	454,07	371,10	386,95	201,60	489,37

**Tab. 3:** Ergebnisse des Zellgehaltes aller Gruppen

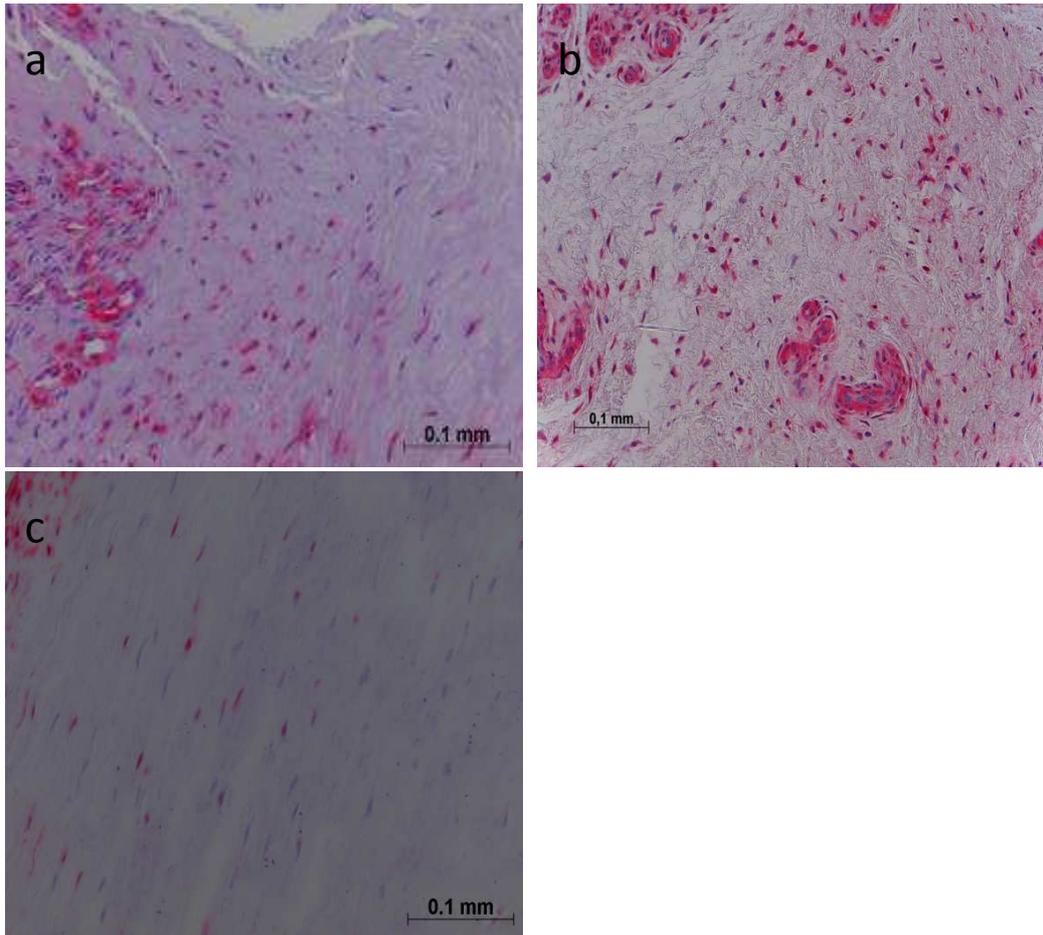


**Abb. 10:** Ergebnisse (Median) des Zellgehaltes aller Gruppen. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit \*

### 3.2.2 Immunhistologie der Myofibroblasten

Die Myofibroblasten zeigten sich in der immunhistologischen Färbung mit ASMA in der nativen Flexorsehne mit schmalen, spindelförmigen Kernen, die relativ regelmäßig über das Präparat verteilt waren. Im intakten vorderen Kreuzband stellten sich dagegen diese Kerne eher stab- bis ovoidförmig dar. Es gab hier jedoch ausgedehnte Areale ohne Myofibroblasten sowie starke Unterschiede zwischen den einzelnen Proben innerhalb einer Gruppe. Dies kam in den einzelnen Gruppen in einer hohen Standardabweichung zum Ausdruck. Dabei wies die native Flexorsehne mit 1,85 /mm<sup>2</sup> eine geringfügig höhere Anzahl der Myofibroblasten auf als die der nativen VKB 1,35/mm<sup>2</sup>, wenn auch dieser Unterschied nicht signifikant war. In Gruppe 1 waren in allen Teilen der Transplantate Myofibroblasten zu finden (Abb. 11a), es lag jedoch eine

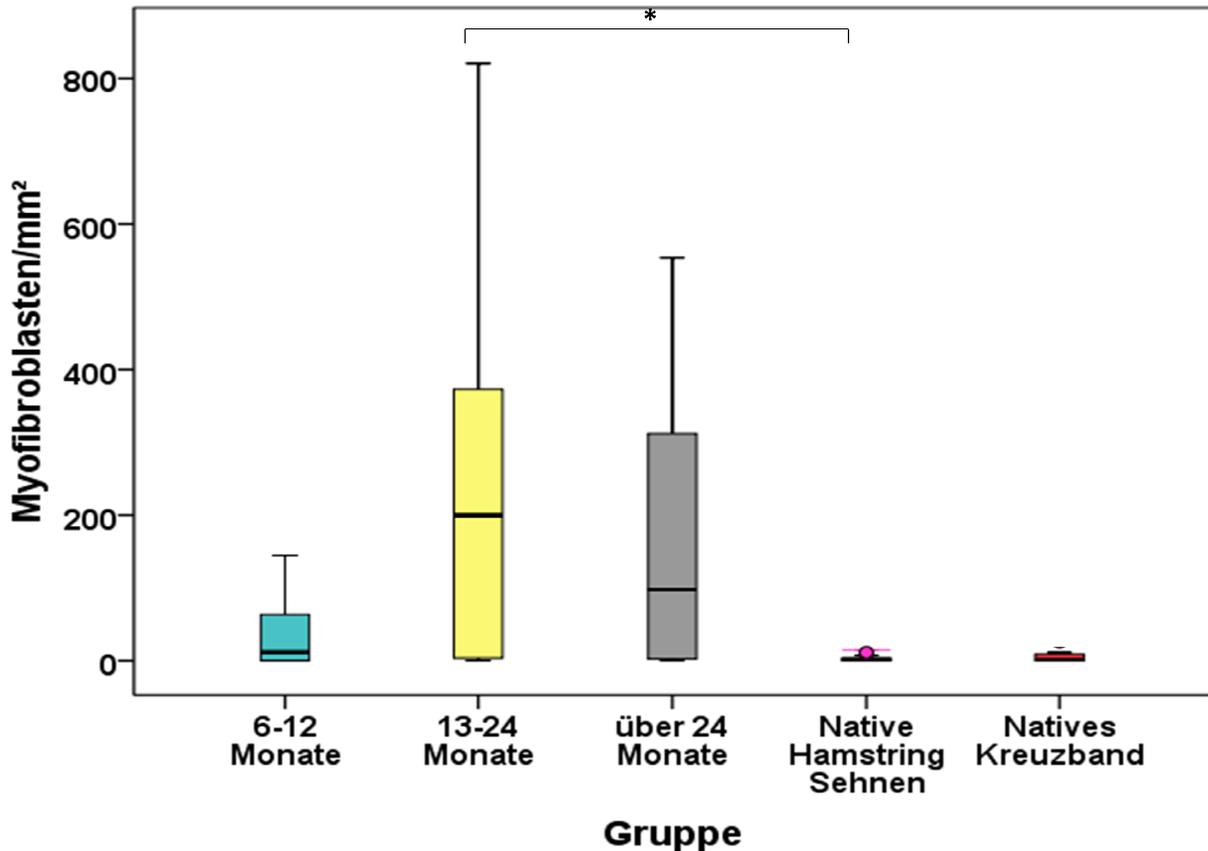
ungleichmäßige Verteilung. Bis zu 24 Monaten nahm die Zahl der Myofibroblasten deutlich zu und es waren keine myofibroblastenfreie Bereiche mehr vorhanden (Abb. 11b). In Gruppe 3 zeigte sich ebenfalls eine gleichmäßig Verteilung vorhanden. Die Myofibroblasten zeigten nun eine ovoide Gestalt und glichen sich damit den Myofibroblasten des intakten vorderen Kreuzbandes an (Abb. 11c), wohingegen in Gruppe 1 und 2 noch überwiegend ovoide bis spindelförmige Zellkerne vorherrschten. Die quantitative Auswertung ergab einen deutlichen Anstieg der Myofibroblasten von Gruppe 1 nach 2 (11,45/mm<sup>2</sup>, 199,58/mm<sup>2</sup>) mit signifikant mehr Myofibroblasten in Gruppe 2 im Vergleich zur Flexorkontrollgruppe (1,85/mm<sup>2</sup>, p=0,014) und einer ebenfalls deutlich höheren Myofibroblastenzahl im Vergleich zum nativen VKB (1,35/mm<sup>2</sup>). Von Gruppe 2 zu Gruppe 3 kam es nun zu einem geringgradigen Rückgang der Myofibroblasten (97,73/mm<sup>2</sup>), wobei die Myofibroblastenzahl im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (1,85/mm<sup>2</sup>, 1,35/mm<sup>2</sup>) weiter erhöht blieb ohne signifikante Unterschiede aufzuweisen.



**Abb. 11:** Myofibroblasten: Gruppe 1 (a) zeigt im Vergleich zu Gruppe 2 und 3 (b und c) eine moderate Anzahl der ASMA-positiven Zellen. Man beachte die deutliche Gefäßanfärbung in Gruppe 2 und 3.

Myofibroblasten/mm <sup>2</sup>	Gruppe 1 (6-12 M.)	Gruppe 2 (13-24 M.)	Gruppe 3 ( >24 M.)	Native Hamstring- Sehnen (n=17)	Natives Kreuz- band (n=8)
<b>Mittelwert (MW)</b>	35,58	224,06	201,90	3,39	5,73
<b>Spannweite</b>	144,72	820,62	815,00	14,55	25,66
<b>Median</b>	11,54	199,58	97,73	1,85	1,35
<b>Standardabweichung (SD)</b>	47,26	234,36	275,28	4,43	8,99

**Tab. 4:** Ergebnisse der Myofibroblastendichte aller Gruppen



**Abb. 12:** Ergebnisse (Median) der Myofibroblastendichte aller Gruppen. Die Anzahl der Myofibroblasten in Gruppe 2 (13-24 Monate) war im Vergleich zu den nativen Hamstringsehnen signifikant höher ( $p= 0,014$ ). Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit \*

### 3.2.3 Immunhistologie der Gefäße

Bei den nativen Kontrollgruppen durchzogen die Gefäße gleichmäßig das Präparat und lagen in bindegewebige Septen eingebettet.

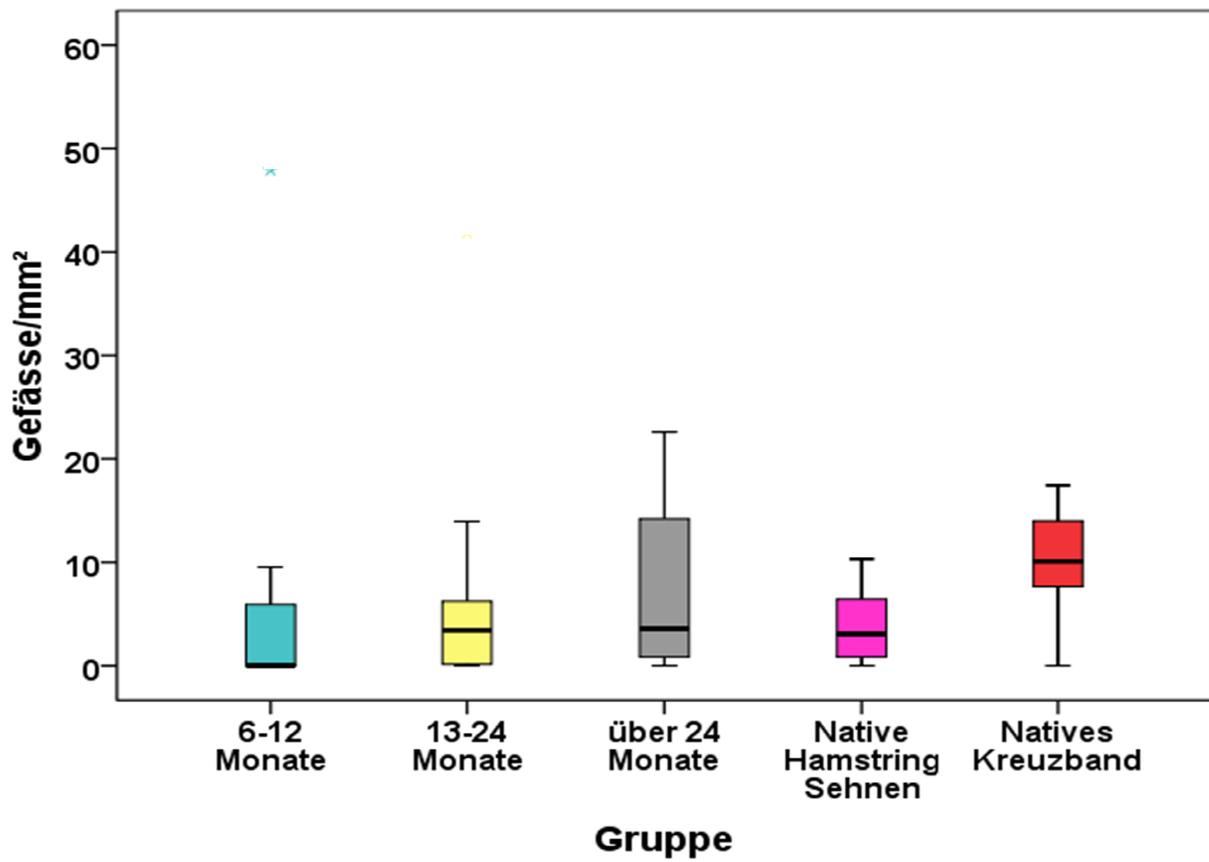
Da die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich mittel Kruskal- Wallis- Test zeigt, wurde auf weitere Tests zum paarweisen Vergleich verzichtet. Außerdem war aus statistischen Gründen in Gruppe 1 (6-12 Monate) der Median null, daher ist hier zusätzlich der Mittelwert mit angegeben.

Im Vergleich zu den nativen Flexorsehnen (Median 3,06/mm<sup>2</sup>; MW 7,44/mm<sup>2</sup>) ließen sich in der Gruppe der nativen VKB`s (VKBN) höhere Gefäßdichten (Median 10,07/mm<sup>2</sup>, MW 11,86/mm<sup>2</sup>) finden.

In den ersten 12 Monaten waren über das gesamte Präparat kaum Gefäße zu finden (Median 0/mm<sup>2</sup>, MW 17,97/mm<sup>2</sup>), so dass der Gefäßgehalt deutlich unter dem der nativen Kontrollgruppen lag (Median 3,03/mm<sup>2</sup>; MW 7,44/mm<sup>2</sup> und Median 10,07/mm<sup>2</sup>; MW 11,86/mm<sup>2</sup>) (siehe Tab.5) . Bei Betrachtung der einzelnen Präparate war deskriptiv jedoch ein Anstieg der Gefäßdichte im Verlauf von 6-12 Monaten zu verzeichnen, wobei vorhandene Gefäße frei im Transplantat lagen und nicht in Bindegewebsstraßen verliefen. Erst nach einem Jahr zeigte sich ein Einwachsen von Bindegewebsstraßen, die zum Teil stark gefäßhaltig waren. Dies war auch in einem Anstieg die Gefäßdichte von Gruppe 1 zu Gruppe 2 erkennbar (Median 3,42/mm<sup>2</sup>; MW 6,09/mm<sup>2</sup>). Die Gefäßdichte hatte nun ungefähr den Status der nativen Flexorsehnen erreicht (Median 3,06/mm<sup>2</sup>; MW 7,44/mm<sup>2</sup>), lag aber weiterhin stark unter dem Gefäßgehalt der nativen Kreuzbänder (Median 10,07/mm<sup>2</sup>; MW 11,86/mm<sup>2</sup>). Hier waren deutlich gefäßhaltige Bindegewebsstraßen. In Gruppe 3 stieg die Anzahl der Gefäßanschnitte weiter geringfügig an (Median 3,57/mm<sup>2</sup>; MW 8,15/mm<sup>2</sup>). Während die Gefäßdichte der nativen Hamstringsehnen geringfügig überschritten wurde, wurde die Gefäßdichte der nativen VKB's (Median 10,07/mm<sup>2</sup>; MW 11,89/mm<sup>2</sup>) in unserem untersuchten Zeitraum nicht erreicht.

<b>Gefäße/mm<sup>2</sup></b>	<b>Gruppe 1 (6-12 M.)</b>	<b>Gruppe 2 (13-24 M.)</b>	<b>Gruppe 3 ( &gt;24 M.)</b>	<b>Native Hamstring- Sehnen (n=17)</b>	<b>Natives Kreuz- band (n=8)</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	17,97	6,09	8,15	7,44	11,86
<b>Spannweite</b>	181,82	41,87	22,59	67,74	31,49
<b>Median</b>	0,00	3,42	3,57	3,06	10,07
<b>Standardabweichung (SD)</b>	47,26	10,25	8,46	15,89	9,27

**Tab. 5:** Ergebnisse der Gefäßdichte aller Gruppen



**Abb. 13:** Ergebnisse (Median) der Gefäßdichte aller Gruppen. Keine signifikante Unterschiede zwischen Gruppen 1-3 und den Kontrollgruppen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Hauptbefunde dieser Studie

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Ligamentisierungsprozesses von humanen freien autologen Hamstringsehnen bis zu 117 Monate nach Kreuzbandersatz. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde ein typischer Umbauprozess mit stattfindender Repopulation und Revaskularisierung nachgewiesen. Unsere Untersuchungen zeigten ein wie in der Literatur beschriebenes Remodeling der Hamstringsehnen transplantate [11, 14-17, 86, 88, 89, 94, 95, 98-101, 114, 117-124, 132, 133], das jedoch auch bis zu zwei Jahre nach VKB-Ersatz noch nicht abgeschlossen war. Die Transplantate hatten nicht das morphologische Erscheinungsbild des nativen Kreuzbandes.

Dabei zeigte sich in allen Gruppen verglichen mit den nativen Hamstringsehnen ein signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl ( $p=0,036/\text{mm}^2$ ;  $p=0,005/\text{mm}^2$ ;  $p=0,043/\text{mm}^2$ ). Der größte Anstieg wurde im Zeitraum von 12 bis 24 Monaten gefunden ( $850,85/\text{mm}^2$ ). Im weiteren Verlauf fiel die Anzahl der Gesamtzellen langsam wieder ab. Dabei wurde jedoch die Zellzahl der nativen Kreuzband-Kontrollen nicht erreicht. Die Zellkerne erschienen zwar weitestgehend schmal und länglich, aber kleiner bzw. kürzer als die Zellkerne in den nativen Kreuzbandstrukturen.

Ein ähnlicher Verlauf ist auch bei der Auswertung der Myofibroblasten zu sehen. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Myofibroblasten in den ersten zwei Jahren nach Kreuzbandersatz ( $199,58/\text{mm}^2$ ), der im Vergleich zu den nativen Hamstringsehnen signifikant war ( $p=0,014$ ). Im weiteren Verlauf sank die Myofibroblastenzahl wieder ab ( $97,73/\text{mm}^2$ ) ohne den Status der nativen Kreuzband-Kontrollen in den folgenden 7,5 Jahren zu erreichen ( $1,85/\text{mm}^2$ ;  $1,35/\text{mm}^2$ ).

Innerhalb eines Jahres stieg die Gefäßdichte im Vergleich zu den nativen Flexorsehnen an ( $3,42/\text{mm}^2$ ), der Unterschied jedoch war nicht signifikant. Im weiteren Verlauf stieg die Anzahl der Gefäßanschnitte weiterhin wenn auch nur sehr geringfügig an ( $3,57/\text{mm}^2$ ). Während die Gefäßdichte der nativen Hamstringsehnen bereits

überschritten wurde, wurde die Gefäßdicke des nativen VKB ( $10,07/\text{mm}^2$ ) zu keinem Zeitpunkt erreicht.

In der deskriptiven Auswertung der Kollagenstruktur zeigte sich bei beiden nativen Kontrollgruppen eine deutlich geordnete, parallel ausgerichtete Struktur der Fasern, wohingegen in Gruppe 1 (6-12 Monate) vom 6. bis 9. postoperativen Monat eine deutlich ungeordnetere Kollagenausrichtung zu erkennen war. Erst ab dem 10. postoperativen Monat zeigte das Kollagen zunehmend eine grobe Ordnung. Im Verlauf bis zu zwei Jahren zeigte sich noch eine deutlich erhöhte Inhomogenität der Kollagenstruktur mit einem Nebeneinander von teils geordneter, aber auch ungeordneten Faserverläufen. Es lag zunehmend eine longitudinale Ausrichtung vor, die dann im weiteren Verlauf von zwei Jahren aufwärts überwiegend zu sehen war. Dennoch wichen die Proben von den nativen Kreuzband-Präparaten ab. Eine Kollagenseptenbildung war zwar zu erkennen, jedoch nicht so deutlich wie bei den nativen VKB's. Ebenso stellten sich die Zellkerne, die nach zwei Jahren zwar weitestgehend schmal und länglich waren, kleiner bzw. kürzer dar als die Zellkerne der nativen Strukturen. Zudem lagen starke Unterschiede zwischen den einzelnen Proben vor, so dass der Gefäßgehalt vor allem bis zu drei Jahren nach der VKB Rekonstruktion teils deutlich höher als bei den nativen Strukturen lag. Erst ab drei Jahre aufwärts wurde der Gefäßgehalt deutlich niedriger. Ein vollständig nativer Zustand wurde demnach nicht erreicht.

## **4.2 Vergleich zur Studienlage der aktuellen Literatur**

### Remodeling:

Der Remodelingprozess autologer Kreuzbandtransplantate wurde bereits an zahlreichen tierexperimentellen und einigen klinischen Studien untersucht. Derzeit existieren über die Dauer des Remodelingprozesses unterschiedliche Angaben. Besonders die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden aktueller Studien stellen ein Problem dar und erschweren eine Vergleichbarkeit. Es gibt relativ wenig Informationen über den Langzeitverlauf des von Amiel et al. [11] beschriebenen Prozesses der „Ligamentisierung“ im menschlichen VKB nach erfolgreicher Rekonstruktion [14, 99].

Unsere Untersuchungen zeigten ein wie in der Literatur beschriebenes Remodeling der Hamstringsehnentransplantate [11, 14-17, 86, 88, 89, 94, 95, 98-101, 114, 117-124, 132, 133], das jedoch auch bis zu zwei Jahre nach VKB-Ersatz noch nicht abgeschlossen zu sein schien.

Im Gegensatz hierzu konnte in den meisten Tierstudien ein Abschluss des Remodelingprozess nach einem Jahr beobachtet werden [11, 14]. Auch Goradia et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie untersuchten an elf Schafen das biologische Verhalten von autologen Semitendinosussehnentransplantaten nach VKB-Rekonstruktion [15]. In ihrer Studie konnte ein Remodeling-Prozess mit einer zunehmenden Angleichung an das native VKB bereits im Verlauf von 24 Wochen nachgewiesen werden, wobei die Autoren erst nach einem Jahr eine dem VKB vergleichbare Zellzahl und eine weitgehend einheitliche Kollagentertiärstruktur (Crimp) fanden. Demnach folgerten sie, dass die in der Literatur wiederholt geforderte Aufnahme von sportlichen Aktivitäten schon nach zwei bis vier Monaten, das Transplantat für Verletzungen anfällig machen könnte.

Im Gegensatz dazu konnten Amiel et al. in ihrem Kaninchenmodell schon nach vier Wochen eine gleichmäßige Zellverteilung sowie eine dem VKB entsprechende Kernmorphologie zeigen [11]. Nach 30 Wochen wiesen sie bereits eine dem nativen Kreuzband vergleichbare Zellzahl nach [11].

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Scranton et al. mit ihrer Untersuchung des VKB Remodelings am Schafsmodell. Bereits nach sechs Monaten fanden sie hinsichtlich der Vaskularität, Zellularität und Kollagenfaserausrichtung Strukturen vor, die dem nativen vorderen Kreuzband entsprachen [14].

Ein Grund für das offenbar schnellere Remodeling in den meisten Tierstudien könnte an der Spezies als solches sowie an der geringeren Transplantatgröße liegen. Zudem ist bekannt, dass Tiere, besser kleinere Tiere einen anderen bzw. schnelleren Metabolismus aufweisen als der Mensch oder gar größere Tiere. So könnte im Gegensatz zu größeren Tieren (Schafen) die raschere Regeneration beim beobachteten Kaninchenmodell von Amiel et al. durch ihren erhöhten Stoffwechsel erklärt werden. Tiere besitzen außerdem eine andere Gelenkmechanik, sie sind Vierbeiner und sind auch durch die Käfighaltung geringeren Belastungen ausgesetzt als es beispielsweise beim Menschen der Fall ist, wodurch die Vergleichbarkeit zum Menschen ebenfalls minimiert wird. Die teils unterschiedlichen Ergebnisse der Studien

innerhalb des Schafsmodells lassen sich ebenfalls durch differente Transplantatwahl, durch unterschiedliche Verankerungstechniken oder durch differente Untersuchungsmethoden, gerade im Hinblick auf die Immunhistologie, erklären.

Eine weitere mögliche Erklärung für das verstärkt auftretende Remodeling bei Studien am Schafsmodell könnte an der unzureichenden bzw. fehlenden körperlichen Schonung nach Transplantatersatz liegen. Ebenso ein fehlendes dosiertes Rehabilitationsprogramm, welches sich beim Menschen direkt postoperativ anschließt, könnte eine Einflussgröße darstellen. Nicht nur das unterschiedliche postoperative Management stellt eine direkte Vergleichbarkeit in Frage, sondern auch die Tatsache, der grundsätzlichen differenten anatomischen Gegebenheiten zwischen Mensch und Tier. Es bleibt ebenso fraglich, ob eine standardisierte OP-Weise/ OP-Technik mit gleicher Herangehensweise, so wie es beim Menschen der Fall ist, eins-zu-eins auf ein Tiermodell zu übertragen ist und damit vergleichbar ist.

Die meisten humanen Biopsiestudien lieferten Hinweise für eine längere Dauer des Remodelings [17, 18]. Die Problematik bei der Betrachtung humaner Studien liegt an der Verwendung unterschiedlicher Transplantattypen (Tendon vs. Tendon-Bone), an unterschiedlichen Verankerungstechniken sowie an den unterschiedlichen Studiendesigns, wobei all diese Faktoren die Dauer und Geschwindigkeit des Remodelings und damit verbunden die Langzeitergebnisse der VKB-Plastiken beeinflussen können.

In einer klinischen Studie untersuchte Rougraff et al. (1993) 23 Patellarsehnenbiopiate nach VKB-Ersatz in einem Zeitraum von 3 Wochen bis 6,5 Jahren [17]. Er beschrieb darin 4 Stadien der Ligamentisierung, wobei hier im Gegensatz zu den meisten in-vivo Tierstudien, eine ablaufende Nekrose im frühen Bandremodeling nicht gezeigt werden konnte [17]. Im Gegensatz zu den von den meisten Autoren postulierten Remodelingabschluss nach einem Jahr fanden Rougraff et al. erst nach 3 Jahren ein vollständig remodeliertes Kreuzbandtransplantat vor.

Auch Abe et al. (1993) fanden Anzeichen für ein verlängert ablaufendes Remodeling beim Menschen [18]. Er untersuchte mittels Licht- und Elektronenmikroskops 21 Biopsien humaner Patellarsehnen im Zeitraum von 6 Wochen bis 15 Monaten nach vorderem Kreuzbandersatz. Dabei stammten 2 Biopsien von Patienten 6 und 8 Wochen postoperativ, während die restlichen 19 Proben auf 2 Gruppen verteilt wurden: 5-8

Monate (n=7) und 9-15 Monate (n=12) nach VKB Rekonstruktion. Nach einem Jahr fanden sie ein straff gespanntes und funktionsfähiges dickes Band vor, welches aber eine geringere Vaskularisierung und eine geringere synoviale Hülle als das native VKB zeigte. Die Kollagenstruktur war zunehmend longitudinal ausgerichtet und zeigte ähnlich zum nativen VKB ein hochfrequenten Crimp. Spindelförmige Fibroblasten waren zwischen den Fasern angeordnet. Der Zellgehalt in der 9-15 Monatsgruppe (MW 40,7 SD 13,5) sank zwar im Vergleich zur 5-8 Monatsgruppe (MW 51,4 SD 21,2) wieder ab, bleibt aber verglichen mit der Kontrollgruppe über dem Zellgehalt des nativen VKB's.

Diese Ergebnisse beider Studien decken sich mit denen dieser Studie, die darauf schließen lassen, dass der Remodelingprozess nach 1 Jahr nicht abgeschlossen ist.

Sánchez et al. (2010) kamen ebenfalls zu einem ähnlichen Resultat [134]. Er analysierte das Remodelingverhalten von autologen Hamstringsehnen nach Applikation von wachstumsfaktorenreichem Plasma (PRGF) in einem Zeitraum von 6 bis 24 Monaten nach vorderem Kreuzbandersatz. Genau wie in unserer Studie fand er trotz zum Einsatz kommender Wachstumsfaktoren (PRGF) auch nach einem Jahr keinen Abschluss des Remodelings, da auch noch nach 14 bis 18 Monaten post operationem im Vergleich zum nativen VKB Unterschiede in der Kollagenstruktur und Zellform sichtbar waren [134].

Lane et al. (1993) fanden im Gegensatz zu Abe et al., Rougraff et al. und Sánchez et al. ein vollständig remodelliertes Transplantat bereits nach 1 Jahr. Sie untersuchten aber lediglich das Remodeling eines autologen Transplantats über einen Zeitraum von 4 Jahren, so dass diese Studie als Case Report zu werten ist und eine generelle Übertragbarkeit auf humane Kreuzbandtransplantate nicht erlaubt [99].

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen (1998) auch Falconiero et al.. Sie untersuchten Biopsien von 38 humanen Patellarsehnen- und 8 humanen Hamstringsehnen-transplantaten in einem Zeitraum von 3-120 Monaten und stellten im Gegensatz zu Rougraff et al., Abe et al. und Sánchez et al. einen Abschluss der Ligamentisierung nach ein Jahr fest [98]. Jedoch bleibt hier festzuhalten, dass die Untersuchungen im Unterschied zu unseren semiquantitativ ermittelten Ergebnissen, rein deskriptiv waren. Zum Zeitpunkt von einem Jahr waren unsere Transplantate noch nicht vollständig rezellularisiert. Auch die Myofibroblasten waren noch ungleichmäßig über das Transplantat verteilt und das Kollagengewebe zeigte sich noch sehr inhomogen. Im Rahmen unserer Untersuchungen zeigte sich besonders anhand der steigenden Anzahl

an Myofibroblasten eine fortlaufende Remodeling-Dynamik und Reorganisation der Kollagenstruktur, die weit über 2 Jahre hinausging. Außerdem wertete er Patellar- und Hamstringsehnen aus, ohne die Ergebnisse zwischen beiden Transplantattypen zu differenzieren, wodurch sich vorhandene Unterschiede zwischen seiner und der vorliegenden Studie zusätzlich erklären lassen.

### Myofibroblasten:

Im Literaturteil dieser Arbeit wurde die gesonderte Bedeutung der Myofibroblasten als Indikator des Remodelingprozesses dargestellt.

Eine Untersuchung der Myofibroblastenexpression im Rahmen des Bandremodeling wurde bisher an humanen Biopsien von Kreuzbandtransplantaten in der Literatur nicht beschrieben. In der vorliegenden Studie konnte in den ersten 2 Jahren ein signifikanter Anstieg der Myofibroblastenexpression nachgewiesen werden. Dabei wurde jedoch der Status des nativen vorderen Kreuzbandes im Verlauf nicht erreicht.

Im Jahr 2002 beschrieben Weiler et al. erstmals Myofibroblasten während des Transplantatremodelings nach VKB-Ersatz im Schafsmodell. Sie fanden den kürzesten Crimp im eingehheilten Transplantatgewebe mit der größten Myofibroblastendichte [112]. Ähnlich zu unseren Ergebnissen fanden Unterhauser et al. in ihrer Studie am Schafsmodell eine konstant ansteigende Anzahl von MFB zwischen den Standzeiten nach 24 bis 104 Wochen [16]. Nach 104 Wochen schließlich konnten signifikant mehr Myofibroblasten im Vergleich zum nativen VKB gezählt werden. Sie vermuteten, dass der VKB-Ersatz auch nach 2 Jahren postoperativ noch nicht den funktionellen Status des intakten vorderen Kreuzbandes erreicht hat [16].

In einer Nachfolgerstudie am Schafsmodell mit einem ähnlichen Versuchsaufbau, beobachteten Dustmann et al. hingegen 12 Wochen nach VKB Ersatz einen signifikanten Unterschied der Myofibroblastenzahl zwischen Autografts und Allografts, wobei die Anzahl in den autologen Transplantaten ( $170,6 /\text{mm}^2$ ) die der allogenen Transplantate ( $93,9 /\text{mm}^2$ ) übertraf [101]. Im weiteren Verlauf fiel auf, dass bei den autologen Transplantaten und im Gegensatz zu den Beobachtungen von Unterhauser et al. bereits nach 12 Wochen das Maximum der MFB-Expression erreicht war, die dann bis zur 52. Woche stetig abfiel [101]. In unserer Studie zeigte sich hingegen innerhalb der ersten 2 Jahre nach Kreuzbandersatz ein signifikanter Anstieg der Myofibroblasten ( $199,58/\text{mm}^2$ ), was die Annahme eines verlängert ablaufenden

Remodelingprozesses beim Menschen bestätigt. Die Unterschiede zu unseren Ergebnissen sind sicherlich durch die unterschiedlichen Versuchsmodelle (klinische Studie vs. Tiermodell) zu erklären.

### Revaskularisierung

Hinsichtlich der Gefäßdichte konnten in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen über die Zeit (Kruskal-Wallis-Test) gezeigt werden. Es gab zwar einen stetigen Anstieg der Gefäßdichte, jedoch zu keinem Zeitpunkt wurde die dem VKB entsprechende Gefäßdichte erreicht.

Shino et al. und Jackson et al. fanden beispielsweise in ihren tierexperimentellen Studien nur eine begrenzte bzw. gar keine Revaskularisierung bei Kreuzbandplastiken vor [116, 128]. Es bleibt festzuhalten, dass in den bisherigen Studien, die die Revaskularisierung des VKB-Transplantates untersuchten, mit Methoden gearbeitet wurden, die für eine Darstellung der Revaskularisierung auf kapillarer Ebene nicht geeignet waren. Erst mit der Anwendung der immunhistochemischen Faktor-VIII-Färbemethode konnte Unterhauser et al. kleinste Kapillaren im Endstromgebiet klar identifizieren [16] und somit eine korrekte Quantifizierung sicherstellen. Sie fanden in ihrer Studie am Schafsmodell bereits 6 Wochen nach VKB-Ersatz eine maximale Gefäßdichte im subsynovialen Bereich vor, welche nach ca. 12 Wochen post operationem auch in tieferen Bandschichten und zentral zu sehen war. Im weiteren Verlauf nahm die Gefäßanzahl wieder ab, so dass der Gefäßstatus nach ca. 24 Monaten dem des nativen VKB glich [16]. Im Gegensatz zu unserer Studie konnte Unterhauser et al. einen Abschluss der Ligamentisierung hinsichtlich der Gesamtzellzahl und einer Angleichung des Gefäßstatus an das native VKB nach 24 Wochen zeigen [16]. Einen ähnlichen Verlauf wie in der Studie von Unterhauser et al. konnten auch Schmidt et al. in einer nachfolgenden Studie am Schafsmodell verzeichnen, jedoch ohne den Gefäßstatus des nativen VKB nach 52 Wochen erreicht zu haben [100]. Dabei zeigte sich innerhalb der untersuchten 52 Wochen eine typische von peripher nach zentral verlaufende Revaskularisierung, die mit zunehmend homogener Anordnung des Gewebes einherging. In unserer Studie zeigte sich hingegen in den ersten 12 Monaten ein stetiger Anstieg der Gefäßdichte, der jedoch nur im Vergleich zu den nativen Flexorsehnen zu sehen war. Obwohl im weiteren Verlauf die Anzahl der Gefäßanschnitte weiterhin geringfügig anstieg, konnte ebenfalls nicht der

Status des nativen VKB erreicht werden. Die Anzahl der Gefäßanschnitte lag deutlich unter dem des nativen VKBs. Die Unterschiede zu unseren Ergebnissen sind auch hier durch die unterschiedlichen Versuchsmodelle (klinische Studie vs. Tiermodell) zu erklären. Die deutlich geringere Revaskularisierung unserer humanen Kreuzbandtransplantate unterstreicht das geringere Ausmaß des Bandumbaus, welcher beim Tiermodell beobachtet wird. Hier muss jedoch Erwähnung finden, dass die frühestens humanen Biopsien 6 Monate nach Rekonstruktion entnommen wurden, so dass unklar ist, ob zu früheren Zeitpunkten ein entsprechend protrahiertere Revaskularisierung des Transplantates hätte beobachtet werden können. Festzustellen ist, dass 6 Monate nach VKB Ersatz die Gefäßdichte unterhalb des intakten VKB liegt und es in zukünftigen Studien zu klären gilt, ob es insgesamt zu einer auch langfristig nur eingeschränkten Revaskularisierung kommt, oder aber zu frühen Zeitpunkten direkt nach VKB Ersatz doch analoge Veränderungen, wie sie am Tiermodell beobachtet werden können, ablaufen.

Falconiero et al. kam mit seiner Biopsiestudie zu ähnlichen Ergebnisse wie Schmidt et al. und Unterhauser et al.. Demnach war nach ca. 12 Monaten die Gefäßanzahl des Autograft mit der des VKB nahezu angeglichen [98]. Jedoch basieren Falconiero's Gefäßanalysen auf einer rein deskriptiv-qualitativen Auswertung mittels konventioneller Färbemethoden (HE) und Lichtmikroskopie. In unserer Studie sowie auch in den Studien von Schmidt et al. und Unterhauser et al. kam jedoch der immunhistochemischen Faktor VIII zur Anwendung, der schon kleinste Kapillaren darstellt und dadurch eine viel genauere Quantifizierung ermöglicht.

Im Gegensatz zu den hier erwähnten Studien konnten in einigen humanen Biopsiestudien ein deutlich verlängerter Remodelingprozess nachgewiesen werden [17, 125]. Während Johnson et al. in humanen Biopsien eine im Vergleich zum Tiermodell weniger intensiv ablaufende Revaskularisierung beschrieb [125], fanden Rougraff et al. in humanen Biopsien an Patellarsehnen eine Angleichung der Gefäßdichte erst nach 30 Monaten nach VKB-Ersatz [17]. Diese Resultate basieren jedoch auf einer rein deskriptiven Auswertung und sind damit stark untersucherabhängig (nicht sehr objektiv) und schwer mit unseren Ergebnissen vergleichbar.

Es wird deutlich, dass der Remodelingprozess bei Tier und Mensch einen ähnlichen qualitativen Verlauf zu nehmen scheint, jedoch beim Menschen in einem deutlich verzögerten zeitlichen Rahmen abläuft.

### **4.3 Limitierungen dieser Studie**

Die verschiedenen Daten verdeutlichen, dass eine Vergleichbarkeit der Studien aufgrund der methodischen Unterschiede nur begrenzt möglich ist. Alle diese Studien unterliegen verschiedenen Limitierungen. Auch in dieser Studie müssen einige Limitierungen genannt werden.

Eine repräsentative Gewebeprobe aus dem intakten Kreuzbandersatz zu entnehmen, ohne dabei das Transplantat zu schwächen oder gar zu schädigen stellt grundsätzlich ein nicht zu vernachlässigendes Problem dar. Dies mag auch unterschiedlichen Ergebnisse der humanen Studien erklären. Deshalb könnte fälschlicherweise nur oberflächliches synoviales Material entnommen worden sein und damit zu falschen Schlussfolgerungen geführt haben.

Für den Zeitraum vor 6 Monaten nach vorderen Kreuzbandersatz hatten wir keine Biopsien, so dass die Umbauprozesse des frühen Remodelings nicht analysiert werden konnten. Eine weitere Einflussgröße ist die für die Entnahme der Proben abhängige Arthroskopie (Sekund Look Arthroskopie), wobei wir annehmen, dass die Ursache für die Zweit-Arthroskopie den Einheilungsprozess des Transplantates nicht beeinflussen würde. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme waren die Transplantate makroskopisch intakt und klinisch stabil. Ebenso stellte sich die Einteilung der Patienten in 3 gleich große repräsentative Gruppen schwierig dar, zumal es keinen festgelegten postoperativen Entnahmezeitpunkt gab und die Zeitabstände zwischen den einzelnen Patienten innerhalb einer Gruppe stark schwankten. Zusätzlich müssen natürlich individuelle Unterschiede zwischen den Patienten berücksichtigt werden. Dadurch beeinflusst, zeigen unsere Daten eine recht große Standardabweichung. Eine weitere Limitierung ist eine nicht realisierbare Darstellung des Remodelingprozesses der einzelnen Patienten im Verlauf.

Dies alles limitiert die Reproduzierbarkeit und die statistische Auswertbarkeit der Ergebnisse. Außerdem gilt festzuhalten, dass die teils sehr kleinen aus der Peripherie der sogenannten Übergangszone des Transplantats stammenden Proben eine histologische Auswertung begrenzen. Auch die Auswertung des Kollagen-Crimps war aufgrund der kleinen Biopate und der nicht eindeutigen Zuordnung eines Längs- oder Queranschnittes, nicht möglich. Ferner waren vor allem die immunhistochemischen

Färbungen trotz strenger Einhaltung der Färbeprotokolle störanfällig. Gelegentlich blieb aus ungeklärter Ursache eine Farbreaktion aus oder es kam zu überschießenden Hintergrundfärbungen, so dass eine genaue Differenzierung der einzelnen Zellen erschwert war und einige Schnitte verworfen und durch neue ersetzt werden mussten. Diese Versager sind aber bei immunhistochemischen Färbungen durchaus bekannt und führten zu keinerlei Einschränkung bei der Datenauswertung.

Die Verwendung knochenblockfreier Autografts ist eine weitere nicht zu vernachlässigende Einflussgröße, da der Remodelingprozess nicht über eine schnelle, direkte Knochen-Knocheneinheilung, sondern über eine Sehnen-Knochen-Einheilung abläuft. Das Einwachsen einer Sehne in den umgebenden Knochen benötigt einen längeren Zeitraum als das Einwachsen eines Knochenblocks in einem ossären Tunnel. Hierdurch können auch die Umbauprozesse des intraartikulären Transplantatanteils beeinflusst werden, welches die Vergleichbarkeit zu Studien, die die Umbauprozesse an knochenblocktragenden Transplantaten, wie der Patellarsehne, untersucht haben, einschränkt. Dies könnte auch ein Grund für unseren verlängerten Remodelingprozess darstellen.

Grundsätzlich ist bei der Datenauswertung von histologischen Präparaten immer nur ein Näherungswert möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde dem mit einer relativ großen Patientenzahl (zw. 8 bis 17 pro Gruppe) und einer großen Zahl ausgewerteter Gesichtsfelder (zw. 8 bis 10 pro Präparat) entgegengewirkt. Trotzdem fallen bei der Betrachtung der Daten teils große Standardabweichungen auf, die durch die individuellen Unterschiede eines einzelnen Patienten und durch die inhomogene Gewebestruktur im Rahmen des Remodelings zu erklären sind. Zusätzlich wird das klinische Outcome, hinsichtlich des Beugekraftdefizits und Bewegungsfreiheit, aber auch der Ablauf des Remodelings wesentlich durch das postoperative Rehabilitationsregime beeinflusst. Wir begannen bei jedem Patienten bereits am ersten postoperativen Tag mit unserem standardisierten Rehabilitationsprogramm. Selbst auf eine Bandage verzichteten wir.

Da die genannten Einflussgrößen für alle Gruppen/Zeitpunkte und Transplantate in gleicher Weise galten, war ein Vergleich der einzelnen Gruppen und eine Beurteilung im zeitlichen Verlauf möglich.

#### **4.4    *Schlußfolgerung***

In dieser Studie konnte für das Hamstringsehnentransplantat als Ersatz des humanen vorderen Kreuzbandes ebenfalls der bisher bekannte stadienbasierte Remodelingprozess bestätigt werden. Es zeigte sich ein typischer Ablauf mit zunächst stattfindender Repopulation und Revaskularisierung der Transplantate, der jedoch auch 2 Jahre postoperativ noch nicht abgeschlossen zu sein schien. Besonders die von 1 bis 2 Jahren steigende Anzahl an Myofibroblasten deutet auf fortlaufende Umbauprozesse und Reorganisation der Kollagenstruktur hin. Dabei scheinen die aus tierexperimentellen Studien gewonnenen Daten, die meist schon nach 24-52 Wochen einen Abschluss des Remodelings zeigen, von den Vorgängen beim Menschen deutlich abzuweichen. Demnach lassen sich die Resultate aus diversen Tierstudien nicht eins zu eins auf den Menschen übertragen. Aber gerade die genaue Kenntnis über Dauer und Ablauf des Remodelings humaner Kreuzbandtransplantate spielt für die Intensität des postoperativen Rehabilitationsprogramm und für den Zeitpunkt der Freigabe von kreuzbandbelastenden Aktivitäten eine entscheidende Rolle. So raten wir in Anbetracht der Ergebnisse dieser Studie zu Vorsicht bei einer frühzeitigen Vollbelastung im Rahmen von Bewegungsabläufen, die in strecknaher oder tiefer Beugeposition des Kniegelenkes ablaufen, da es bekannter Weise hierbei zu deutlich erhöhten Belastungen des vorderen Kreuzbandes kommt. Denn der hier gezeigte längere Ligamentisierungsprozess bedarf einer vorsichtigen, angepassten Nachbehandlung. Dazu müssen weitere klinische Studien zeigen, ob sich bei einem weniger „aggressiven“ Rehabilitationsprogramm die Dauer des Remodelingprozess verändert oder sogar verkürzt. Des Weiteren bedarf es weiterer Aufklärung bezüglich des frühen humanen Remodelings innerhalb der ersten 6 Monate nach vorderen Kreuzbandersatz, denn gerade die frühe Phase der Bandeinheilung ist entscheidend, um Patienten eine rasche Mobilisierung und Rehabilitierung zu ermöglichen. Interessant wäre auch eine klinische Studie, die im Gegensatz zu unserer Studie den Remodelingprozess humaner autologer Hamstringsehnen unter Anwendung einer anatomischen Verankerungstechnik des VKB-Transplantates untersucht und analysiert, in welchem Maße die Transplantatposition im Kniegelenk einen Einfluss auf die Wiederherstellung der Morphologie des intakten vorderen Kreuzbandes hat.

## 5 Zusammenfassung

**Fragestellung:** Welche qualitativen und quantitativen Veränderungen zeigt das Remodeling von humanen Hamstringsehnen als vorderer Kreuzbandersatz im Langzeitverlauf?

**Methodik:** Biopsate von Hamstringtransplantaten wurden 67 Patienten 5-129 Monate nach vorderer Kreuzbandrekonstruktion entnommen und histologisch aufgearbeitet. Mittels Übersichts- (HE, MG) und immunhistologischer Färbungen wurde eine Quantifizierung von Zellzahl, Gefäßdichte (Faktor VIII) und Myofibroblastenexpression (alpha smooth muscle actin) möglich. Die Auswertung erfolgte in 3 Gruppen (Gruppe 1= 6-12 Mo, Gruppe 2= 13 bis 24 Mo, Gruppe 3= über 24 Mo). Als Kontrollen dienten Proben von humanen Hamstringsehnen. Die Präparate wurden sowohl deskriptiv als auch semiquantitativ mittels eines computergestützten Bildanalyse-Systems ausgewertet.

**Ergebnisse und Schlussfolgerungen:** Verglichen mit den nativen Hamstringsehnen stieg die Gesamtzellzahl in den Gruppen 1-3 an und blieb im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht (Gruppe 1 = 482,0/mm<sup>2</sup> (p=0,036); Gruppe 2 = 850,9/mm<sup>2</sup> (p=0,005); und Gruppe 3 = 595,6/mm<sup>2</sup> (p=0,043). Die Revaskularisierung zeigte einen ähnlichen Verlauf, jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede. Bei den Myofibroblasten zeigte sich insgesamt ein deutlicher Anstieg von Gruppe 1 nach 2 (11,45/mm<sup>2</sup>, 199,58/mm<sup>2</sup>), wobei es nur in Gruppe 2 signifikant mehr Myofibroblasten im Vergleich zur Flexorkontrollgruppe (1,85/mm<sup>2</sup>, p=0,014) gab.

Die deskriptive Auswertung zeigte in den ersten 12 Monaten eine überwiegend ungeordnete Kollagenstruktur, im weiteren Zeitverlauf kam es jedoch zu einer zunehmenden Ordnung und Ausrichtung der Kollagenfasern, ohne die typische Septenbildung der nativen Proben zu zeigen. Die Zellen der ersten 12 Monate waren überwiegend ovoide, im weiteren Verlauf dominierten zunehmend spindelförmige Zellen (bis 24 Monate) mit einer Umwandlung zu überwiegend länglichen Zellen nach 24 Monaten. Es zeigte sich ein typischer Remodelingprozess mit zunächst stattfindender Repopulation und Revaskularisierung der Transplantate, der jedoch auch bis zu 2 Jahre postoperativ noch nicht abgeschlossen zu sein scheint. Besonders die von 1 bis 2 Jahren ansteigende Zahl an Myofibroblasten deutet auf fortlaufende Umbauprozesse und Reorganisation der Kollagenstruktur hin. Die genaue Kenntnis über Dauer und

Ablauf des Remodelings humaner Kreuzbandtransplantate spielt für das postoperative Rehabilitationsprogramm und für den Zeitpunkt der erlaubten Vollbelastung eine große Rolle. Dabei scheinen die aus tierexperimentellen Studien gewonnenen Daten, die meist schon nach 30-52 Wochen einen Abschluss des Remodelings zeigen, von den Vorgängen beim Menschen deutlich abzuweichen.

## 6 Summary

**Purpose:** Histological analysis of the remodelling process of human hamstring tendon (HT) grafts after standardized anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR) with an accelerated rehabilitation protocol.

**Methods:** Sixty-seven patients underwent retrieval of midsubstance biopsies after clinically successful hamstring autograft ACLR. Samples were allocated to one of three groups depending on the time point of retrieval: group 1 (6-12 months; n = 15), group 2 (13-24 months; n = 16) and group 3 (24 months; n = 11). Biopsies from native HT (n = 17) and ACL (n = 8) served as controls. Cellular density, vascular density and myofibroblast density and collagen fibril alignment were analysed by haematoxylin-eosin, Masson-Goldner-Trichrom and immunohistochemical staining protocols.

**Results:** Compared with native HT (330.4/mm<sup>2</sup>), total cell number was increased in groups 1-3 (Group 1 = 482,0/mm<sup>2</sup> (p = 0,036); group 2 = 850,9/mm<sup>2</sup> (p = 0,005); and group 3 = 595,6/mm<sup>2</sup> (p = 0,043). There were no significant differences between the groups for vessel density. Myofibroblast density was higher in group 2 (199.6/mm<sup>2</sup>) compared with native HT (1,9/mm<sup>2</sup>, p = 0,014). Collagen orientation was irregular up to 12 months. Thereafter, collagen orientation became more regular, adapting to, but not fully restoring, the appearance of the intact ACL. For the first 12 months, cells were predominantly ovoid. Ensuing cell morphology changed to spindle shaped in group 2 and predominantly narrow long cells over 24 months.

**Conclusion:** Human hamstring grafts showed typical stages of graft remodelling, which was not complete up to 2 years after ACLR. The remodelling process in humans was prolonged compared with the results obtained in several animal studies.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Steinbruck, K., [*Epidemiology of sports injuries. A 15 year analysis of sports orthopedic ambulatory care*]. Sportverletz Sportschaden, 1987. 1(1): p. 2-12.
2. Miyasaka KC, D.D., Stone ML, *The incidence of knee ligament injuries in the general population*. Am J Knee Surg, 1991: p. 4:3-8.
3. Noyes, F.R., et al., *Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries*. J Bone Joint Surg Am, 1980. 62(5): p. 687-95, 757.
4. Andersson, C., M. Odensten, and J. Gillquist, *Knee function after surgical or nonsurgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament: a randomized study with a long-term follow-up period*. Clin Orthop Relat Res, 1991(264): p. 255-63.
5. Yasuda, K.H., K. , *Remodeling of Tendon Autograft in Ligament Reconstruction, in Biomechanics: Functional Adaptation and Remodeling*. . Springer: Heidelberg, New York., 1997: p. 214-250.
6. Kohn, D., *Arthroscopy in acute injuries of anterior cruciate-deficient knees: fresh and old intraarticular lesions*. Arthroscopy, 1986. 2(2): p. 98-102.
7. O'Donoghue, D., *An analysis of end results of surgical treatment of major injuries to ligaments of the knee*. J Bone Joint Surg Am (A), 1955: p. 37:1-13.
8. Lobenhoffer, P. and H. Tscherne, [*Rupture of the anterior cruciate ligament. Current status of treatment*]. Unfallchirurg, 1993. 96(3): p. 150-68.
9. *The American Orthopaedic Society for Sports Medicine Conference on Allografts in Orthopaedic Sports Medicine*. Keystone (CO), 2005.
10. Weiler, A., S. Scheffler, and J. Hoher, [*Transplant selection for primary replacement of the anterior cruciate ligament*]. Orthopade, 2002. 31(8): p. 731-40.

11. Amiel, D., et al., *The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon*. J Orthop Res, 1986. 4(2): p. 162-72.
12. Lobenhoffer, P. and H. Tscherne, *[Indications for anterior cruciate ligament reconstruction--current surgical techniques, choice of transplant]*. Orthopade, 1993. 22(6): p. 372-80.
13. Brown, C.H., Jr., M.E. Steiner, and E.W. Carson, *The use of hamstring tendons for anterior cruciate ligament reconstruction. Technique and results*. Clin Sports Med, 1993. 12(4): p. 723-56.
14. Scranton, P.E., Jr., et al., *Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization*. Arthroscopy, 1998. 14(7): p. 702-16.
15. Goradia, V.K., et al., *Natural history of a hamstring tendon autograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model*. Am J Sports Med, 2000. 28(1): p. 40-6.
16. Unterhauser, F.N., et al., *Endoligamentous revascularization of an anterior cruciate ligament graft*. Clin Orthop Relat Res, 2003(414): p. 276-88.
17. Rougraff, B., et al., *Arthroscopic and histologic analysis of human patellar tendon autografts used for anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 1993. 21(2): p. 277-84.
18. Abe, S., et al., *Light and electron microscopic study of remodeling and maturation process in autogenous graft for anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy, 1993. 9(4): p. 394-405.
19. Girgis, F.G., J.L. Marshall, and A. Monajem, *The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis*. Clin Orthop Relat Res, 1975(106): p. 216-31.
20. Kennedy, J.C., H.W. Weinberg, and A.S. Wilson, *The anatomy and function of the anterior cruciate ligament. As determined by clinical and morphological studies*. J Bone Joint Surg Am, 1974. 56(2): p. 223-35.

21. Odensten, M. and J. Gillquist, *Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction*. J Bone Joint Surg Am, 1985. 67(2): p. 257-62.
22. Petersen, W. and B. Tillmann, [*Anatomy and function of the anterior cruciate ligament*]. Orthopade, 2002. 31(8): p. 710-8.
23. Arnoczky, S.P., *Anatomy of the anterior cruciate ligament*. Clin Orthop Relat Res, 1983(172): p. 19-25.
24. Pruss, A., et al., *Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue transplants--a reliable sterilization method*. Ann Transplant, 2003. 8(2): p. 34-42.
25. Harner, C.D., et al., *Quantitative analysis of human cruciate ligament insertions*. Arthroscopy, 1999. 15(7): p. 741-9.
26. Samuelson, T.S., D. Drez, Jr., and G.B. Maletis, *Anterior cruciate ligament graft rotation. Reproduction of normal graft rotation*. Am J Sports Med, 1996. 24(1): p. 67-71.
27. Putz, R.P., R, *Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen*. Urban & Schwarzenberg. 1997.
28. Amiel, D., et al., *Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison*. J Orthop Res, 1984. 1(3): p. 257-65.
29. Yasuda, K., et al., *Effects of initial graft tension on clinical outcome after anterior cruciate ligament reconstruction. Autogenous doubled hamstring tendons connected in series with polyester tapes*. Am J Sports Med, 1997. 25(1): p. 99-106.
30. Tackmann, W., *Das Binde und Stützgewebe*. 1994.
31. Daniel, D.M.A., W.H.; J., O.C.J. , *Knee Ligaments - Structure, Function, Injury and Repair*. . 1 ed, New York: Raven Press. 558, 1990.
32. Junqueira, L.C.C., J.; Schiebler, T.H. , *Histologie*. Springer Verlag Berlin, 2002.
33. Arnoczky, S.P., *Blood supply to the anterior cruciate ligament and supporting structures*. Orthop Clin North Am, 1985. 16(1): p. 15-28.

34. Strobel M, S.H.-W., Eichhorn H-J *Diagnostik des Kniegelenkes*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995.
35. Jakob RP, S.H.-U., *Kniegelenk und Kreuzbänder: Anatomie, Biomechanik, Klinik, Rekonstruktion, Komplikationen, Rehabilitation*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990.
36. Amiel, D., et al., *Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization*. Clin Orthop Relat Res, 1983(172): p. 265-70.
37. Sakane, M., et al., *In situ forces in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads*. J Orthop Res, 1997. 15(2): p. 285-93.
38. Nogalski M, B.B., *Acute Anterior Cruciate Ligament Injuries*. In Fu F, Harner C, Vince K eds. Knee Surgery. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1994: p. 679-730.
39. Alm, A. and B. Stromberg, *Vascular anatomy of the patellar and cruciate ligaments. A microangiographic and histologic investigation in the dog*. Acta Chir Scand Suppl, 1974. 445: p. 25-35.
40. Arnoczky, S.P., R.M. Rubin, and J.L. Marshall, *Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs*. J Bone Joint Surg Am, 1979. 61(8): p. 1221-9.
41. Petersen, W. and B. Tillmann, *Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint*. Anat Embryol (Berl), 1999. 200(3): p. 325-34.
42. Simank, H.G., et al., *[Demonstration of the blood supply of human cruciate ligaments using the plastination method]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 1995. 133(1): p. 39-42.
43. Halata, Z. and K.I. Baumann, *Sensory nerve endings in the hard palate and papilla incisiva of the rhesus monkey*. Anat Embryol (Berl), 1999. 199(5): p. 427-37.

44. Haus, J., Z. Halata, and H.J. Refior, [*Proprioception in the anterior cruciate ligament of the human knee joint--morphological bases. A light, scanning and transmission electron microscopy study*]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 1992. 130(6): p. 484-94.
45. Schutte, M.J., et al., *Neural anatomy of the human anterior cruciate ligament*. *J Bone Joint Surg Am*, 1987. 69(2): p. 243-7.
46. Dodds, J.A. and S.P. Arnoczky, *Anatomy of the anterior cruciate ligament: a blueprint for repair and reconstruction*. *Arthroscopy*, 1994. 10(2): p. 132-9.
47. Kohn, D.S., G.; Dienst, M.; Rupp, S. , *Diagnostik der Ruptur des vorderen Kreuzbandes*. *Orthopäde.*, 2002: p. 31: 719-730.
48. Ferretti, A., et al., *Osteoarthritis of the knee after ACL reconstruction*. *Int Orthop*, 1991. 15(4): p. 367-71.
49. Gillquist, J. and K. Messner, *Anterior cruciate ligament reconstruction and the long-term incidence of gonarthrosis*. *Sports Med*, 1999. 27(3): p. 143-56.
50. Jomha, N.M., et al., *Long-term osteoarthritic changes in anterior cruciate ligament reconstructed knees*. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(358): p. 188-93.
51. Kannus, P. and M. Jarvinen, *Conservatively treated tears of the anterior cruciate ligament. Long-term results*. *J Bone Joint Surg Am*, 1987. 69(7): p. 1007-12.
52. Cannon, W.D., Jr. and J.M. Vittori, *The incidence of healing in arthroscopic meniscal repairs in anterior cruciate ligament-reconstructed knees versus stable knees*. *Am J Sports Med*, 1992. 20(2): p. 176-81.
53. Keene GC, B.D., Rae PJ, et al., *The natural history of meniscal tears in anterior cruciate ligament insufficiency*. *Am J Sports Med.* , 1993: p. 21(5):672-9.
54. Warren, R.F., *Meniscectomy and repair in the anterior cruciate ligament-deficient patient*. *Clin Orthop Relat Res*, 1990(252): p. 55-63.
55. Beard, D.J., et al., *Reconstruction does not reduce tibial translation in the cruciate-deficient knee an in vivo study*. *J Bone Joint Surg Br*, 2001. 83(8): p. 1098-103.

56. Sommerlath, K., J. Lysholm, and J. Gillquist, *The long-term course after treatment of acute anterior cruciate ligament ruptures. A 9 to 16 year followup.* Am J Sports Med, 1991. 19(2): p. 156-62.
57. Bonamo, J.J., C. Fay, and T. Firestone, *The conservative treatment of the anterior cruciate deficient knee.* Am J Sports Med, 1990. 18(6): p. 618-23.
58. Casteleyn, P.P., *Management of anterior cruciate ligament lesions: surgical fashion, personal whim or scientific evidence? Study of medium- and long-term results.* Acta Orthop Belg, 1999. 65(3): p. 327-39.
59. Cooper, D.E., et al., *The strength of the central third patellar tendon graft. A biomechanical study.* Am J Sports Med, 1993. 21(6): p. 818-23; discussion 823-4.
60. Drez, D.J., Jr., et al., *Anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone allografts. A biological and biomechanical evaluation in goats.* Am J Sports Med, 1991. 19(3): p. 256-63.
61. Fideler, B.M., et al., *Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts.* Am J Sports Med, 1995. 23(5): p. 643-6.
62. Fu, F.H. and K.R. Schulte, *Anterior cruciate ligament surgery 1996. State of the art?* Clin Orthop Relat Res, 1996(325): p. 19-24.
63. Hefti, F., et al., *Evaluation of knee ligament injuries with the IKDC form.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1993. 1(3-4): p. 226-34.
64. Wilson, T.W., M.P. Zafuta, and M. Zobitz, *A biomechanical analysis of matched bone-patellar tendon-bone and double-looped semitendinosus and gracilis tendon grafts.* Am J Sports Med, 1999. 27(2): p. 202-7.
65. Bach, B.R., Jr., et al., *Single-incision endoscopic anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Minimum two-year follow-up evaluation.* Am J Sports Med, 1998. 26(1): p. 30-40.

66. Bach, B.R., Jr., et al., *Arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Five- to nine-year follow-up evaluation.* Am J Sports Med, 1998. 26(1): p. 20-9.
67. von Essen, H. and N.P. Sudkamp, [*Complex trauma of the knee joint. The diagnosis and therapy of ligament studies*]. Unfallchirurg, 2003. 106(5): p. 398-409; quiz 410-1.
68. Williams RJ 3rd, H.J., Petrigliano F, Rozental T, Wickiewicz TL *Anterior Cruciate Ligament Reconstruction with a Four-Strand Hamstring Tendon Autograft.* . J Bone Joint Surg Am, 2004: p. 86: 225-232.
69. McCarroll, J.R., *Fracture of the patella during a golf swing following reconstruction of the anterior cruciate ligament. A case report.* Am J Sports Med, 1983. 11(1): p. 26-7.
70. Wilk, R.M. and J.C. Richmond, *Dacron ligament reconstruction for chronic anterior cruciate ligament insufficiency.* Am J Sports Med, 1993. 21(3): p. 374-9; discussion 379-80.
71. Tomita, F., et al., *Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction.* Arthroscopy, 2001. 17(5): p. 461-76.
72. Benedetto, K.P., [*The "gold standard" in cruciate ligament replacement*]. Chirurg, 1995. 66(11): p. 1061-70.
73. Ritchie, J.R. and R.D. Parker, *Graft selection in anterior cruciate ligament revision surgery.* Clin Orthop Relat Res, 1996(325): p. 65-77.
74. Cross, M.J., et al., *Regeneration of the semitendinosus and gracilis tendons following their transection for repair of the anterior cruciate ligament.* Am J Sports Med, 1992. 20(2): p. 221-3.
75. Papandrea, P., et al., *Regeneration of the semitendinosus tendon harvested for anterior cruciate ligament reconstruction. Evaluation using ultrasonography.* Am J Sports Med, 2000. 28(4): p. 556-61.

76. Hamner D. L., B.C.H., Jr., Steiner M. E., Hecker A. T., Hayes W. C. , *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, 1999: p. 81: 549-57.
77. Hoher, J., et al., *Mechanical behavior of two hamstring graft constructs for reconstruction of the anterior cruciate ligament*. J Orthop Res, 2000. 18(3): p. 456-61.
78. Woo, S.L., S.S. Chan, and T. Yamaji, *Biomechanics of knee ligament healing, repair and reconstruction*. J Biomech, 1997. 30(5): p. 431-9.
79. Brand, J., Jr., et al., *Graft fixation in cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 2000. 28(5): p. 761-74.
80. Magen, H.E., S.M. Howell, and M.L. Hull, *Structural properties of six tibial fixation methods for anterior cruciate ligament soft tissue grafts*. Am J Sports Med, 1999. 27(1): p. 35-43.
81. Shelton, W.R., et al., *Use of allografts in knee reconstruction: II. Surgical considerations*. J Am Acad Orthop Surg, 1998. 6(3): p. 169-75.
82. Martin DF, P.G., Carl WW, *Anterior cruciate ligament reconstruction. An economic outcome study comparing autografts to allografts*. ISAKOS. Montreux, Switzerland, 2001: p.:5.97.
83. Hoher, J. and T. Tiling, *[Differential transplant selection in cruciate ligament surgery]*. Chirurg, 2000. 71(9): p. 1045-54.
84. Delay, B.S., et al., *Current practices and opinions in ACL reconstruction and rehabilitation: results of a survey of the American Orthopaedic Society for Sports Medicine*. Am J Knee Surg, 2001. 14(2): p. 85-91.
85. Arnoczky, S.P., G.B. Tarvin, and J.L. Marshall, *Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog*. J Bone Joint Surg Am, 1982. 64(2): p. 217-24.
86. Kleiner, J.B., et al., *Early histologic, metabolic, and vascular assessment of anterior cruciate ligament autografts*. J Orthop Res, 1989. 7(2): p. 235-42.

87. Yoshikawa, T., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in patellar tendon grafts in the early phase after anterior cruciate ligament reconstruction*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2006. 14(9): p. 804-10.
88. Bosch, U. and W.J. Kasperczyk, *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*, 1992. 20(5): p. 558-66.
89. Kleiner, J.B., et al., *Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft*. *J Orthop Res*, 1986. 4(4): p. 466-74.
90. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(5): p. 349-63.
91. Serini, G. and G. Gabbiani, *Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation*. *Exp Cell Res*, 1999. 250(2): p. 273-83.
92. Wilhelm, S.M., et al., *Human fibroblast collagenase: glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(11): p. 3756-60.
93. Schurch, W., T.A. Seemayer, and G. Gabbiani, *The myofibroblast: a quarter century after its discovery*. *Am J Surg Pathol*, 1998. 22(2): p. 141-7.
94. Tohyama, H. and K. Yasuda, *Extrinsic cell infiltration and revascularization accelerate mechanical deterioration of the patellar tendon after fibroblast necrosis*. *J Biomech Eng*, 2000. 122(6): p. 594-9.
95. Weiler, A., et al., *Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep*. *Am J Sports Med*, 2001. 29(6): p. 751-61.
96. Petersen, W., et al., *The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep*. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2003. 123(4): p. 168-74.

97. Weiler, A., et al., *The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 2004. 32(4): p. 881-91.
98. Falconiero, R.P., V.J. DiStefano, and T.M. Cook, *Revascularization and ligamentization of autogenous anterior cruciate ligament grafts in humans*. Arthroscopy, 1998. 14(2): p. 197-205.
99. Lane, J.G., et al., *The ligamentization process: a 4 year case study following ACL reconstruction with a semitendinosis graft*. Arthroscopy, 1993. 9(2): p. 149-53.
100. Schmidt, T., *Untersuchung der Revaskularisierung und des Remodellings allogener und autologer freier Sehnentransplantate zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes Eine Histologische Langzeitstudie am Schafmodell*. Dissertation, 2007.
101. Dustmann, M., et al., *The extracellular remodeling of free-soft-tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: a comparison study in a sheep model*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008. 16(4): p. 360-9.
102. Gabbiani, G., G.B. Ryan, and G. Majne, *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction*. Experientia, 1971. 27(5): p. 549-50.
103. Skalli, O., et al., *Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes*. J Histochem Cytochem, 1989. 37(3): p. 315-21.
104. Darnell, J.L., H.; Baltimore, D. , *Molecular Cell Biology*. New York: Scientific American Books, 1990.
105. Masur, S.K., et al., *Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(9): p. 4219-23.
106. Harris, A.K., D. Stopak, and P. Wild, *Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis*. Nature, 1981. 290(5803): p. 249-51.

107. Mochitate, K., P. Pawelek, and F. Grinnell, *Stress relaxation of contracted collagen gels: disruption of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin, and down-regulation of DNA and protein synthesis*. *Exp Cell Res*, 1991. 193(1): p. 198-207.
108. Tomasek, J.J., et al., *Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum*. *Anat Rec*, 1992. 232(3): p. 359-68.
109. Faryniarz, D.A., et al., *Myofibroblasts in the healing lapine medial collateral ligament: possible mechanisms of contraction*. *J Orthop Res*, 1996. 14(2): p. 228-37.
110. Murray, M.M., et al., *Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture*. *J Bone Joint Surg Am*, 2000. 82-A(10): p. 1387-97.
111. Murray, M.M. and M. Spector, *Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells*. *J Orthop Res*, 1999. 17(1): p. 18-27.
112. Weiler, A., et al., *Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling*. *J Orthop Res*, 2002. 20(2): p. 310-7.
113. Weiss, M., F.N. Unterhauser, and A. Weiler, *Crimp frequency is strongly correlated to myofibroblast density in the human anterior cruciate ligament and its autologous tendon grafts*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 20(5): p. 889-95.
114. Clancy, W.G., Jr., et al., *Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys*. *J Bone Joint Surg Am*, 1981. 63(8): p. 1270-84.
115. Arnoczky, S.P., R.F. Warren, and M.A. Ashlock, *Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft. An experimental study*. *J Bone Joint Surg Am*, 1986. 68(3): p. 376-85.
116. Shino, K., et al., *Surface blood flow and histology of human anterior cruciate ligament allografts*. *Arthroscopy*, 1991. 7(2): p. 171-6.

117. Aune, A.K., et al., *Nerve regeneration during patellar tendon autograft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction: an experimental and clinical study.* J Orthop Res, 1996. 14(2): p. 193-9.
118. Zaffagnini, S., et al., *Neoligamentization process of BTPB used for ACL graft: histological evaluation from 6 months to 10 years.* Knee, 2007. 14(2): p. 87-93.
119. Kawamura, S., et al., *Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing.* J Orthop Res, 2005. 23(6): p. 1425-32.
120. Muneta, T., J.L. Lewis, and N.J. Stewart, *Load affects remodeling of transplanted, autogenous bone-patellar tendon-bone segments in a rabbit model.* J Orthop Res, 1994. 12(1): p. 138-43.
121. Papageorgiou, C.D., et al., *A multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model.* Am J Sports Med, 2001. 29(5): p. 620-6.
122. Goradia, V.K., et al., *Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model.* Am J Knee Surg, 2000. 13(3): p. 143-51.
123. Itoh, S., et al., *Electron microscopic evaluation of the effects of stress-shielding on maturation of the mid-substance and ligament-bone junction of the reconstructed anterior cruciate ligament in rabbits.* J Mater Sci Mater Med, 1999. 10(3): p. 185-90.
124. Nebelung, W., et al., *Histological findings of tendon-bone healing following anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring grafts.* Arch Orthop Trauma Surg, 2003. 123(4): p. 158-63.
125. Johnson, L.L., *The outcome of a free autogenous semitendinosus tendon graft in human anterior cruciate reconstructive surgery: a histological study.* Arthroscopy, 1993. 9(2): p. 131-42.
126. Rougraff, B.T. and K.D. Shelbourne, *Early histologic appearance of human patellar tendon autografts used for anterior cruciate ligament reconstruction.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1999. 7(1): p. 9-14.

127. Tohyama, H. and K. Yasuda, *Significance of graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction. Basic background and clinical outcome.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1998. 6 Suppl 1: p. S30-7.
128. Jackson, D.W., et al., *The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats.* J Bone Joint Surg Am, 1991. 73(2): p. 201-13.
129. Kudo, T., et al., *The effect of cyclic loading on the biomechanical characteristics of the femur-graft-tibia complex after anterior cruciate ligament reconstruction using Bone Mulch screw/WasherLoc fixation.* Clin Biomech (Bristol, Avon), 2005. 20(4): p. 414-20.
130. Böck, P.D., H. , *Romeis Mikroskopische Technik.* 1989: p. 252-261.
131. Stein, K.H.F., H. , *Basiswissen Histologie und Zytologie.* Umschau Zeitschriftenverlag, 1998.
132. Weiler, A., et al., *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, 2002. 18(2): p. 124-35.
133. Petersen, W. and H. Laprell, *Insertion of autologous tendon grafts to the bone: a histological and immunohistochemical study of hamstring and patellar tendon grafts.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2000. 8(1): p. 26-31.
134. Sanchez, M., et al., *Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology.* Arthroscopy, 2010. 26(4): p. 470-80.
135. Menetrey, J., et al., *"Biological failure" of the anterior cruciate ligament graft.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008. 16(3): p. 224-31.
136. Goradia, V.K., et al., *Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model.* Am J Knee Surg, 2000. 13(3): p. 143-51.

137. Scheffler, S.U., et al., 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*, 2008. 24(4): p. 448-58.

## **8 Danksagung**

An erster Stelle danke ich meiner kleinen Familie, vor allem meinem Mann Martin Barenthin, der mir immer den notwendigen Halt gegeben hat.

Meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD. Dr. med. Sven Scheffler danke ich für die Überlassung des Themas. Ganz besonders danken möchte ich Frau Dr. vet. Tanja Schmidt für die zahlreichen Hilfestellungen in allen Fragen und die vielen Ratschläge während der Durchführung meiner Arbeit und bei der Erstellung der Dissertationsschrift.

Den Medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Gabi Hardung, Frau Camilla Bergmann und allen voran Frau Gabriella Korus gilt ganz besondere Anerkennung für die Unterstützung und die vielen Ratschläge bei der Laborarbeit. Auch Mario Thiele war in der Bildanalyse und Bildauswertung eine unersetzliche Hilfe. Ferner möchte ich auch allen nicht erwähnten Mitarbeitern des Julius Wolf Instituts für die hilfsbereite und kollegiale Atmosphäre danken.

Schließlich gilt besonders große Dankbarkeit meinen lieben Eltern Maritta und André Fiedler, die mir in der ganzen Zeit uneingeschränkt zur Seite standen und mich in jeglicher Hinsicht unterstützen!

Allen meinen Freunden, die mich in dieser Zeit unterstützt haben, möchte ich ebenfalls danken.

## 9 Anhang

### 9.1 Färbetechniken

#### Hämatoxylin/Eosin-Färbung

1.	Paraffinierte Schnitte in Xylol spülen	2 x 10 min.
2.	Absteigende Alkoholreihe (100% → 96% → 80% → 70%)	je 2 min.
3.	Spülen in Aqua dest.	
4.	Hämatoxylin-Kernfärbung nach Harris <sup>38</sup>	7 min.
5.	Spülen in Aqua dest.	
6.	Spülen in HCL-Alkohol (0,25%)	
7.	Wässern in Leitungswasser	10 min.
8.	Eosinfärbung <sup>39</sup>	
9.	Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe (2 x 96%, 2 x 100%)	
10.	Spülen in Xylol	
11.	Eindeckeln mit Vitroclud <sup>40</sup>	

#### Masson-Goldner Trichromfärbung

1.	Paraffinierte Schnitte in Xylol spülen	2 x 10 min.
2.	Absteigende Alkoholreihe (100% → 96% → 80% → 70%)	je 2 min.
3.	Spülen in Aqua dest.	
4.	Weigerts Eisenhämatoxylinfärbung <sup>41</sup>	2-4 min.
5.	Wässern in Leitungswasser	10 min.
6.	Säurefuchsin-Ponceau-Färbung <sup>42</sup>	5 min.
7.	Spülen in Essigsäure 1%	

<sup>38</sup> Hämatoxylin, Papanicolaous Lösung 1a Harris´, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>39</sup> Eosin Solution Aqueous, Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri, USA

<sup>40</sup> Vitro-Clud®, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

<sup>41</sup> Weigerts Eisenhämatoxylin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

<sup>42</sup> Säurefuchsin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co., Münster, Deutschland

8.	Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange G <sup>43</sup> bis das Bindegewebe vollständig entfärbt ist	15-30 min.
9.	Spülen in Essigsäure 1%	
10.	Kern-Gegenfärbung mit Methylgrün <sup>44</sup>	10 min.
11.	Spülen in Essigsäure 1%	
12.	Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe (2 x 96%, 2 x 100%)	
13.	Spülen in Xylol	
14.	Eindeckeln mit Vitroclud <sup>45</sup>	

### Immunhistochemische Färbung (ASMA)

1.	Paraffinierte Schnitte in Xylol spülen	2 x 10 min.
2.	Absteigende Alkoholreihe (100% → 96% → 80% → 70%)	je 2 min.
3.	Spülen in Aqua dest.	
4.	Spülen mit PBS-Puffer <sup>46</sup> , pH 7,2	5 min.
5.	Inkubation der Schnitte mit Normalserum <sup>47</sup>	20 min.
6.	Inkubation der Schnitte mit Primärantikörper <sup>48</sup> bei 4° C.	über Nacht
7.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	2 x 5 min.
8.	Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper <sup>49</sup>	30 min.
9.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	2 x 5 min.
10.	Inkubation mit ABC-Substrat <sup>50</sup>	50 min.
11.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	2 x 5 min.
12.	Inkubation mit Chromogenpuffer <sup>51</sup>	2 x 5 min.

<sup>43</sup> Orange g Differenzierungslösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>44</sup> Certistain® Methylgrün, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>45</sup> Vitro-Clud®, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

<sup>46</sup> 3L 175 Phosphatpuffer Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

<sup>47</sup> Normal Horse Serum, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>48</sup> Smooth Muscle Actin, Klon 1A4, DAKO A/S, Glostrup, Denmark

<sup>49</sup> Vectastain®, Biotinylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG, Made in Horse, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>50</sup> ABC kit, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>51</sup> Trizma® Base T-1503, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Trizma® Hydrochloride T-3253, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

13.	Entwickeln mit Substrat Vector® Red <sup>52</sup> (gelöst in 100 mM - 200 mM Tris-HCl, pH 8,2 - 8,5) unter Sichtkontrolle	8-20 min.
14.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	
15.	Kern-Gegenfärbung mit Methylgrün <sup>53</sup>	
16.	Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe (2 x 96%, 2 x 100%)	
17.	Spülen in Xylol	
18.	Eindeckeln mit Vitroclud	

### Immunhistochemische Färbung (Faktor 8)

1.	Paraffinierte Schnitte in Xylol spülen	2 x 10min.
2.	Absteigende Alkoholreihe (100% → 96% → 80% → 70%)	je 2 min.
3.	Spülen in Aqua dest.	
4.	Spülen mit PBS-Puffer <sup>54</sup> , pH 7,2 5 min.	5 min.
5.	Inkubation der Schnitte mit Normalserum <sup>55</sup> 20 min.	20 min.
6.	Inkubation der Schnitte mit Primärantikörper <sup>56</sup> bei 4° C.	über Nacht
7.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	2 x 5 min.
8.	Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper <sup>57</sup>	30 min.
9.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	2 x 5 min.
10.	Inkubation mit ABC-Substrat <sup>58</sup> 50 min.	50 min.
11.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	2 x 5 min.
12.	Inkubation mit Chromogenpuffer <sup>59</sup>	2 x 5 min.

---

Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt

<sup>52</sup> Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>53</sup> Certistain® Methylgrün, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>54</sup> 3L 175 Phosphatpuffer Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

<sup>55</sup> Normal Horse Serum, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>56</sup> DakoCytamin Polyclonal Rabbit Anti Human von Willebrand Factor, Denmark

<sup>57</sup> Vectastain®, Biotinylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG, Made in Horse, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>58</sup> ABC kit, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>59</sup> Trizma® Base T-1503, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Trizma® Hydrochloride T-3253, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt

13.	Entwickeln mit AP-Substrat Vector® Red <sup>60</sup> (gelöst in 100 mM - 200 mM Tris-HCl, pH 8,2 - 8,5) unter Sichtkontrolle bis zur klaren Anfärbung der Gefäße.	8-20 min.
14.	Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,2	
15.	Kern-Gegenfärbung mit Methylgrün <sup>61</sup>	
16.	Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe (2 x 96%, 2 x 100%)	
17.	Spülen in Xylol	
18.	Eindeckeln mit Vitroclud	

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

A.....	Arteria
Abb.....	Abbildung
ACL.....	anterior cruciate ligament
ACLR.....	anterior cruciate ligament reconstruction
AM.....	anteromedial
AMB.....	Anteromediales Bündel
ASMA.....	$\alpha$ - smooth muscle actin
BPTB.....	Bone-Patellar Tendon-Bone
CO <sub>2</sub> .....	Kohlendioxid
dest.....	destillatum
EZM.....	Extrazelluläre Matrix
GAG.....	Glykoaminoglykane
HE.....	Hämatoxylin-Eosin
HKB.....	Hinteres Kreuzband
IL.....	Interleukin
Lig.....	Ligamentum
M.....	Musculus
MFB.....	Myofibroblast
MG.....	Masson Goldner

<sup>60</sup> Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>61</sup> Certistain® Methylgrün, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

MW.....	Mittelwert
N.....	Nervus
PCL.....	posterior cruciate ligament
PDGF-BB.....	platelet-derived growth factor-BB
PL.....	posterolateral
PLB.....	posterolaterales Bündel
ROI.....	region of interest
SD.....	standard deviation
STG.....	Semitendinosus- und Gracilissehne
TGF.....	transforming growth factor
TNF.....	Tumornekrose Faktor
VEGF.....	vascular endothelial growth factor
VKB.....	vorderes Kreuzband
VKBN.....	natives vorderes Kreuzband

### 9.3 **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b> menschliche Kniegelenk. Aus [27].....	3
<b>Abb. 2:</b> Arthroskopischer Blick ins menschliche Knie .....	3
<b>Abb. 3:</b> Aufbau des Kollagenfaserbündels. Aus [32].....	5
<b>Abb. 4:</b> Die proximal entspringenden Fasern des VKB ziehen nach anteromedial, die distal entspringenden Fasern nach posterolateral. Dadurch entspannt sich das posterolaterale Bündel bei Flexion. Aus [19].....	6
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des VKB. Aus [16].....	7
<b>Abb. 6:</b> a) undifferenzierte Fibroblast b) Unter mechanischer Belastung differenziert der Fibroblast zum Proto-Myofibroblast c) der differenziert Proto-Myofibroblast. Aus [90].....	15
<b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung einer VKB Plastik mittels Bone Mulch Schraube im Femur und WasherLoc Verankerung in der Tibia.....	26
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbemethode mit biotinyliertem Sekundäantikörper und Avidin-Biotin-Komplex. Aus [66].....	29
<b>Abb. 9:</b> HE Färbung: a) Hamstringsehne: mit longitudinaler Kollagenausrichtung, moderate Zelldichte und geringer Fibroblastenaktivität. b) Gruppe 1: deutlich ungeordnete Kollagenausrichtung, ansteigende Zelldichte, ovoide Zellmorphologie. c) Gruppe 2: weiterhin zunehmende Zell- und Gefäßdichte. d) Gruppe 3: zunehmend geordnete Kollagenstruktur.....	37

<b>Abb. 10:</b> Ergebnisse (Median) des Zellgehaltes aller Gruppen. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit *	39
<b>Abb. 11:</b> Myofibroblasten: Gruppe 1 (a) zeigt im Vergleich zu Gruppe 2 und 3 (b und c) eine moderate Anzahl der ASMA-positiven Zellen. Man beachte die deutliche Gefäßanfärbung in Gruppe 2 und 3.	41
<b>Abb. 12:</b> Ergebnisse (Median) der Myofibroblastendichte aller Gruppen. Die Anzahl der Myofibroblasten in Gruppe 2 (13-24 Monate) war im Vergleich zu den nativen Hamstringsehnen signifikant höher ( $p= 0,014$ ). Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit *	42
<b>Abb. 13:</b> Ergebnisse (Median) der Gefäßdichte aller Gruppen. Keine signifikante Unterschiede zwischen Gruppen 1-3 und den Kontrollgruppen.	44

#### **9.4 Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b> Demographie (Alter, Geschlecht) aller Gruppen, KT 1000 Resultate (133N Unterschiede zwischen verletztem und nicht verletztem Bein)	21
<b>Tab. 2:</b> Zeitintervall zwischen Probenentnahme und VKB Rekonstruktion, sportliche Aktivitätslevel und der Grund für die Sekond Look Arthroskopie für die Gruppen 1-3	23
<b>Tab. 3:</b> Ergebnisse des Zellgehaltes aller Gruppen	38
<b>Tab. 4:</b> Ergebnisse der Myofibroblastendichte aller Gruppen	41
<b>Tab. 5:</b> Ergebnisse der Gefässdichte aller Gruppen	43

## **9.5 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **9.6 Eidesstattliche Versicherung**

"Ich, Anja Barenthin versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchung des Langzeitmodellings humaner autologer freier Sehnentransplantate nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen dem URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt und bewusst."

Berlin, den

.....

Unterschrift Doktorandin