

Aus dem
Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem Julius Wolff Institut
Charité Universitätsmedizin Berlin
und dem Orthopädischen Zentrum für Muskuloskeletale Forschung
der Universität Würzburg

**Histologische Untersuchung eines aus Rattenkollagen gefertigten Implantates zur
Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes beim Minipig**

Inaugural-DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Monique Uhlig, geb. Seule

Tierärztin aus Bad Saarow

Berlin 2013

Journal-Nr. 3650

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Gruber
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. G. N. Duda
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
miniature pigs; histology; implantation; ligaments; collagen; connective tissue;
animal models; anterior cruciate ligament (MeSH)*

Tag der Promotion: 16.06.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-515-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

FÜR MEINE FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
2 STAND DES WISSENS.....	3
2.1 Historischer Überblick.....	3
2.2 Anatomie und Physiologie des vorderen Kreuzbandes des Menschen	5
2.3 Histologischer Aufbau des VKB beim Menschen.....	8
<u>2.3.1 Bandansatz</u>	11
2.4 Das <i>Remodeling</i>	11
2.5 Die Revaskularisierung	13
2.6 Die Knochenheilung	14
2.6.1 Relevante Zellen der Knochenheilung	15
2.6.2 Ossifikation	17
2.6.3 Knochenheilung.....	18
2.7 Derzeitiger Stand der Kreuzbandrekonstruktion	19
2.8 Vergleichende Anatomie beim Minipig.....	25
2.9 Vergleichende Anatomie beim Hund	26
2.10 Derzeitiger Stand der Kreuzbandrekonstruktion in der Veterinärmedizin.....	26
2.11 Strategie des Dissertationsprojektes	34
3 MATERIAL UND METHODEN	35
3.1 Studiendesign.....	35
3.1.1 Tierauswahl.....	35
3.1.2 Implantat	36
3.2 Operatives Vorgehen	38
3.2.1 Operationsvorbereitungen	38
3.2.2 Operationsmethode	39
3.3 Probengewinnung.....	41
3.4 Anfertigung der histologischen Präparate	41
3.4.1 Fixierung der Proben	41
3.4.2 Sägen der Knochenscheiben	42
3.4.3 Paraffinschnitte	43
3.4.4 Kunststoffschnitte	44
3.4.5 Färben der Schnittpräparate.....	46
3.5 Grundlagen der Immunhistochemie.....	46
3.5.1 Die FVIIIrA Färbung	47
3.5.2 Kollagen I Färbung.....	50
3.6 Deskriptive histologische Auswertung	53
3.6.1 Durchlichtmikroskopie.....	53

3.7 Quantifizierung der Gefäße	53
3.8 Score	54
3.9 Statistische Auswertung	55
4 ERGEBNISSE	57
4.1 Histologische Ergebnisse	57
4.1.1 Ergebnisse der Sechswochengruppe	57
4.1.2 Ergebnisse der Sechsmonatsgruppe	67
4.2 Quantifizierung der Gefäße mit der FVIIIrA Färbung	77
4.2.1 Sechswochengruppe	77
4.2.2 Sechsmonatsgruppe	77
4.2.3 Kontralaterale native Kreuzbänder	78
4.3 Kontrollpräparate	83
4.4 Nachweis von Kollagen I	88
4.4.1 Nachweis von Kollagen I vom Schwein mit spezifischen polyklonalen Antikörpern	88
4.4.2 Nachweis von Kollagen I von der Ratte mit spezifischen polyklonalen Antikörpern	88
5 DISKUSSION	97
5.1 Das Tiermodell	97
5.1.1 Das Implantat	99
5.1.2 Die Implantatverankerung	100
5.2 Histologie	102
5.2.1 Die Übersichtsfärbungen	102
5.2.2 Die Gefäßdarstellung	103
5.2.3 Das <i>Bandremodeling</i>	104
5.3 Ergebnisse	105
5.4 Relevanz der Ergebnisse für den klinischen Alltag in der Humanmedizin	123
5.5 Relevanz für die Tiermedizin	125
5.6 Zusammenfassung der Diskussion	127
6 ZUSAMMENFASSUNG	129
7 SUMMARY	131
8 LITERATURVERZEICHNIS	133
9 ANHANG	147
9.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	147
9.2 Verzeichnis der verwendeten Entwässerungs- und Färbeprotokolle	150
9.3 Danksagung	155
9.4 Erklärung an Eides statt	156

1 EINLEITUNG

Das vordere Kreuzband (VKB) des Menschen ist eines der am meisten studierten anatomischen Strukturen. Es bildet einen wichtigen Teil der Verbindung zwischen Femur und Tibia und ist maßgeblich für die Stabilität des Kniegelenkes verantwortlich.

Kreuzbandrupturen schränken die Stabilität des Kniegelenkes erheblich ein und können sekundär zu degenerativen Schäden führen. Hierzu zählen Meniskus- oder Knorpelschäden sowie Arthrosen des Kniegelenkes. Sekundäre Meniskektomien werden zwischen dem fünften und zehnten Jahr nach Verlust des vorderen Kreuzbandes in 20 - 80 % der Fälle angegeben (LOBENHOFFER u. AGNESKIRCHNER 2005).

Durch zunehmenden Freizeitsport kommt es in der Humanmedizin weiterhin zu einer steigenden Inzidenz von Rupturen des vorderen Kreuzbandes (PETERSEN u. TILLMANN 2002). In Deutschland erleiden etwa 100.000 Personen im Laufe eines Jahres eine Ruptur des vorderen Kreuzbandes (MAJEWSKI et al. 2006).

Schon die Assyrer kannten diese Bandstruktur. Um 1900 wurden die ersten primitiven Bandnähte nach Rupturen des vorderen Kreuzbandes durchgeführt (PÄSSLER 2010). Seitdem wurden immer neue Methoden zur Versorgung entwickelt. Unter anderem versuchte man Rupturen durch Ruhighaltung oder einen synthetischen Bandersatz zu versorgen.

Der derzeitige „Goldene Standard“ bei der Rekonstruktion des VKB des Menschen sind drei freie autologe Transplantate aus der Patellarsehne, der Quadrizepssehne oder den Sehnen des Musculus (M.) gracilis und M. semitendinosus, *Hamstrings* genannt. Patellar-sehnentransplantate werden mit tibialen und femuralen Knochenblöcken entnommen, was zu einer sicheren Einheilung führt (MÜLLER et al. 2007). Weiterhin besitzen sie eine hohe Primärfestigkeit (MÜLLER et al. 2007). *Hamstrings* sind Transplantate aus den Sehnen des M. semitendinosus oder eine Kombination dieser mit Sehnen des M. gracilis. Quadrizepssehnen werden aus den Sehnen des M. quadrizeps mit oder ohne Knochenblock gewonnen.

Mit diesen Transplantaten können insgesamt gute Ergebnisse erzielt werden (MÜLLER et al. 2007; YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009; LÜTZNER u. BOTTESI 2009; JÄGER 2005).

Der Nachteil bei dieser Art der Transplantate ist jedoch eine hohe Entnahmemorbidität durch die Transplantatgewinnung. Mögliche Risiken sind generell die verlängerte Narkosedauer und damit ein erhöhtes Infektionsrisiko. Bei Knochenblockentnahmen kann es u. a. zu Frakturen des Knochenblocks kommen, zu retropatellarem Knieschmerz und langfristigen Beschwerden bei knienden Tätigkeiten (MÜLLER et al. 2007; LÜTZNER u. BOTTESI 2009). Bei *Hamstrings* sind es ein Kraftverlust der verwendeten Muskulatur, eine eingeschränkte Innenrotationsfähigkeit des Kniegelenkes und der Verlust eines aktiven medialen Stabilisators des Kniegelenkes, die nach diesen Eingriffen zu Problemen führen können (MÜLLER et al. 2007; LÜTZNER u. BOTTESI 2009). Trotz guter Langzeitergebnisse ist die hohe Entnahmemorbidität ein ernsthaftes Problem.

In der vorliegenden Studie wird nun ein ganz anderer Ansatz verfolgt. Tierisches, artfremdes Kollagen wurde isoliert und aus dem gewonnenen Kollagen ein Bandersatz gefertigt. In einem Tiermodell mit Minipigs wurde es zur Rekonstruktion des VKB an jeweils einer Hintergliedmaße verwendet. Die Rekonstruktion erfolgte in der Einbündeltechnik.

Es wurden sowohl biomechanische als auch histologische Untersuchungen vorgenommen. Bei den biomechanischen Testungen ging es vor allem um die Reißfestigkeit der Implantate sowohl vor der Rekonstruktion als auch nach der Rekonstruktion im Vergleich zum nativen VKB der kontralateralen Gliedmaße.

Histologisch und immunhistologisch wurden Revaskularisierung, Zellbesiedelung und die Morphologie, insbesondere in Hinblick auf den Bandansatz nach sechs Wochen und sechs Monaten, im Vergleich zum nativen VKB beurteilt.

Ein solches Implantat und dementsprechend auch histologische Untersuchungen zur Einheilung eines solchen Implantates gibt es unseres Wissens nach bisher noch nicht.

2 STAND DES WISSENS

2.1 Historischer Überblick

Das vordere Kreuzband (VKB) des Menschen ist eines der am intensivsten untersuchten Gewebe.

Die historisch frühesten schriftlichen Überlieferungen über die Anatomie stammen von den Assyrern und sind belegt in dem Smith-Papyrus von 3000 v. Chr. (PÄSSLER 2010). 460 - 370 v. Chr. beschrieb Hippokrates die Subluxation des Kniegelenkes und erwähnte Ligamentverletzungen. Claudius Galen von Pergamon (129 - 199 v. Chr.) gab den Ligamenten im Kniegelenk den Namen „ligamenta genu cruciate“ (ZANTOP et al. 2006). Als erste Deutsche beschrieben die Gebrüder Weber 1836 eine abnormale Translation der Tibia nach Transsektion des VKB (PÄSSLER 2010).

Die ersten Kadaverstudien zu den Mechanismen der ligamentären Knieverletzungen nahm der Franzose Amadé Bonnet vor und veröffentlichte diese 1845. Er beschrieb die ersten Symptome im Zusammenhang mit dem vorderen Kreuzbandriss, wie z. B. den Hämarthros und das Subluxationsphänomen. Weiterhin merkte er an, dass „Rupturen der Ligamente viel häufiger sind als angenommen“. Die deutsche Ausgabe dazu folgte 1851 unter dem Namen: „Zur Behandlung von Gelenkerkrankungen“ (PÄSSLER 2010).

Stark beschrieb 1850 zwei Fälle einer vorderen Kreuzbandruptur, die er mit einem Gips behandelt hatte. Er kam zu einem guten Ergebnis (STARK 1850).

Battle veröffentlichte 1900 den ersten Bericht über eine Naht des vorderen Kreuzbandes (PÄSSLER 2010). Tatsächlich durchgeführt wurde die erste Naht allerdings schon 1895 von Mayo Robson, der bei einem Bergarbeiter vorderes und hinteres Kreuzband mit einer Naht versorgt hatte. Bei einer Nachuntersuchung acht Jahre später war das Knie noch stabil (PÄSSLER 2010).

1916 kam Jones zu dem Schluss, dass das Nähen der Bänder völlig unnütz sei und eine natürliche narbige Ausheilung des Gewebes die einzige verlässliche Methode zur Reparatur sei (JONES 1916).

Ivar Palmer veröffentlichte 1938 in seiner Habilitationsschrift „Über die Ligamentverletzungen des Kniegelenks“ Studien zur Anatomie, Biomechanik, Pathologie und zu Behandlungskonzepten. Weiterhin fasste er die Standardbehandlungen der damaligen Zeit zusammen (PÄSSLER 2010). Er entwickelte ein von ihm Bohrdrahtjustor genanntes Zielgerät für den Femur und betonte, dass eine anatomische Rekonstruktion für ein gutes funktionelles Ergebnis entscheidend sei (PÄSSLER 2010).

Die ersten experimentellen Versuche eines Bandersatzes mit der Fascia lata wurden 1913 an Hunden durchgeführt. Der russische Arzt Grekow rekonstruierte die ersten rupturierten menschlichen Kreuzbänder aus der Fascia lata, indem er Letztere durch einen femoralen Bohrtunnel zog (PÄSSLER 2010). Semitendinosus- und Grazilissehnen als Ersatz des hinteren Kreuzbandes wurden erstmals 1919 von Hey-Groves beschrieben (HEY-GROVES 1920). Die vordere Kreuzbandrekonstruktion mittels Semitendinosussehne wurde 1934 vom italienischen Chirurg Galeazzi beschrieben (PÄSSLER 2010).

Die dynamische Stabilisierung führte 1948 Helfet ein. Über eine mediale Transpositionierung der Tuberositas tibiae versuchte er die Außenrotation im Knie zu erhöhen (PÄSSLER 2010). Eine ausschließliche Verwendung der Grazilissehne zur Rekonstruktion wurde von McMaster et al. 1974 beschrieben (MCMASTER et al. 1974). 1935 publizierte Wittek die erfolgreiche Anwendung von Patellarsehnentransplantaten in 16 Fällen (WITTEK 1935). Diese Technik wurde von Jones weiterentwickelt und 1963 veröffentlicht. 1966 beschrieb der deutsche Chirurg H. Brückner eine „neue Technik zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes“, diese Technik wird bis heute „Brückner-Plastik“ genannt (PÄSSLER 2010).

1984 verwendete Blauth freie Quadrizepssehnen mit Patellarknochenanteil als Transplantat (BLAUTH 1984). Stäubli et al. (1996) schrieben dieser Transplantatart nach biomechanischen Testungen exzellente Eigenschaften zu (STÄUBLI et al. 1996). Extraartikuläre Rekonstruktionen wurden erstmals 1918 von H. Matti beschrieben (PÄSSLER 2010). Er verwendete hierfür einen frei transplantierten Fascia lata Streifen. Lemaire bettete 1967 in diesen Fascia lata Streifen ein Nylonband ein (PÄSSLER 2010).

1980 wurden dann die ersten arthroskopisch assistierten VKB Rekonstruktionen von den Engländern Dave und Dandy durchgeführt (PÄSSLER 2010).

Auch die Fixierungstechniken änderten sich im Laufe der Zeit. Bis 1970 war die Fixierung durch Nähen an das Femurperiost der Standard (PÄSSLER 2010). Brückner befestigte dann Patellarsehnentransplantate mit konischen Knochenblöcken im *press-fit* Verfahren (PÄSSLER 2010). Jones fräste femurale Tunnel in der *inside-out* Technik und befestigte dort Knochenblöcke (PÄSSLER 2010). Peter Hertel fixierte in den 80er Jahren Patellar-sehnen *press-fit* und positionierte einen femoralen Knochenblock so, dass anteromediales und posterolaterales Bündel resultierten (PÄSSLER 2010). Boszolla wandte diese Technik erstmals rein arthroskopisch an (PÄSSLER 2010). Pässler entwickelte eine erste implantatfreie Technik für den Einsatz der Hamstrings (PÄSSLER 2010). Diese Technik wurde später von Boszolla zu einer Zweibündeltechnik modifiziert (PÄSSLER 2010).

2.2 Anatomie und Physiologie des vorderen Kreuzbandes des Menschen

Die Beweglichkeit des Kniegelenkes ist an die anatomische Form der Femurkondylen und des Tibiaplateaus gebunden. Die wichtigsten Führungselemente des Kniegelenkes, die Kreuzbänder, werden durch die medialen, lateralen sowie posterolateralen Kniebandstrukturen unterstützt (YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009). Die Funktion des Kniegelenkes kann anhand des Modells der überschlagenden Viergelenkkette dargestellt werden. Die wichtigste Funktion dabei haben die Kreuzbänder, die als „Gelenkstangen“ an beiden Enden frei beweglich aufgehängt sind und durch ihre vorgegebene Verankerung und Länge die Verlagerung des Tibiakopfes beeinflussen (BICER et al. 2010).

Die Hauptfunktion des VKB besteht in der Stabilisierung des Kniegelenkes. Diese Stabilisierung erfolgt durch die Begrenzung der anterioren tibialen Translation und der tibialen Rotation nach innen (BICER et al. 2010).

Die anterior tibiale Translation kann das VKB bei einem Beugewinkel von 20° - 30° im Kniegelenk am wirksamsten verhindern (PETERSEN u. TILLMANN 2002). Nach Ruptur

des VKB lässt sich die Tibia ca. 20 - 30 mm nach vorn ziehen. Os femoris und Tibia sind dann gegeneinander verschiebbar und bewirken das so genannte „Schubladenphänomen“. Weiterhin von Bedeutung ist die Rotationssicherung. Hier wirken die Kreuzbänder als sekundäre Stabilisatoren, da sie sich bei Innenrotation umeinander wickeln und damit eine Rotation der Tibia nach innen begrenzen (GROOD et al. 1981). Zusätzlich wird das Ausmaß der Varus-Valgus-Stabilisierung des gebeugten Kniegelenkes durch die Interaktion des kranialen und kaudalen Kreuzbandes bei der Flexion begrenzt (SCHULZ 2009).

Petersen und Tillmann (2002) erklärten, dass die VKB mit 15 % an der Sicherung gegen varische Kräfte und mit 22 % an der Sicherung gegen valgische Kräfte beteiligt sind. Sie erklärten weiterhin, dass das VKB durch die hohe Anzahl an Mechanorezeptoren eine wichtige Funktion bei der Propriozeption des Kniegelenkes erfüllt. Außerdem wiesen Petersen und Tillmann (2002) eine große Anzahl Vater-Pacini-Körperchen, Ruffini-Körperchen und freie Nervenendigungen, insbesondere an den Insertionsstellen zum Os femoris und der Tibia sowie im subsynovialen Bindegewebe nach. Daraus schlossen sie, dass die Propriozeptoren im VKB als Sensoren für die Gelenkstellung dienen und auf diese Weise den Tonus und die Aktivität der stabilisierenden Muskeln steuern (PETERSEN u. TILLMANN 2002).

Das VKB des Menschen ist ein intraartikulär, aber extrasynovial liegendes Band, umgeben von einer synovialen Schicht (BICER et al. 2010). Es verbindet intraartikulär Os femoris und Tibia miteinander. Das VKB entspringt an der Innenfläche des Condylus ossis femoris lateralis, zieht schräg durch die Fossa intercondylaris und inseriert im mittleren Anteil der Area intercondylaris der Tibia (PETERSEN u. TILLMANN 2002).

Es wird davon ausgegangen, dass es sich aus einem anteromedialen Bündel und einem posterolateralen Bündel zusammensetzt (BICER et al. 2010; HARA et al. 2009). Die anteromedialen Fasern entspringen im kranialen Abschnitt der femoralen Insertion, sie sollen über einen größeren Bewegungsbereich angespannt sein als die posterolateralen Fasern und werden deshalb als Führungsbündel bezeichnet (PETERSEN u. TILLMANN 2002). Yastrebov und Lobenhoffer (2009) gaben eine freie Länge für das anteromediale

und das posterolaterale Bündel von etwa 32 mm - 38 mm an. In seinem Verlauf durch das Kniegelenk kreuzt das VKB das hintere Kreuzband (HKB), welches seinen Ursprung an der Innenseite des Condylus ossis femoris medialis hat und in die Area intercondylaris posterior der Tibia inseriert (ARNOCZKY 1983; DODDS u. ARNOCZKY 1994). Das VKB ist in sich torquiert. Bei einer 90°-Beugung des Kniegelenkes beträgt diese Drehung ca. 90° (ARNOCZKY 1983). Der femorale Ursprung des VKB ist oval, beginnt im Bereich der Linea intercondylaris und dehnt sich entlang der Knorpel-Knochen-Grenze des lateralen Femurkondylus nach kaudal aus. Die tibiale Insertion ist längsoval und 120 % größer als das femorale Insertionsgebiet (BICER et al. 2009; PETERSEN u. TILLMANN 2002). Das Ansatzareal dorsokraniel an der medialen Seite des lateralen Femurkondylus beträgt laut Yastrebov und Lobenhoffer (2009) etwa 16 x 24 mm. Tibial befindet sich der Ansatz des VKB in der Zone zwischen Eminentia medialis und lateralis im ventralen Bereich mit einer Ausdehnung von etwa 11 x 17 mm (YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009).

Müller et al. (2007) gaben Kräfte, die auf das VKB wirken, in Streckstellung bei passiven Bewegungen bis 120 N an. Durch Anspannung der Oberschenkelmuskulatur erreichten die Kräfte Werte bis zu 450 - 500 N. Yastrebov und Lobenhoffer (2009) gaben für das VKB eine Reißfestigkeit bis 2400 N an. In biomechanischen Testungen konnten Woo et al. (1991) allerdings nachweisen, dass diese Reißfestigkeit mit zunehmendem Alter abnimmt.

Die Innervation des VKB erfolgt über Äste des Nervus (N.) articularis posterior. Sie infiltrieren die Kapsel von posterior und verlaufen seitlich der periligamentösen Gefäße (ARNOCZKY 1983). Kennedy et al. (1974) identifizierten paravaskuläre neurale Fasern, die primär in die vasomotorische Kontrolle involviert sind. Ihre entfernten Endigungen verlaufen nicht zusammen mit Gefäßen und sind primär in die Übertragung langsamer Schmerzimpulse an das VKB involviert (KENNEDY et al. 1974). Das VKB selbst enthält Vater-Pacini-Körperchen als schnell adaptierende Mechanorezeptoren, Ruffini-Körperchen als langsam adaptierende Mechanorezeptoren und freie Nervenendigungen als Nozizeptoren und vasomotorische Kontrolle (BICER et al. 2010). Dadurch übernimmt das VKB eine sehr wichtige Rolle bei der Propriozeption (PETERSEN u. TILLMANN 2002).

Die Blutversorgung des VKB erfolgt durch einen Mikroplexus aus der Arteria genicularis medialis, einem Ast der Arteria poplitea und einem Mikroplexus aus der Arteria genicularis descendens, die aus der Arteria femoralis entspringt. In longitudinaler Richtung, parallel zu den Kollagenfaserbündeln, ziehen Kapillaren durch das gesamte VKB (ARNOCZKY 1983). Aus der das VKB umgebenden synovialen Schicht ziehen Blutgefäße horizontal in das Band und anastomisieren mit den longitudinal verlaufenden Gefäßen im Band (ARNOCZKY 1983).

Im VKB selbst liegen die Gefäße im lockeren Bindegewebe zwischen den longitudinalen Faserbündeln (PETERSEN u. HANSEN 1997). Petersen und Tillmann (1999) kamen zu dem Schluss, dass die Versorgung des VKB nicht homogen ist, sondern der proximale Teil stärker mit Blut versorgt wird. Scapinelli (1997) beschrieb, dass die fibrocartilaginäre Region im anteromedialen Anteil des Bandes avaskulär ist. Ebenso haben die fibrocartilaginären Regionen der Bandansätze keine Blutgefäße, die intraligamentären Gefäße durchkreuzen nicht die cartilaginäre Zone und es gibt keine vaskuläre Penetration aus dem subchondralen Knochen (SCAPINELLI 1997). Zu diesem Schluss kamen auch Petersen und Hansen (1997) und Petersen und Tillmann (2002). Im Bereich der Faserknorpelbildungen im Zentrum des VKB und an den chondral apophysären Insertionszonen finden sich avaskuläre Zonen (DODDS u. ARNOCZKY 1994).

2.3 Histologischer Aufbau des VKB beim Menschen

Das VKB besteht zum größten Teil aus parallel angeordneten Kollagenfasern. Diese werden netzartig von wenigen elastischen Fasern umhüllt. Zwischen benachbarten Faserbündeln liegen langgestreckte, heterochromatinreiche Tendinozyten. Sie passen sich den räumlichen Verhältnissen an. Vorwiegend besteht das straffe Bindegewebe aus kollagenen und elastischen Fasern und nur wenigen zellulären Elementen und ungeformter Grundsubstanz. Funktionsabhängig liegen die Faserbündel eng aneinander und sind in ihrer Verlaufsrichtung nach Zug und Druck orientiert (LIEBIG 1999).

Die Kollagenfibrillen werden von lockerem Bindegewebe in kleine Bündel unterteilt (CLARK u. SIDLES 1990). Die innerste Hüllschicht bilden Tendinozyten, sie werden als Endotenonium bezeichnet. Mehrere Kollagenfaserbündel werden von einem Peritenonium umfasst und die gesamte Sehne wird durch das Epitenonium umhüllt (LIEBIG 1999).

Die Extrazellulärmatrix des VKB besteht hauptsächlich aus Typ I Kollagen (PETERSEN u. TILLMANN 1999). Innerhalb des lockeren Bindegewebes, das die Typ I Kollagen positiven Kollagenfibrillenbündel umgibt, kommt außerdem Typ III Kollagen vor. Die hohe Zugfestigkeit des VKB wird durch das Vorkommen von Typ I Kollagen gewährleistet. Eine unterschiedliche Rekrutierung der Faserbündel in verschiedenen Stellungen des Gelenkes wird durch die viskoelastischen Eigenschaften des Typ III Kollagens ermöglicht (PETERSEN u. TILLMANN 2002).

Die Interzellulärsubstanz (Substantia intercellularis) besteht aus geformter (faseriger) Grundsubstanz und ungeformter (amorpher) Grundsubstanz. Beide Substanzen sind Sekretionsprodukte von Bindegewebszellen. Der wichtigste Vertreter der Bindegewebszellen sind die Fibroblasten. Sie synthetisieren Kollagenfasern, retikuläre Fasern und elastische Fasern. Weiterhin synthetisieren sie polyanionische Proteoglykane und Strukturglykoproteine für die ungeformte Grundsubstanz (LIEBIG 1999).

Kollagenfasern (Fibra collagenosa) sind die häufigste Faserart des Bindegewebes. Je nach Lokalisation sind sie im lockeren Bindegewebe leicht gewellt angeordnet, in straffen Geweben scherengitterartig verwoben und in Bändern vorherrschend parallel angeordnet. Die Syntheseleistung von Fibroblasten wird Fibrogenese genannt. Sie wird in eine intra- und eine extrazelluläre Phase unterteilt. Während der intrazellulären Phase entsteht Prokollagen, es ist eine Polypeptidvorstufe des Kollagens. Es werden alpha1- und alpha2-Ketten von mehr als 1000 Aminosäureketten synthetisiert. Sie enthalten vor allem Alanin, Glyzin und Prolin. Prolin und Lysinreste werden hydroxyliert. Anschließend werden jeweils drei dieser Ketten helikal verbunden zu einer Super- oder Tripelhelix. Zusätzlich werden Galaktosyl- und Glukosylreste in die Ketten inkorporiert und via Exozytose gelangen sie in den extrazellulären Raum (LIEBIG 1999). Im extrazellulären Raum erfolgt die enzymatische Abspaltung des Registerpeptids und es entsteht nun Tropokollagen. Tropo-

kollagen polymerisiert durch Aggregation zu nativen Kollagen. Hierdurch verbinden sich die Enden der Ketten zu Mikrofibrillen und zusätzlich tritt eine kovalente Quervernetzung ein. Diese Mikrofibrillen lagern sich zu Kollagenfibrillen zusammen. Sie werden durch weitere Anlagerung und Quervernetzungen zu Kollagenfasern. Kollagenfasern sind stets unverzweigt und bilden meistens kleinere oder größere Bündel (LIEBIG 1999).

Der häufigste Kollagentyp des Körpers ist Typ I Kollagen. Weiterhin ist Typ I Kollagen das häufigste Kollagen des VKB. Es besteht aus zwei alpha1 Peptidketten und einer alpha2 Kettenvariante (LIEBIG 1999).

Das Typ III Kollagen setzt sich aus drei alpha1-Ketten zusammen (LIEBIG 1999).

Weiterhin gibt es noch die ungeformte (amorphe) Grundsubstanz. Sie besteht biochemisch aus polyanionischen Proteoglykanen und Strukturglykoproteinen. Proteoglykane werden auch als saure Glukosaminoglykane bezeichnet. Der Sulfatgehalt und der Grad ihrer Azetylierung variieren, so entwickeln sich daraus verschiedenste Gruppen von Glukosaminoglykanen: Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Hyaluronat. Glukosaminoglykane können größere Mengen an Wasser und Kationen binden. Zusammen mit den Kollagenfibrillen bilden sie eine stoffwechselaktive Permeabilitätsbarriere zur Regulation des extrazellulären Stofftransports. Durch ihre gute Wasserbindungskapazität beeinflussen sie den extrazellulären Flüssigkeitsgehalt. Strukturglykoproteine bestehen aus konjugierten Proteinen mit kovalent gebundenen Kohlenhydraten. Sie kommen u. a. in Sehnen, Knorpel, Knochen, Gefäßwänden und in Basalmembranen vor. Strukturglykoproteine regulieren die Neubildung von Bindegewebe und steuern die Kalzifikation (LIEBIG 1999).

Petersen und Tillmann (1999) fanden heraus, dass die Struktur des VKB im vorderen Anteil des distalen Drittels, wo es dem vorderen Rand der Fossa intercondylaris anliegt, von der typischen Struktur eines Bandes abweicht. In diesem Bereich fehlt die Synovialis an der zur Fossa intercondylaris gewandten Oberfläche, und das Gewebe des VKB ähnelt dem Aufbau von Faserknorpel, da zwischen den straffen Kollagenfaserbündeln Knorpelzellen liegen, die von einer metachromatisch angefärbten Matrix umgeben sind (PETERSEN u. TILLMANN 1999).

Die Entstehung von Faserknorpel in straffem Bindegewebe ist eine funktionelle Anpassung an Druck- und Schubbeanspruchung (MARKOLF et al. 1976).

2.3.1 Bandansatz

An den femoralen und tibialen Ansatzstellen des Kreuzbandes am Knochen weicht der mikroskopische Aufbau des VKB von dem intraartikulären Aufbau ab. Dort ähnelt die Struktur des VKB dem Aufbau von Faserknorpel (PETERSEN u. TILLMANN 2002). Die femoralen und tibialen Insertionszonen des VKB entsprechen dem Aufbau von chondral apophysären Bandansätzen (PETERSEN u. TILLMANN 1995), d. h., das straffe Bindegewebe inseriert über eine Zone aus Faserknorpel am Knochen. Zum Knochen hin ist der Faserknorpel mineralisiert (PETERSEN u. TILLMANN 2002). Weiler et al. (2002) beschrieben einen direkten Bandansatz mit vier Zonen: Band, Faserknorpel, mineralisierter Knorpel und Knochen.

2.4 Das *Remodeling*

Das eigentlich *Remodeling* bzw. die Ligamentisierung, also die Umwandlung eines Implantates oder Transplantates in ein dem nativen VKB ähnliches Band, wird von den meisten Autoren in drei Phasen unterteilt: die frühe Phase, das *Remodeling* und die Reifung.

Rougraff et al. (1993) gaben noch eine sich anschließende vierte Phase an und nannten sie *Quiescent* - Ruhephase.

Diesen *Remodelingphasen* geht eine Nekrosephase voraus. Die Länge dieser Nekrosephase unterscheidet sich zwischen humanen Untersuchungen und Tiermodellen, wo sie länger zu sein scheint.

Für Bosch et. al. (1992) hat sich gezeigt, dass jedes biologische Implantat bzw. Transplantat nekrotischen und degenerativen Veränderungen unterliegt die mit einem frühen Absinken der biomechanischen Eigenschaften einhergehen, bevor Revaskularisierung, zelluläre Wiederbesiedelung und das eigentliche *Remodeling* beginnen. In ihrer Studie

ersetzen sie bei Schafen das hintere Kreuzband mit autologen Transplantaten der Patellarsehne und untersuchten den Heilungsverlauf über zwei Jahre morphologisch und biomechanisch. Sie unterteilten den gesamten Heilungsprozess in folgende Phasen: ischämische Nekrose und Degeneration; Revitalisierung durch Revaskularisierung und Repopularisierung; Kollagenformation und Synthese anderer Komponenten der extrazellulären Matrix; und als letztes das *Remodeling* (BOSCH et al. 1992). Dementsprechend beginnt direkt nach der Transplantation die Nekrosephase, die zu einer Entzündungsreaktion führt und der sich die Revitalisierung anschließt. Ab der 16. Woche gaben Bosch et al. (1992) den Beginn der *Remodelingphase* an (BOSCH et al. 1992).

Claes et al. (2011) beschrieben nach ihren humanmedizinischen Untersuchungen die frühe, der Nekrose sich anschließende Phase, mit Kennzeichen wie Hypervaskularität und Hyperzellularität. In dieser Phase sind die Fibroblasten unorganisiert, zufällig angeordnet und metabolisch aktiv, was an ihren plumpen Zellkernen erkennbar ist. Kollagenbündel sind unorganisiert und irregulär (CLAES et al. 2011).

Während der *Remodelingphase* beobachteten Claes et al. (2011) ein langsames Absinken der Hypervaskularität bis zur Normovaskularität. Die Fibroblasten richten sich longitudinal aus und ihre Zellkerne sind eher ovoid. In der Reifungsphase sind die Kollagenbündel dann dicht gepackt und richten sich parallel aus (CLAES et al. 2011).

Weiterhin identifizierten Weiler et al. (2002) Myofibroblasten in heilenden VKB Implantaten und zeigten, dass diese Zellen die Art des *Remodeling* durch ihre auf die extrazelluläre Matrix ausübende Kontraktionskraft signifikant beeinflussen. Daher können diese Zellen als ein möglicher Indikator des Ligamentationsprozesses angesehen werden (DUSTMANN 2008).

Dass diese Phasen ablaufen ist mittlerweile unumstritten. Uneinigkeit herrscht über die Dauer. So gaben Scheffler et al. (2008) bis zur vierten Woche post operationem eine Nekrosephase an, der sich die frühe Phase mit Revitalisierung anschloss. Es folgten *Remodeling* und Reifungsphase. Scheffler et al. (2008) bezogen sich allerdings ausschließlich auf Tiermodelle und stellten weiterhin fest, dass sich Allografts und Autografts bezüglich der Länge der Nekrosephase unterscheiden (SCHEFFLER et al. 2008). In der

Humanmedizin scheinen die frühe Phase und die *Remodelingphase* deutlich länger zu sein, wo hingegen die Nekrosephase kürzer als in Tiermodellen zu sein scheint. So gaben in ihren humanmedizinischen Untersuchungen Rougraff et al. (1993) für die frühe Phase drei Wochen an, bei Sánchez et al. (2010) begann die frühe Phase erst ab der sechsten Woche post operationem und endete erst in der 12. Woche. Ähnlich verhielt es sich mit der *Remodelingphase*, die in humanmedizinischen Studien frühestens in der dritten Woche begann und spätestens in der 18. Woche endete (ROUGRAFF et al. 1993; SÁNCHEZ et al. 2010).

Das Ende der Ligamentisierung ist definiert als der Zeitpunkt, ab dem keine weiteren Veränderungen im *remodelten* Implantat bzw. Transplantat stattfinden (CLAES et al. 2011). Laut Sánchez et al. (2010) ist der gesamte Prozess ca. zwei Jahre nach der Operation abgeschlossen.

In einer Studie von Bosch et al. (1992) war das *Remodeling* am Ende der Studie nach zwei Jahren noch nicht abgeschlossen, es bestanden noch mechanische und strukturelle Unterschiede. Sie vermuteten, dass das *Autograft* niemals normale Ligamentcharakteristika haben würde. Auch Janssen et al. (2011) kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass das *Remodeling* zwei Jahre nach ihrer Kreuzbandrekonstruktion nicht abgeschlossen war. Beim Vergleich mit anderen Studien kamen sie zu dem Schluss, dass der *Remodelingprozess* bei Menschen länger dauert, verglichen mit den Ergebnissen verschiedener Studien mit Tiermodellen (JANSSEN et al. 2011).

2.5 Die Revaskularisierung

Wie oben bereits aufgezeigt ist die Revaskularisierung zwingend notwendig für das Überleben des Implantates bzw. Transplantates. Sie ist Grundvoraussetzung für die folgenden *Remodelingprozesse*.

Bereits kurze Zeit nach der Operation kommt es zu einer Revaskularisierung des Implantates bzw. des Transplantates. Diese Revaskularisierung beginnt stets in der Peripherie (CLAES et al. 2011). In das zum Zeitpunkt der Transplantation avaskuläre

Gewebe sprossen dann aus der Peripherie Gefäße ein und beginnen mit der weiteren Versorgung des Gewebes (CLAES et al. 2011). Weiler et al. (2001) stellten im Tiermodell eine Abnahme der mechanischen Eigenschaften des Gewebes zu diesem Zeitpunkt fest. Im weiteren Verlauf des *Remodelingprozesses* kam es dann auch zum Einwachsen von Gefäßen in die zentralen Bereiche (WEILER et al. 2001).

Der Grad der Revaskularisierung unterscheidet sich zwar, jedoch kommt es immer zu einer frühen Hypervaskularität, die im Laufe der Zeit sinkt und es stellt sich eine Normovaskularität ein (CLAES et al. 2011).

Eine maximale Gefäßdichte im subsynovialen Raum zum Zeitpunkt von sechs Wochen post operationem sowie intermediär und zentral zum Zeitpunkt von 12 Wochen post operationem fanden Unterhauser et al. (2003). Sie konnten außerdem durch Einteilung der Präparate in verschiedene Regionen zeigen, dass die Revaskularisierung von peripher nach zentral verläuft.

Petersen et al. (2003) konnten in ihrer Studie den die Revaskularisierung stimulierenden Wachstumsfaktor *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) nachweisen. Dieser wurde von aktivierten Fibroblasten bis zu einem Zeitpunkt von 24 Wochen exprimiert. Einen weiteren Wachstumsfaktor konnten Weiler et al. (2003) nachweisen. Das nachgewiesene *Platelet Derived Growth Factor-BB* (PDGF-BB) hatte ebenfalls einen gefäßstimulierenden Effekt während des frühen *Bandremodelings*.

Umstritten ist der Ursprung der Revaskularisation. Verschiedene Studien gaben als Ursprung umgebendes synoviales Gewebe (ROUGRAFF et al. 1993), Bindegewebe und den Hoffaschen Fettkörper (ARNOCZKY et al. 1982; SCKELL et al. 1999) an. Keine Studie konnte den vermuteten Ursprung beweisen (CLAES et al. 2011).

2.6 Die Knochenheilung

Da in der vorliegenden Studie Bohrkanäle zur Fixation des Implantates angelegt wurden, wird in dem nachfolgenden Abschnitt die Knochenheilung zusammenfassend erläutert.

2.6.1 Relevante Zellen der Knochenheilung

Die relevantesten Zellen des *Knochenremodelings* sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (REMEDIOS 1999).

Aus undifferenzierten Mesenchymzellen entwickeln sich Präosteoblasten als Vorläuferzellen der Osteoblasten. Präosteoblasten treten vor allem im Stratum cambium des Periosts und entlang von Gefäßen des primären Knochenmarks auf (BASSET 1962; MARKS u. POPOFF 1988; LIEBIG 1999). Sie bilden ein Zellreservoir und können sich durch Mitose zu Osteoblasten differenzieren (LIEBIG 1999).

Osteoblasten übernehmen syntheseaktive Funktionen bei der Knochenbildung. Sie bilden Kollagenfasern Typ I und nicht-kollagene Proteine, produzieren Glukosaminoglykane bzw. Proteoglykane, beteiligen sich an der Mineralisation des Knochens und an der Modulation der Osteoklastenfunktion (LIEBIG 1999; REMEDIOS 1999). Die Osteoblasten bilden die organische Grundsubstanz des noch nicht verkalkten Knochens, das Osteoid (LIEBIG 1999).

Nicht-kollagene Proteine wie Osteopontin oder *Bone Sialoprotein* (BSP) regulieren die Mineralisation, in dem sie Kalziumionen und Hydroxylapatit mit hoher Affinität binden. Durch die Abgabe von neutralen Proteasen und Kollagenasen werden nichtmineralisierte Knochenbestandteile für die nachfolgende Resorption durch Osteoklasten freigelegt, damit regulieren Osteoblasten auch die Knochenresorption (LIEBIG 1999).

Reguliert werden die Osteoblasten dabei durch Hormone wie Parathormon, Kalzitinin oder Steroidhormone sowie durch Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), Tumornekrosefaktor-beta (TNF-beta), *bone derived growth factor* (BDGF) und *epidermal growth factor* (EGF) (LIEBIG 1999).

Osteoblasten bilden täglich einen etwa 1 µm breiten, unverkalkten Osteoidsaum, dessen Gesamtbreite durchschnittlich 6 µm beträgt. Innerhalb von drei bis vier Tagen werden 70 % dieses Osteoids verkalkt, durch Restmineralisation wird dieser Vorgang nach sechs Wochen abgeschlossen (LIEBIG 1999).

Die Knochenneubildung durch Osteoblasten kann am Periost (periostale Knochenbildung), am Endost (endostale Knochenbildung), perivaskulär oder durch direkte Differenzie-

rung von Knochenzellen aus Bindegewebe (Faserknochenbildung) erfolgen (LIEBIG 1999).

Aus ca. 10 - 20 % der Osteoblasten werden während der Osteoidproduktion Osteozyten (MARKS u. POPOFF 1988; LIEBIG 1999). Osteozyten sind reife Knochenzellen, die nach ca. drei Tagen aus den Osteoblasten hervorgehen. Sie sind vollständig von verkalkter Knochengrundsubstanz umgeben. Osteozyten sind über lange Zellfortsätze miteinander verbunden und stehen so auch in Kontakt zu Osteoblasten, die sie bei Bedarf zur Differenzierung stimulieren (LIEBIG 1999).

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen (REMEDIOS 1999). Sie stammen von pluripotenten Zellen des Knochenmarks ab (MARKS 1983; LIEBIG 1999). Sie scheinen durch wiederholte Fusion mit mononukleären Vorläuferzellen zu überleben, daher wird ihre Lebensdauer als maximale Überlebensdauer ohne erneute Fusion der Zellen mit Vorläuferzellen definiert und beträgt bis zu sechs Wochen (LIEBIG 1999). Man findet sie typischerweise unmittelbar am Knochen in Lakunen des resorbierten Knochens. Sie setzen proteolytische Enzyme frei und dienen somit der Knochenresorption in Gebieten des aktiven *Remodelings* (BARON 1989; LIEBIG 1999).

Zur Knochenoberfläche hin bildet das Plasmalemm der Osteoklasten zahlreiche fingerförmige Zellausstülpungen. Diese Resorptionsstrukturen werden auch „*ruffled border*“ genannt, an ihnen läuft der Knochenabbau ab (VAES 1988). Der Knochenabbau findet in den Howship-Lakunen statt, wo sich Osteoklasten mit Hilfe kontraktiler Proteine wie Osteopontin und Integrin an den mineralisierten Knochen anlegen und ihn enzymatisch auflösen. Dabei leiten Osteoklasten die Knochenresorption ein, indem sie Knochen demineralisieren und nichtkollagene Matrix abbauen. Die freigelegten Kollagenfibrillen werden anschließend von mononukleären Zellen phagozytiert (LIEBIG 1999).

Die Aktivität der Osteoklasten unterliegt der hormonellen Regulierung, so wird ihre Aktivität durch Kalzitinin gehemmt und durch 1,25-dihydroxy-Cholecalciferol und Parathormon gefördert (LIEBIG 1999).

2.6.2 Ossifikation

Geflecht- oder Faserknochen

Geflecht- oder Faserknochen tritt im Verlauf jeder Knochenneubildung auf. Er entsteht überall dort, wo über längere Zeit Zug- und Druckkräfte wirken. Der embryonal angelegte Geflechtknochen wird nach der Geburt weitestgehend durch Lamellenknochen ersetzt. In einzelnen Organen bleibt er jedoch erhalten, wie z. B. im knöchernen Labyrinth des Ohrs, im äußeren Gehörgang und an den Ansatzstellen größerer Sehnen am Knochen. Osteozyten sind in der knöchernen Matrix unregelmäßig verteilt. Die Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht aus fein- und großfibrillären Kollagenfaserbündeln durchzogen. Der Geflecht- oder Faserknochen enthält weniger anorganische Substanzen als Lamellenknochen (LIEBIG 1999).

Lamellenknochen

Der Lamellenknochen besteht aus Knochenlamellen, die streng nach statisch-funktionellen Gesichtspunkten orientiert parallel oder konzentrisch geschichtet sind. Die strukturelle Grundlage ist das Osteon, auch Havers-System genannt (LIEBIG 1999). In seinem Zentrum befindet sich ein Zentralkanal, der die Gefäßversorgung, Nervenfasern und Lymphgefäße enthält (REMEDIOS 1999).

Weiterhin besteht das Osteon aus einer unterschiedlichen Anzahl konzentrischer Knochenlamellen, den Havers-Lamellen oder auch Speziallamellen. Sie werden von parallel angeordneten kollagenen Fasern und mineralisierter Knochenmatrix gebildet (REMEDIOS 1999; LIEBIG 1999). Die Osteozyten liegen zwischen den konzentrisch geschichteten Lamellen um den Zentralkanal in Lakunen (REMEDIOS 1999). Über Nexus stehen sie durch lange in den Canaliculi ossei verlaufende Zytoplasmfortsätze in Kontakt. So ist ein Stofftransport aus dem Havers-Gefäß zu jeder Stelle der Knochenmatrix möglich. Über Volkmann-Gefäße, die quer durch die Osteone verlaufen, ist ein Kontakt mit dem Periost möglich (LIEBIG 1999). Liebig (1999) beschrieb, dass jede Änderung der Belastung zu einer funktionellen Anpassung der Knocheninnenstruktur führt.

Der äußeren Grundlamelle liegt das Periost auf, der inneren liegt das Endost an. In der äußeren Grundlamelle inserieren Sharpey'sche Fasern (LIEBIG 1999). Sharpey'sche Fasern sind perforierende Fasern, die als Verlängerung aus dem Knochen weiches Gewebe am Knochen fixieren (WEILER et al. 2002).

Knochenbildung

Desmale Ossifikation (primäre Osteogenese)

Während der desmalen Ossifikation wandeln sich mesenchymale Vorläuferzellen zu Osteoblasten um. Diese Vorläuferzellen produzieren Kollagen und Osteoid in welches sich Osteoblasten einmauern. Schrittweise erfolgt die Mineralisierung der Knochengrundsubstanz und Osteoblasten wandeln sich zu Osteozyten. Diese Art der Ossifikation ist stark abhängig von der Einsprossung von Blutgefäßen, da diese zusätzliches mesenchymales Bindegewebe mitführen (LIEBIG 1999).

2.6.3 Knochenheilung

Die Knochenheilung läuft in drei Phasen ab: Entzündung, Reparatur und *Remodeling* (CREUSS u. DUMONT 1975). Die Entzündungsphase dauert ca. zwei bis drei Wochen und wird eingeleitet durch zerstörte Osteozyten, die eine Entzündungsreaktion auslösen. Durch ein entstandenes Hämatom gelangen die ersten Zellpopulationen von Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen zur Reparaturstelle (ASHTON et al. 1980). Sie beginnen zusammen mit den ersten Osteoklasten mit der Resorption und dem Abbau zerstörten Knochens (REMEDIOS 1999).

Die Reparaturphase ist gekennzeichnet durch die Organisation des Hämatoms, Angiogenese und Knochenzellproliferation (REMEDIOS 1999). Initial werden Kollagen Typ I, II und III produziert, im weiteren Verlauf dominiert Kollagen Typ I (LANE et al. 1979). Kollagen Typ I bildet mit 95 % den Hauptanteil der organischen Matrix des Knochens (REMEDIOS 1999). Kalziumhydroxyapatit wird in die Matrix eingelagert, chondroides Gewebe durch Knochen ersetzt und Osteoblasten produzieren Geflechtknochen (REMEDIOS 1999).

In der *Remodelingphase* wird mineralisiertes Knorpelgewebe in Geflechtknochen umgewandelt und dieser später in Lamellenknochen. Das Remodeling kann mehrere Jahre andauern (REMEDIOS 1999).

2.7 Derzeitiger Stand der Kreuzbandrekonstruktion

Laut Yastrebov und Lobenhoffer (2009) werden heutzutage isolierte Verletzungen des VKB oder HKB standardmäßig arthroskopisch versorgt.

Wie die Historie der Kreuzbandchirurgie zeigt, führten einfache Bandnähte oder die Verwendung synthetischer Bänder als Bandersatz nicht zum erwünschten Erfolg. Auch aktuellere Studien mit synthetischem Bandersatz, wie z. B. das „*ligament advanced reinforcement system*“ (LARS) wurden durchgeführt, sind aber bisher zu unausgereift (MACHOTKA 2010). Daher werden derzeit Sehnentransplantate zur Kreuzbandrekonstruktion verwendet.

Im Allgemeinen kann man drei große Gruppen von Transplantattypen nach ihrer Herkunft unterscheiden: autologe (*Autografts*), allogene (*Allografts*) und xenogene (*Xenografts*). Autologe Transplantate stammen vom Patienten selbst, allogene von einem menschlichen Spender und xenogene von einem artfremden Spender.

Xenogene Transplantate sind artfremder Herkunft. Es besteht die Gefahr der Infektion durch Zoonosen und auch Abstoßungsreaktionen sind möglich. Stone et al. (2007) behandelten in ihrer Studie im Schwein gewonnene Transplantate vor und verwendeten sie erfolgreich zur Rekonstruktion des VKB in Rhesusaffen. Derzeit ist die klinische Anwendung von xenogenen Transplantaten zur VKB Rekonstruktion nicht üblich.

Allografts zur Kreuzbandrekonstruktion sind die Ausnahme. Zum einen besteht die Gefahr der Infektion des Empfängers durch Erkrankungen des Spenders wie auch bei anderen Organtransplantationen, zum anderen sind auch Abstoßungsreaktionen möglich. Eine derzeit häufig angewendete Methode ist die „*deep-fresh-frozen*“ Methode, also das Schockgefrieren. Hierdurch werden die Klasse II *major histocompatibility* Proteine (MHC Proteine) des Donors zerstört und so die Antigenität des *Allografts* reduziert (ARNOCZKY

et al. 1986). Sowohl Jackson et al. (1993), als auch Nikolaou et al. (1986) konnten durch diese Gefriertechnik keine negativen Effekte auf die Reißfestigkeit des Transplantates feststellen. Scheffler et al. (2008) verglichen in ihrer Studie unsterilisierte „*fresh-frozen*“ *Allografts* mit *Autografts* und fanden eine verzögerte Revaskularisation, eine verzögerte Heilung und verminderte strukturelle und mechanische Eigenschaften (SCHEFFLER et al. 2008). Auch Trockengefrieren wurde untersucht (FRIEDLAENDER et al. 1976), auch hier wurden keine Einschränkungen der Reißfestigkeit festgestellt (PROKOPIS u. SCHEPSIS 1999). Da Gefrieren allerdings nicht das HI-Virus beseitigt, wurden auch verschiedene Methoden zur Sterilisation untersucht. Eine Möglichkeit zur Sterilisation der *Allografts* ist die Sterilisation mit Peressigsäure. Scheffler et al. (2008) konnten in einer Studie zeigen, dass diese Art der Sterilisation zu einer verlangsamten *Remodelingaktivität* und zu verminderten mechanischen Eigenschaften führt.

Andere Untersuchungen wurden mit verschiedenen Gasen und Gammastrahlen durchgeführt. Leider waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend (MARRALE et al. 2007). Weiterhin erfordern *Allografts* einen hohen logistischen und somit auch finanziellen Aufwand, so dass diese Art der Kreuzbandrekonstruktion nur spezialisierten Zentren vorbehalten bleibt. Zumindest den erhöhten finanziellen Aufwand konnten Cole et al. (2005) in ihrer Studie widerlegen, so sind in ihrer Studie die Kosten für Patienten mit autologen *bone tendon bone* (BTB) Transplantaten durch den erhöhten Personalaufwand, verlängerte Operationsdauer, Anästhesie, Medikamente, Radiologie und Hospitalisierung des Patienten deutlich höher.

Ungeachtet dessen haben die Nachteile der potenziellen Krankheitsübertragung, der verzögerten Einheilung, von Immunreaktionen, die Probleme bei der Sterilisation und Präparation der Transplantate, Tunnelerweiterungen, eine erhöhte postoperative traumatische Rupturrate, die Kosten, die unbefriedigenden Langzeitergebnisse und ein Mangel an Vergleichsstudien den Enthusiasmus über den Gebrauch von *Allografts* zur VKB Rekonstruktion gebremst (CHANG et al. 2003).

Der derzeitige „Goldene Standard“ beim vorderen Kreuzbandersatz in der Humanmedizin ist die Verwendung von autologen ortsständigen Sehnentransplantaten. Sie werden dem Patienten direkt vor der Transplantation entnommen und sollten einen Durchmesser von 8 mm aufweisen. Hierfür stehen die Sehnen verschiedener Muskeln zur Verfügung: M. semitendinosus oder M. gracilis oder eine Kombination beider Sehnen, die als *Hamstringsehnen* bezeichnet werden, M. quadriceps sowie die Patellarsehne, die als *bone tendon bone* (BTB) Transplantat bezeichnet wird (MÜLLER et al. 2007; YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009).

Hamstringsehnen, also die Ursprungssehnen des M. semitendinosus oder M. gracilis, können mit minimalem Weichteiltrauma an der anteromedialen Seite des proximalen Unterschenkels entnommen werden. Die Vorteile sind geringe postoperative Schmerzen und gute kosmetische Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Qualitäten der *Hamstringsehnen* bei adäquater Präparation durch die drei- oder vierfach aneinander gelegten Sehnenstränge jener der Patellarsehne gleichen (YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009). Müller et al. (2007) stellten fest, dass eine gedoppelte Sehne 2300 N widersteht und eine vierfache Sehnenplastik eine Reißfestigkeit bis 4100 N besitzt.

Müller et al. (2007) beschrieben aber auch eine eingeschränkte Innenrotationsfähigkeit des Kniegelenkes nach Entnahme der *Hamstringsehnen*. Zudem wird dem Kniegelenk ein aktiver medialer Stabilisator genommen, da *Hamstrings* als Agonisten des VKB gelten (MÜLLER et al. 2007).

Lützner und Bottesi (2009) sahen die Nachteile der *Hamstringsehnen* in der länger dauernden Einheilung im Bohrkanal, die aufwändigere Präparation und ebenfalls in der Schwächung der Agonisten des VKB. Jedoch konnten Vario et al. (2008) selbst bei Verwendung von Semitendinosus- und Gracilissehne keine neuromuskulären, Kraft- oder Ausdauerdefizite feststellen. Weitere Nachteile sahen Müller et al. (2007) in der nicht vorhersehbaren Länge und Qualität der Transplantate, einer möglichen Läsion des N. infrapatellaris und der „inhärenten Viskosität“ des Sehnenmaterials.

Für die Patellarsehne gaben Müller et al. (2007) eine Reißfestigkeit von 1700 - 2900 N an, damit besitzt sie, bezogen auf die Querschnittsfläche, die größte Reißfestigkeit. Der wesentliche Vorteil besteht in der Verankerung der Knochenblöcke im femoralen und tibialen Bohrkanal und der daraus resultierenden hohen Primärstabilität sowie der schnellen und sicheren Einheilung des Transplantates (YOSHIYA et al. 2000).

Laut einer Umfrage 1998 von Cambell verwendeten 76 % der Mitglieder der *ACL-Study-Group* die Patellarsehne. Jäger (2005) stellte nach seiner Studie am eigenen Patientengut zusammenfassend fest, dass durch die Verwendung der Patellarsehne zur Rekonstruktion des VKB auch langfristig gute Ergebnisse sowohl in objektiven als auch in subjektiven Parametern erzielt werden und dass sie zu einer hohen Patientenzufriedenheit führt.

Eine Entnahme von BTB Transplantaten ist mit einem größeren Weichteiltrauma und entsprechend stärkeren postoperativen Schmerzen verbunden (MÜLLER et al. 2000; YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009). Zusätzlich besteht die Gefahr eines Schmerzzustandes nach Entnahme eines BTB Transplantates bei knienden Tätigkeiten (MÜLLER et al. 2000). Mastrokalos et al. (2005) konnten allerdings zeigen, dass diese Beschwerden tatsächlich durch die Entnahme und nicht durch die Kreuzbandplastik bedingt sind.

Wesentlich seltenere Komplikationen sind ein durch die Narbenbildung im Hebedefekt bedingtes infrapatellares Kontraktursyndrom mit Tiefertreten der Patella und Patellafrakturen (LÜTZNER u. BOTTESI 2009). Müller et al. (2007) gaben als weitere Komplikationen 3 % Früh- und Spätfrakturen (> drei Monate) der Patella an. Weiterhin sind eine Patella baja durch die Schrumpfung des Patellarsehnenrests oder des Hoffa-Fettkörpers mit folgendem erhöhten Anpressdruck und nachfolgendem retropatellaren Schmerzsyndrom sowie bei 40 % der Patienten Patellaspitzensyndrom und Patellartendinitis möglich.

Quadrizepssehnen transplantate sind mit etwa 8 mm doppelt so stark wie die Patellarsehne (MÜLLER et al. 2007). Sie widerstehen bei einer Transplantatbreite von 10 mm einer Beanspruchung bis 2350 N (MÜLLER et al. 2007).

Quadrizepssehnen transplantate werden eher selten verwendet und können mit oder ohne Knochenblock entnommen werden. Vor allem nach Rerupturen von Semitendinosusseh-

nen oder zur Verstärkung von sehr dünnen Semitendinosussehnen werden Quadrizepssehnen verwendet. Bei Entnahme mit Knochenblock bestehen prinzipiell die gleichen Risiken wie bei Patellarsehnentransplantaten. Bis zu einem Jahr postoperativ ist ein Verlust von 20 % der Oberschenkelstreckfähigkeit beschrieben (MÜLLER et al. 2007). Diese hohe Entnahmemorbidität ist u. a. mitverantwortlich für einen Rückgang der Anzahl an BTB Plastiken (MÜLLER et al. 2007).

Woo et al. (2002) demonstrierten mit ihren Untersuchungen, dass VKB Rekonstruktionen mit *Hamstringsehnen* oder BTB Transplantaten die anteriore tibiale Translation bei anterior tibialer Belastung erfolgreich limitieren. Weiterhin demonstrierten sie aber auch, dass bei Kombination mit Rotationskräften die anteriore tibiale Translation nicht ausreichend limitiert wird (WOO et al. 2002).

Neben verschiedenen Transplantattypen stehen auch verschiedene Verankerungsmöglichkeiten zur Verfügung. Dabei unterscheidet man generell eine gelenkferne extrakortikale Fixation und eine gelenknahe Fixation. Je nach Methode kann eine Primärfestigkeit von 200 - 1200 N erreicht werden (MÜLLER et al. 2007). In mehreren Studien konnten die mechanischen Vorteile der gelenknahen Fixation belegt werden (ISHIBASHI et al. 1997; SCHEFFLER et al. 2002).

Des Weiteren wird zwischen indirekter Fixation über ein Konstrukt aus Nahtmaterial oder Tape an einem Verankerungsobjekt (z. B. Fixationsbutton, Staple, Schraube oder Ähnliches) und der direkten Fixation des Transplantats im Bohrkanal (z. B. Interferenzschraube) unterschieden (LÜTZNER u. BOTTESI 2009).

Als Fixationsmöglichkeiten stehen zurzeit mehrere Systeme wie *Crosspins*, Biointerferenz- oder Titaninterferenzschrauben sowie Kippköpfe zur Verfügung (YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009). Eine weitere Fixationsmöglichkeit sind *Endo-* oder *Suture Button*. Biodegradierbare Stifte besitzen eine hohe Primärfestigkeit, können aber brechen und zu Irritation der Weichteile führen (MÜLLER et al. 2007). Weiterhin kamen Müller et al. (2007) zu dem Schluss, dass die alleinige Verwendung von Titanstiften zu Aufweitungen der Bohrkanäle führen kann.

Fixationsbuttons sind eine nicht anatomische Verankerung und leisten einer elastischen, longitudinalen Verformung mit Scherbewegungen und horizontalen Bewegungen mit Scheibenwischereffekt Vorschub. Dadurch kann eine Aufweitung des Bohrkanals entstehen, die eine Insuffizienz nach sich ziehen kann (MÜLLER et al. 2007). Ihre Vorteile sind ihre hohe Ausreißfestigkeit und der vollständige Kontakt zwischen Transplantat und Knochen im Bohrkanal (LÜTZNER u. BOTTESI 2009), aus dem eine gute Einheilung resultiert.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Interferenzschrauben. Der durch ihre Verwendung entstehende Anpressdruck von 400 - 500 N, führt bei Knochenblöcken zu einer primären, biologischen Einheilung ohne fibröse Zwischenschicht (MÜLLER et al. 2007). Ihr Vorteil sind die wasserdichte Fixation des Transplantates am Tunneleingang und damit die höhere Steifigkeit des gesamten Konstrukts (SCHEFFLER et al. 2002).

Nachteilig ist die Gefahr der Beschädigung des Transplantates, besonders bei Verwendung großer Schrauben mit scharfen Windungen. Im Revisionsfall ist die Entfernung der Interferenzschrauben u. U. schwierig. Lützner und Bottesi (2009) beschrieben weiterhin eine im Vergleich zu anderen Fixationsmöglichkeiten, verringerte Primärstabilität und vor allem tibial die Gefahr des Herausgleitens des Transplantates bei zu klein dimensionierter Schraube.

Bei der Hybridfixation werden mehrere Fixationsmöglichkeiten kombiniert. So werden die Vorteile der extrakortikalen Verankerung mit hoher Primärfestigkeit mit denen der gelenknahen vereinigt (Verminderung des Scher- und Scheibenwischereffekts), was zu einer beschleunigten Einheilung führt (MÜLLER et al. 2007).

Eine weitere Möglichkeit ist die Transfixation im Tunnel. Hierbei erfolgt femoral eine Verankerung im Bohrkanal. Dabei wird eine höhere Primärstabilität als bei Interferenzschraubenfixation erreicht (ZANTOP et al. 2007). Nachteilig sind laut Lützner und Bottesi (2009) der teilweise komplizierte Transplantateinzug sowie die fehlende gelenknahe Abdichtung gegen den Einstrom von Synovialflüssigkeit.

Saccomanni (2011) hat in seiner Arbeit verschiedene Fixationsmöglichkeiten miteinander verglichen und favorisiert Interferenzschrauben (SACCOMANNI 2011).

Weiterhin unterscheidet man zwischen der Doppelbündelplastik und der anatomisch platzierten Einzelbündelplastik. Bei der Doppelbündelplastik werden anteromediales und posterolaterales Bündel separat ersetzt. Bei dieser Technik steigen die technischen Schwierigkeiten der Transplantatentnahme, der Platzierung der Bohrkanäle und der Fixierung (YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009).

Die Autoren mehrerer Untersuchungen (WOO et al. 2002; RISTANIS et al. 2003; GABRIEL et al. 2004) kamen in experimentellen Studien zu dem Schluss, dass die Rotationsinstabilität nur mit der Doppelbündelplastik erreicht werden kann, da das posterolaterale Bündel eine wichtige Funktion in der Rotationsstabilität erfüllt. Laut Yastrebov und Lobenhoffer (2009) ließen sich zwar Vorteile insbesondere hinsichtlich der Rotationsstabilität in experimentellen Studien nachweisen, aber die klinischen Ergebnisse haben bislang nur geringe Unterschiede in der objektiven Stabilität und im funktionellen Ergebnis gezeigt. So bleibt die langfristige Bedeutung dieser Modifikation der Operationsmethode abzuwarten (YASTREBOV u. LOBENHOFFER 2009). Außerdem ist die Doppelbündelrekonstruktion technisch sehr anspruchsvoll, bietet ein höheres Fehlerpotenzial und ist aufgrund der doppelten Implantatkosten teurer (LÜTZNER u. BOTTESI 2009).

Zusammenfassend kann man sagen, dass zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes in der Humanmedizin verschiedene Techniken zur Verfügung stehen. Vor allem mit *Hamstring*- und Patellarsehnentransplantaten können gute Ergebnisse erreicht werden. Standardoperationstechnik ist zurzeit noch die Einbündelrekonstruktion mit einer möglichst gelenknahen Fixation.

2.8 Vergleichende Anatomie beim Minipig

Die Anatomie des VKB beim Minipig entspricht weitestgehend der des Menschen (XEROGEANES et al. 1998).

Das VKB des Minipigs hat eine breite, fächerartige Insertion an der Tibia und eine kleinere Insertion an der medialen Seite des Condylus femoralis lateralis. Das gesamte VKB besitzt einen dünnen synovialen Überzug (JOSHI et al. 2009).

2.9 Vergleichende Anatomie beim Hund

Laut Muir et al. (2011) ist das craniale Kreuzband des Hundes anatomisch equivalent zum anterioren Kreuzband des Menschen. Es entspringt an der interkondylaren Fläche des Condylus lateralis ossis femoris und zieht in kraniomediodistale Richtung. Es inseriert fächerartig vor der Area intercondylaris centralis tibiae (ALVAREZ 2011).

Auch das VKB des Hundes besteht aus zwei klar definierten Bündeln, einem dickeren, gedrehten kraniomedialen Bündel und einem dünneren, geraden kaudolateralen Bündel. Auch hier sind beide Kreuzbänder vollständig von Synovialis überzogen, sie stehen also nicht in Kontakt mit der Synovialflüssigkeit (ALVAREZ 2011). Während das kraniomediale Bündel durch alle Phasen der Flexion und Extension gespannt ist, ist das kaudolaterale Bündel bei der Extension gespannt und erschlafft bei der Flexion (SCHULZ 2009).

Die Translation der Tibia wird durch die Neigung des Tibiaplateaus, eine Hyperextension des Kniegelenkes und übermäßige Tibiarotation ermöglicht. Bei Beugung wird der kranio-mediale Anteil des VKB gespannt, der kaudolaterale Anteil ist entspannt (ARNOCZKY u. MARSHALL 1977; HEFFRON et al. 1978).

Als aktuellste Erkenntnisse gaben Böttcher et al. (2011) jedoch an, dass eine vordere Kreuzbandruptur bei Hunden zu einer Instabilität des Os femoris führt, bei gleichzeitig im Raum stabiler Tibia.

2.10 Derzeitiger Stand der Kreuzbandrekonstruktion in der Veterinärmedizin

Auch in der Veterinärmedizin ist eine Ruptur des VKB relevant, insbesondere bei der Spezies Hund. Schweine und auch Minipigs erreichen als Nutztiere in der Regel nicht das entsprechende Alter, um eine Ruptur des VKB zu erleiden. Sollte es doch einmal so sein, ist eine chirurgische Therapie aus ökonomischer Sicht eher zweifelhaft. Lediglich Minipigs

in Liebhaber- oder Hobbyhaltung kämen für eine chirurgische Therapie in Frage. Auch Katzen sind eher seltene Patienten mit einer Ruptur des VKB, zumal isolierte Rupturen des VKB bei ihnen in der Regel problemlos konservativ ausheilen. Herbivoren sind auf Grund ihrer besonderen Anatomie bei diesem Krankheitsbild Ausnahmen. Da das chirurgische Vorgehen bei einer Ruptur des VKB bei Minipig und Hund gleich ist, sind die weiteren Ausführungen auf die Spezies Hund beschränkt.

Der Riss des VKB beim Hund gehört weltweit zu den am häufigsten auftretenden orthopädischen Problemen in der Tiermedizin (HARASEN 2003).

Harasen (2003) konnte in seinen Studien eine Veränderung der betroffenen Population feststellen, so waren in seiner ersten Studie von 1983 - 1990 hauptsächlich weibliche Tiere kleiner Hunderassen betroffen, nur 22 % waren Hunde großer Rassen. In den Jahren 1991 - 1994 stieg die Anzahl Hunde großer Rassen auf 48 % und 1997 - 2002 waren es bereits 67 %. Laut seinen Beobachtungen erleiden zwei Drittel aller Hunde im Laufe der Zeit ebenfalls einen Kreuzbandriss (KBR) in der kontralateralen Gliedmaße.

48 % aller betroffenen Hunde hatten in seiner letzten Studie gleichzeitig einen Schaden am medialen Meniskus, während es in seiner ersten Studie nur 15 % waren. 13 % der Hunde hatten einen partiellen KBR, wobei immer das kraniomediale Bündel betroffen war. Muir et al. (2011) errechneten in ihrer Studie eine Wahrscheinlichkeit von 54 %, dass die kontralaterale Extremität ebenfalls einen KBR erleiden wird. Laut ihrer Studie passiert das nach etwa 947 Tagen oder 2,59 Jahren nach dem ersten KBR (MUIR et al. 2011).

Erkrankungen des VKB gehen einher mit Osteoarthritis oder führen zu einer Osteoarthritis. Comerford et al. (2011) erklärten, dass eine Degeneration der extrazellulären Matrix des Bandes zu dessen Ruptur führt. Die genaue Ätiopathogenese ist bisher noch ungeklärt, aber Comerford et al. (2011) konnten einige Risikofaktoren identifizieren: Rasse, Körpergewicht und Geschlecht. Weiterhin spielen auch genetische Aspekte eine Rolle, so sprachen sie z. B. dem Neufundländer eine genetische Prädisposition für einen KBR zu. Ein erhöhter zellulärer Metabolismus im VKB wurde direkt assoziiert mit einer erhöhten kraniokaudalen Kniegelenksinstabilität bei Hunderassen mit einem erhöhten Risiko für einen KBR. Weiterhin erhöhen Stellungsanomalien oder eine erhöhte

Produktion von entzündlichen Zytokinen im Gelenk die Wahrscheinlichkeit einer Ruptur (COMERFORD et al. 2011).

Doom et al. (2008) konnten bei prädisponierten Hunden im Kniegelenk eine Erhöhung der Interleukin-8 Expression nachweisen, bei denen es innerhalb der folgenden sechs Monate zu einer Ruptur des VKB kam. Somit gibt es ein entzündliches Geschehen im Kniegelenk bevor es zu einer klinischen Ruptur kommt.

Eine Studie von 2011 (SHEARER 2011) gab die Kreuzbandruptur als zweithäufigste orthopädische Erkrankung bei Hunden an. Die Prävalenz der Kreuzbandruptur steigt mit zunehmendem Alter. In Abhängigkeit von der Größe der Rasse wird sie in der Häufigkeit bei kleinen Hunderassen nur von der Patellaluxation und bei großen Hunderassen von der Hüftgelenksdysplasie übertroffen. Die am häufigsten diagnostizierte orthopädische Erkrankung ist bei allen Hunderassen die Arthritis bzw. Arthrose (SHEATER 2011).

Diese Studienergebnisse veranschaulichen, dass die Pathogenese im Vergleich zum Menschen sicher eine andere ist, aber die Folgen die gleichen sind. Weiterhin zeigen sie, dass wie in der Humanmedizin die Inzidenz steigend ist.

Alvarez (2011) beschrieb eine Wandlung der Epidemiologie, des Erscheinungsbildes und einen Anstieg der Inzidenz. Ursprünglich handelte es sich im Wesentlichen um ein orthopädisches Problem bei Hunden kleiner und mittelgroßer Rassen älter als sechs Jahre, das meist im Zusammenhang mit systemischen Erkrankungen wie Adipositas, Hypothyreose, Cushing Syndrom und unspezifischen Arthropathien auftrat. Nur selten stand eine Ruptur des VKB im Zusammenhang mit einer Überbelastung oder Überbeanspruchung durch körperliche Aktivität (ALVAREZ 2011).

Eine wichtige Erkenntnis besteht heute darin, dass der Kreuzbandruptur eine Synovitis vorausgeht. Die Ursache für diese Schädigung ist bislang nicht geklärt (ALVAREZ 2011). Die zunehmende Inzidenz erklärte Alvarez (2011) mit der gestiegenen Beliebtheit großer Hunderassen und Riesenrassen und der zunehmenden Freude der Besitzer an der Aktivität mit ihren Hunden.

Eine Ruptur des VKB führt, wie auch beim Menschen, zu einer Instabilität des Gelenkes und somit zu allen sekundären Schäden, wie Arthrose, die durch Lahmheit gekennzeichnet ist.

Die Diagnose einer Ruptur des VKB wird während der klinischen Untersuchung gestellt. Ein positiver Schubladen- und Tibiakompressionstest sind pathognomonisch. Als vordere Schublade wird eine starke kraniokaudale Bewegung der Tibia relativ zum Femur infolge einer Traumatisierung des vorderen Kreuzbandes bezeichnet (SCHULZ 2009). Böttcher et al. (2011) gaben jedoch an, dass eine vordere Kreuzbandruptur bei Hunden zu einer Instabilität des Femur bei gleichzeitig im Raum stabiler Tibia führt.

Bei partiellen Rupturen oder chronischen Verläufen können die Testergebnisse unklar sein, dann kann eine Diagnose per Arthroskopie gestellt werden (ALVAREZ 2011).

Vasseur (1984) kam in seiner Studie zu dem Schluss, dass Hunde mit einem Körpergewicht unter 15 kg mit einer Erfolgsrate von 85 % konservativ behandelt werden können, wenn sie keinen gleichzeitig vorliegenden Meniskusschaden haben.

Chirurgische Techniken

Bei den chirurgischen Techniken, die derzeit beim Hund angewendet werden, kann man zwei grundlegende Gruppen unterscheiden: der Bandersatz und die Modifikation der Biomechanik des Kniegelenkes.

Bei den Bandersatztechniken wird zwischen intra- und extrakapsulärem Bandersatz differenziert.

Der intrakapsulärer Bandersatz

Der intrakapsuläre Bandersatz entspricht dem in der Humanmedizin häufig durchgeführten Bandersatz mit Transplantaten aus dem Ligamentum patellae, Musculus semimembranosus oder der Fascia lata. Vor- und Nachteile dieser Methoden entsprechen ebenfalls denen in der Humanmedizin.

Conzemius et al. (2005) verglichen in einer Studie die gängigen chirurgischen Methoden bei KBR bei Hunden. In dieser Studie hat der intrakapsuläre Bandersatz die schlechtesten Langzeitergebnisse erbracht.

Der extrakapsulärer Bandersatz

Beim extrakapsulären Bandersatz werden synthetische Seitenbänder eingezogen. Dabei werden Materialien wie Nylon, Polypropylen, Kevlar, Stahldraht oder andere verwendet. Mehrere verschiedene Zügelungstechniken wurden entwickelt, so kann der Bandersatz aus einem lateralen Fadenzügel, einem lateralen und einem medialen Fadenzügel oder aus einem Band, das beide Seiten des Gelenkes überzieht, bestehen (ALVAREZ 2011). Die häufigste Komplikation nach lateralen Zügelungstechniken mit prothetischen Bändern ist das Nachgeben der proximalen Verankerung auf Höhe der Sesambeine (Fabellae) (ALVAREZ 2011). Zur Vermeidung dieser Komplikationen wurden Verankerungsgeräte aus Metall entwickelt, die auf Höhe der Sesambeine in den Femurknochen geschraubt werden (GUÉNÉGO et al. 2007).

Die Verankerung des prothetischen Bandes erfolgt in der Regel zwischen dem in den Ursprungssehnen des Musculus gastrocnemius gelegenen Sesambein und einem Bohrkanaal in der Tuberositas tibiae (ALVAREZ 2011). Roe et al. (2008) haben nun in einer Studie die idealen isometrischen Punkte für diese Technik bestimmt.

Alvarez (2011) sah die Vorteile der Operationstechniken des extrakapsulären Bandersatzes in ihrer Einfachheit, den niedrigen Kosten und der kurzen Operationsdauer. Einen Nachteil sah er darin, dass die postoperative Erholung bei Patienten > 30 kg bis zu sechs Monate dauern kann.

In der Studie von Conzemius et al. (2005) erbrachte die laterale Fadenzügelung nach Flo, gute Langzeitergebnisse.

Techniken zur Modifikation der Biomechanik

Die zweite große Gruppe der Operationstechniken ist die Modifikation der Biomechanik des Kniegelenkes.

Hier wird das VKB nicht ersetzt, sondern die Anatomie des Kniegelenkes so verändert, dass die Kranialverschiebung der Tibia gegen den Femur aufgehoben wird. Zu diesen Techniken zählen die *Tibial Plateau Leveling Osteotomy* (TPLO) und die *Tibial Wedge Osteotomy* (TWO). Bei beiden Techniken wird die Winkelung des Tibiaplateaus verändert. Die *Triple Tibial Osteotomy* (TTO) ist eine Kombination beider Techniken. Die letzte Technik ist das *Tibial Tuberosity Advancement* (TTA), sie basiert auf der entsprechenden humanmedizinischen Technik.

Tibial Plateau Leveling Osteotomy (TPLO)

Bereits 1993 beschrieb Slocum die Methode der TPLO. Der theoretische Ansatzpunkt besteht darin, dass der Vorwärtsschub der Tibia („*cranial tibial thrust*“ oder CTT) in Zusammenhang steht mit dem Neigungswinkel des Tibiaplateaus und der bei der Gewichtsbelastung entstehenden, parallel zur Längsachse der Tibia ausgerichteten Kompressionskraft. Wird nun der Neigungswinkel der auch als „Tibiaplateau“ bezeichneten Gelenkfläche des Unterschenkels auf einen Wert zwischen 0° und 5° eingestellt, wird der Vorwärtsschub der Tibia aufgehoben und das VKB wird überflüssig, da es seine Hauptfunktion nicht mehr erfüllen muss (ALVAREZ 2011).

Die Nivellierung wird bei dieser Operationsmethode durch eine proximale, semizirkuläre Osteotomie der proximalen Tibia erreicht. Diese Osteotomie wird mit Hilfe einer speziellen kreisrunden Säge ausgeführt. Nach der Osteotomie wird das abgetrennte proximale Ende ventrokaudal rotiert, und die Osteotomiestelle wird mit einer P- oder T-förmigen Platte stabilisiert. Das nötige Ausmaß der Rotation wird, ausgehend von der Tibiaplateauwinkelung, mit Hilfe von Standardreferenztabellen berechnet (ALVAREZ 2011). Wilke et al. (2002) gaben 20,5° als den normalen Tibiaplateauwinkel an. Reif und Probst untersuchten 2003 die Tibiaplateauwinkel von Labrador Retrievern mit und ohne KBR. Sie kamen zu dem Schluss, dass der Tibiaplateauwinkel keine Rückschlüsse auf einen möglichen KBR erlaubt (REIF u. PROBST 2003).

In der Studie von Conzemius et al. (2005) erbrachte die TPLO ebenso wie die laterale Fadenzügelung gute Langzeitergebnisse.

Tibial Wedge Osteotomy (TWO)

Das Ziel dieser Operationstechnik ist es, der Kranialverschiebung der Tibia durch eine Reduzierung der Tibiaplateauwinkelung entgegenzuwirken. Hierfür wird ein Knochenkeil mit Basis an der kranialen Seite der Tibia osteotomiert, und die Osteotomiestelle anschließend mit einer dynamischen Kompressionsplatte stabilisiert. Um einen Tibiaplateauwinkel von 5° zu erreichen, muss der Keil einem dem Tibiaplateauwinkel entsprechenden Winkel haben (ALVAREZ 2011).

Derzeit wird die TWO in Kombination mit der TPLO v. a. für die Anwendung bei Hunden mit einem sehr großen Tibiaplateauwinkel empfohlen (ALVAREZ 2011).

Tuberosity Advancement (TTA)

Eine weitere Technik dieser Gruppe ist das TTA.

Bei dieser Technik wird davon ausgegangen, dass die auf das Gelenk einwirkenden Gewichtskräfte tatsächlich nicht parallel zur Längsachse der Tibia ausgerichtet sind, sondern parallel zum Kniescheibenband. Das Ziel ist eine Nivellierung („Leveling“) zwischen Kniescheibenband und Tibiaplateau (ALVAREZ 2011).

Erreicht wird das durch eine mediale Osteotomie der Tuberositas tibiae, die kranial des medialen Meniskus beginnt und bis zu dem am weitesten distal gelegenen Punkt der Tuberositas tibiae geführt wird. Die so osteotomierte Tuberositas tibiae wird dann weit nach vorn verlagert, bis das Kniescheibenband in einem Winkel von 90° zum Tibiaplateau liegt. Nachfolgend wird ein als Platzhalter dienender „Käfig“ in den proximalen Abschnitt des Osteotomiespalttes implantiert, um die Tuberositas tibiae in dieser nach kranial verlagerten Position zu halten (ALVAREZ 2011). Die Fixation der Tuberositas tibiae erfolgt schließlich mit einer speziellen chirurgischen Platte. Der Defekt wird anschließend mit Spongiosa gefüllt. Die Knochenheilung ist etwa 12 Wochen nach dem Eingriff abgeschlossen (ALVAREZ 2011).

Apelt et al. (2007) konnten in ihrer Studie beweisen, dass das Versetzen der Tuberositas tibiae und damit des Ansatzes der Patellarsehne in kraniale Richtung, eine kraniale Verschiebung der Tibia neutralisiert und umwandelt in eine kaudale Verschiebung der

Tibia. Eine Neutralisation der tibiofemorale Scherkräfte erfolgt bei einem Winkel von $90,3^\circ \pm 9^\circ$ zwischen Patellarsehne und Tibiaplateau (APELT et al. 2007).

Alvarez (2011) sah die Vorteile der TTA gegenüber der TPLO in der geringeren Invasivität, der kürzeren Operationsdauer und der Möglichkeit der gleichzeitigen Korrektur einer Patellaluxation.

Als Hauptkomplikationen gaben Lafaver et al. (2007) einen späteren Meniskusschaden, Tibiafraktur, Implantatversagen und Infektionen an. Sie kamen zu dem Schluss, dass die TTA gute bis exzellente funktionelle Ergebnisse bringt (LAFEVER et al. 2007).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die derzeit am häufigsten durchgeführten chirurgischen Techniken der extrakapsuläre Bandersatz und die TPLO sind.

Da auch in der Veterinärmedizin die Inzidenz der Rupturen des vorderen Kreuzbandes steigt, sind verbesserte Techniken oder die Entwicklung neuer Techniken interessant. Im Gegensatz zu den in der Humanmedizin derzeit angewandten Methoden, gibt es jedoch bei den o. g. Techniken keine Entnahmemorbidität und die erzielten Ergebnisse sind sehr zufriedenstellend.

2.11 Strategie des Dissertationsprojektes

Da die Ruptur des VKB sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin zu den häufigsten orthopädischen Problemen gehört, ist es auch eines der am meisten untersuchten Probleme. Vielfältige chirurgische Techniken wurden bisher entwickelt, welche die unterschiedlichsten Ansätze verfolgten.

Ziel dieser Arbeit ist, eine Möglichkeit zur VKB Rekonstruktion zu finden, mit der es gelingt, die Nachteile der Entnahmemorbidität der derzeitigen Standardtechniken zu umgehen. Es wird ein xenogener Bandersatz entwickelt und hergestellt, der anschließend zur Rekonstruktion des VKB beim Minipig angewendet wird.

Die Arbeitshypothesen werden wie folgt formuliert:

1. Ein xenogener Bandersatz kann so beschaffen und behandelt sein, dass es nicht zu immunologischen Reaktionen kommt
2. Dieser Bandersatz verhält sich in Hinblick auf Bandheilung, Bandeinheilung und Funktion ähnlich oder gleich einem autologen Transplantat
3. Der zeitliche Ablauf der Heilung ist ähnlich oder gleich einem autologen Transplantat
4. Nach abgeschlossener Heilung ähnelt das Implantat im histologischen Erscheinungsbild und Funktion dem nativen VKB

Diese Arbeitshypothesen sollen geprüft werden, indem zu zwei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten Präparate gefertigt und histologisch ausgewertet werden.

Hierfür werden zwei verschiedene Färbungen für die deskriptive, morphologische Auswertung der Präparate angefertigt. Für die Beurteilung der Revaskularisation als wichtigen Faktor der Bandheilung wird eine Färbung des Faktor-VIII-*related* Antigen (FVIIIrA) angefertigt. Die Auswertung wird einmal deskriptiv und einmal semiquantitativ erfolgen. Zur Veranschaulichung des *Bandremodelings* werden Kollagen I Färbungen angefertigt. Ziel dieser Färbungen wird die Unterscheidung von Implantatgewebe und neu gebildetem Gewebe des Minipig, also der Nachweis eines *Bandremodelings* und die Integration des Implantates sein.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit entstand durch eine Zusammenarbeit des EXIST-Forschungstransfer Projektes des Lehrstuhls für Tissue Engineering & Regenerative Medizin der Arbeitsgruppe MCW Nöth an der Universität Würzburg und dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der Charité Berlin.

Die Transplantatentwicklung erfolgte durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe von Meike Haddad-Weber an der Universität Würzburg. Die Operationen wurden von Dr. Lars Rackwitz und Meike Haddad-Weber durchgeführt. Sie übernahmen ebenfalls die Tötung der Tiere zur Probenentnahme. Ein Teil der Proben wurde biomechanischen Auswertungen im Rahmen einer weiteren Dissertation (Simon Bischoffsberger, „Biomechanische Untersuchung von biomaterialbasierten Kreuzbandkonstrukten“) zugeführt.

Die Aufarbeitung der Proben sowie die histologischen Auswertungen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation am Julius Wolff Institut der Charité Berlin vorgenommen. Die Betreuung erfolgte durch Dr. med. vet. Hanna Schell sowie mehreren medizinisch - technischen Assistenten am Julius Wolff Institut.

3.1.1 Tierauswahl

Für diese Studie wurde das Minipigmodell ausgewählt. Mehrere Gründe sprechen für das Minipig, u. a. entspricht das Kniegelenk anatomisch dem des Menschen, weiterhin entsprechen Größe und anatomische Verhältnisse denen in anderen Studien verwendeten Tieren. Die Stabilität des Kniegelenkes des Schweines ist abhängig vom VKB. Auch hämatologische Charakteristika entsprechen denen des Menschen, was wichtig ist für die Vergleichbarkeit der Wundheilung (MUELLER et al. 2001).

Die Genehmigung für den Tierversuch wurde durch die Regierung von Unterfranken, das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit erteilt. Die Genehmigungsnummer lautet: 55.2-2531.01-86/09.

Die Tiere wurden von einem Züchter (Alois Reichert, Obersfeld, Deutschland) bezogen und vorab durch einen Tierarzt untersucht. Alle Tiere waren zu Beginn der Studie älter als ein Jahr. Es wurde eine VKB Rekonstruktion mit einem neu entwickelten Kollagen-implantat durchgeführt. Für die biomechanische und histologische Auswertung wurden alle Tiere nach Ende der Standzeit euthanasiert. Insgesamt wurden für die Studie 40 Minipigs, davon 20 weibliche und 20 männliche Tiere, operiert. Männliche und weibliche Tiere wurden gleichmäßig auf alle Gruppen verteilt.

Die 40 Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe, Gruppe 0, beinhaltete acht Tiere, die zur Etablierung der Operationsmethode operiert wurden. Die Einteilung der Gruppen 1 und 2 erfolgte nach den unterschiedlichen Standzeiten. Die Standzeiten wurden mit sechs Wochen und sechs Monaten gewählt. 13 Tiere wurden für die histologische Auswertung verwendet. Die verbliebenen Tiere wurden für die biomechanische Auswertung, die Bestandteil einer weiteren Dissertation ist, verwendet.

Gruppe	0	1	2
Anzahl der Tiere (n=)	8	7	6
Verwendung	Etablierung der Operationsme- thode	Histologie mit Standzeit sechs Wochen	Histologie mit Standzeit sechs Monate

Tab. 1 Gruppeneinteilung der Versuchstiere

3.1.2 Implantat

Die Transplantatentwicklung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Meike Haddad-Weber an der Universität Würzburg.

Das in dieser Studie verwendete Implantat wurde aus Kollagenfasern hergestellt. Dazu wurden Kollagenfasern aus Rattenschwänzen isoliert.

Die hierfür verwendeten Rattenschwänze stammten von Ratten, die in einer externen Firma (CHARLES RIVER WIGA GmbH, Kißleg, Deutschland) gezüchtet wurden. Nach Liefereingang wurden die Rattenschwänze in Chargen eingeteilt und dieses zur späteren Qualitätskontrolle dokumentiert. Pro Lieferung wurden 50 Rattenschwänze geliefert, die dann bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert wurden.

Für die nun folgende Isolierung des Kollagens wurden die tiefgefrorenen Rattenschwänze erst im Kühlschrank und dann in PBS (*Phosphate-buffered Saline*; Phosphatpufferlösung, Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) aufgetaut. Ohne vorherige Häutung des Rattenschwanzes wurde nun das Ende mit einer Arterienklemme abgeklemmt und so lange rotiert, bis sich die Kollagenfasern lösten und langsam herausgezogen werden konnten. Dieser Schritt wurde wiederholt und die einzelnen Knorpelspannen abgelöst. Die so entstandenen Kollagenfasern wurden nach Größe vorsortiert, das Restgewebe mit dem Skalpell abgetrennt und mit der Pinzette abgestreift. Es entstanden Fasern der Gruppen kurz (6 cm - 8 cm), mittel (8 cm - 10 cm) und lang (10 cm - 12 cm). Kollagenfasern, die sich nicht in diese Gruppen einsortieren ließen, wurden verworfen. Während der gesamten Isolierung wurde auf eine ausreichende Benetzung der Fasern mit PBS geachtet, da ein austrocknen der Fasern zu irreversiblen Schäden geführt hätte und sie somit unbrauchbar geworden wären.

Aus den gewonnenen Kollagenfasern wurde nun ein der Anatomie des Minipig angepasstes 4 mm dickes und 4 cm langes Implantat gefertigt. Dafür wurden die Kollagenfasern um eine extra gefertigte Halterung gewickelt. Zur Sterilisation wurden die Implantate anschließend einer Gamma-Sterilisation (BBF Sterilisationsservice GmbH, Kernen, Deutschland) unterzogen. Hierfür wurde eine Strahlendosis von über 25 kGy verwendet. Diese Sterilisationsmethode bietet sich bei Medizinprodukten mit hoher Dichte und Volumen an, da sie ein hohes Durchdringvermögen und eine hohe Dosis-homogenität besitzt. Durch die Sterilisation wurde die Qualität des Implantates in Hinblick auf Keimfreiheit gesichert. Um Immunreaktionen zu vermeiden, wurde die Bestrahlung mit Waschungen mit Ethanol und NaCl kombiniert und mehrfach wiederholt. So blieben keine zellulären Komponenten an der Faser, es entstand ein reiner Kollagenfaden. Dieses

Verfahren wurde bereits in Vorversuchen getestet und etabliert. Man geht davon aus, dass derart behandelte Implantate keinerlei Zellen mehr enthalten und lediglich Prionen diesem Vorgang standhalten würden.

3.2 Operatives Vorgehen

Die Operationen wurden von Dr. Lars Rackwitz und Meike Haddad-Weber an der Universität Würzburg durchgeführt.

3.2.1 Operationsvorbereitungen

Alle Tiere wurden mit 4 mg/kg Azaperon (Jansen GmbH, Neuss, Deutschland) sediert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit je 0,044 mg/kg Atropin (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) und 5,5 – 6 mg/kg Thiopental (Nycomed Deutschland GmbH, Deutschland) sowie mit 15 mg/kg Ketamin (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) intravenös. Alle Tiere wurden mit Hilfe eines Laryngoskops nach Foregger und einem Endotrachealtubus Größe 7,5 (Ruesch Care, Teleflex Medical GmbH, Kernen, Deutschland) intubiert. Die Narkose wurde aufrecht erhalten mit einem Gasgemisch mit 1,5 – 4 % MAC Isofluran® (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland), 1/3 Sauerstoff und 2/3 Stickstoff. Eine zusätzliche Analgesie erfolgte mit Fentanyl® (Fentanyl®, Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) im Bolus zu je 0,005 mg/kg bei Bedarf.

Während der Operation wurden alle Tiere mit Ringer - Lactat (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) mit 5 ml/kg/h intravenös infundiert. Die Narkoseüberwachung erfolgte mit einem Pulsoximeter, expiratorischer CO₂-Messung und EKG. Um die Kornea der Augen vor dem Austrocknen zu schützen, wurde eine Augensalbe (Bepanthen® Augensalbe, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen.

Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage gebracht und ausgebunden. Die Klaue der linken Hinterextremität wurde mit OP Tüchern steril abgedeckt und die Extremität bis zum Becken geschoren, gewaschen und desinfiziert (Desderman®N, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland).

3.2.2 Operationsmethode

Die Operation erfolgte unter sterilen Kautelen. Das Operationsfeld wurde steril abgedeckt. Als Spüllösung wurde NaCl 0,9 % (0,9%ige Kochsalzlösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland) benutzt.

Nun wurde das Kniegelenk der linken Hinterextremität arthrotomiert. Es erfolgte ein Hautschnitt an der Hinterextremität, medial der Patella, ca. 10 cm lang von proximal nach distal. Die nachfolgenden Gewebeschichten wurden unter Blutstillung bis zur Kniegelenkscapsel durchtrennt und die Kniegelenkscapsel geöffnet. Die Öffnung der Gelenkscapsel wurde so angelegt, dass sich die Patella anschließend nach lateral luxieren ließ. Der Hoffa-Fettkörper wurde dargestellt und anschließend reseziert. Nun wurde das Ligamentum cruciate craniale dargestellt und der intraartikuläre Teil des Ligamentum cruciate craniale sowohl tibial als auch femoral, knochennah mit dem Skalpell reseziert. Anschließend wurden die Insertionsstellen mit einem scharfen Löffel debridiert.

Danach wurden die Bohrkanäle angelegt. Tibial erfolgte die Bohrung mit dem Kirschner-Bohrdraht von distal, ca. 4 cm distal des Tibiaplateaus in Richtung des ursprünglichen tibialen Ansatzes des Ligamentum cruciate craniale. Die femorale Bohrung wurde mit einem Kirschner-Bohrdraht von intraartikulär, ausgehend vom ursprünglichen femoralen Ansatz des Ligamentum cruciate craniale in der Fossa intercondylaris, nach proximal, in Richtung Epicondylus lateralis vorgenommen. Beide Bohrkanäle wurden anschließend mit einem 4 mm Bohrer überbohrt und mit einem Längenmessgerät ausgemessen. Die Längen der tibialen Bohrkanäle betragen 20 - 28 mm. Femoral erreichten die Bohrkanäle Längen von 16 - 28 mm, wobei im Mittel 18 - 22 mm erreicht wurden. Die angelegten Bohrkanäle hatten zur tibialen bzw. femoralen Längsachse einen Winkel von ca. 20°.

Mit einem dreifachen *Surgical Loop* wurde an das Implantat ein *Suture Button* geknotet. Die Gesamtlänge wurde so bemessen, dass mindestens ein Zentimeter des Transplantates im Bohrkanal zu liegen kam. Das Kniegelenk wurde nun 20 - 30° gebeugt. Mit Hilfe des Führungsdrahtes und eines Ethibondfadens (Ethibond-Excel®, Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland), der durch den *Surgical Loop* geschlungen wurde, konnte das Transplantat von distal in den femoralen Bohrkanal eingezogen werden, bis sich der

Suture Button außerhalb des Bohrkanals flach an den Knochen legte. Tibial erfolgte das Einziehen des Implantats ebenfalls mit Hilfe des Kirschner Bohrdrahtes. Hier wurde der *Surgical Loop* außerhalb des Bohrkanals dreifach an den *Suture Button* geknotet.

Nun wurden Stabilität und Beweglichkeit geprüft und die Patella in ihre physiologische Lage gebracht. Nach erneuter Überprüfung der Stabilität wurde die Gelenkkapsel mit resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon Vicryl Plus 1, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Es folgte ein schichtweiser Wundverschluss von Muskeln und Unterhaut mit resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon Vicryl 2-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Haut wurde mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon Prolene 2-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

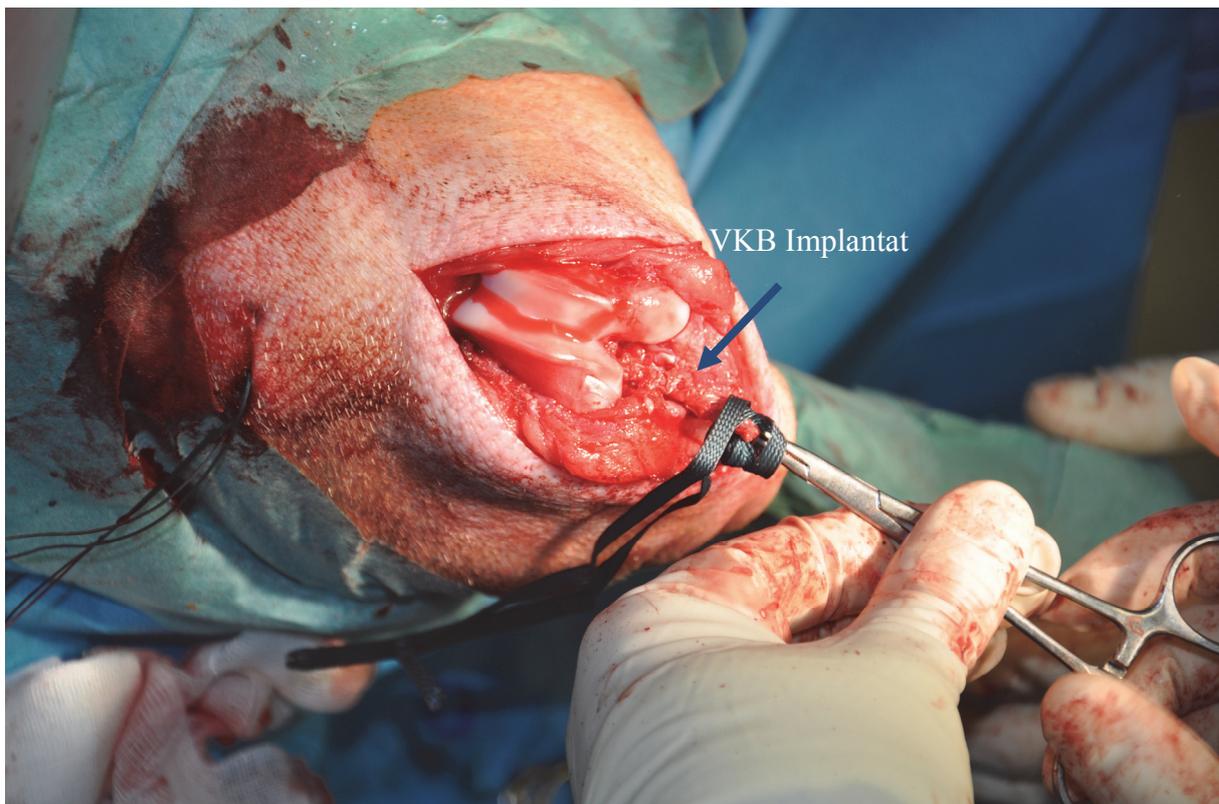


Abb. 1 Operationssitus. Implantat (VKB Implantat, blauer Pfeil).

Post operationem erfolgte eine Antibiose über drei Tage mit Penicillin (VETOQUINOL AG, Ittingen, Schweiz). Zur Analgesie wurden 0,005 – 0,01 mg/kg Burprenorphin (Rickett-

Benckiser, UK) für bis zu sieben Tage und 0,4 mg/kg Metacam (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Deutschland) für mindestens drei Tage verabreicht. Die Wunden wurden nochmals mit Braunol® (Braunol®2000, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und steril verbunden. Die Tiere wurden extubiert und in ihre Boxen gebracht. Jeden zweiten Tag wurde ein Verbandswechsel vorgenommen. Nach 10 - 14 Tagen wurden die Fäden der Hautnaht gezogen. Maßnahmen zur Entlastung der operierten Kniegelenke fanden nicht statt.

3.3 Probengewinnung

Nach sechs Wochen bzw. sechs Monaten Standzeit wurden die Tiere per Injektionsnarkose mit Stresnil 40mg/ml Injektionslösung für Schweine (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien) und Ursotamin Injektionslösung (Serumwerk Bernburg AG, Deutschland) sediert. Anschließend wurden sie mit T61 (Intervet International GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) euthanasiert.

Nach der Tötung der Tiere wurden jeweils beide Kniegelenke explantiert. Dazu wurden sie femoral und tibial ca. 10 cm proximal und distal des Kniegelenkes abgesetzt.

Der jeweils frei bewegliche Anteil der Kreuzbandimplantate sowie des vorderen Kreuzbandes der kontralateralen Seite wurden aus dem Kniegelenk explantiert, die Ansätze aber geschont und belassen.

3.4 Anfertigung der histologischen Präparate

3.4.1 Fixierung der Proben

Die Knochen wurden zur Fixierung für sieben Tage in eine formaldehydhaltige Lösung eingelegt.

Fixierlösung:

124 ml	Formaldehyd 36 % (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
540 ml	Ethanol 100 % (Ethanol 100 % Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)

130 ml	Barbital-Natrium-Puffer pH 7,4 / 0,1 molar (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)
6 g	Glukose (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)

Die entnommenen Implantate sowie die vorderen Kreuzbänder der kontralateralen Seite wurden auf Korkscheiben aufgespannt und ebenfalls in eine Fixierlösung gegeben.

Die so fixierten Proben wurden nun dem Julius Wolff Institut der Charité Berlin übergeben. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die weitere Probenaufarbeitung und die histologische Auswertung vorgenommen. Die Betreuung wurde von Dr. med. vet. Hanna Schell sowie mehrere medizinisch - technische Assistenten des Institutes übernommen.

3.4.2 Sägen der Knochenscheiben

Nach ausreichender Fixierung nach sieben Tagen wurde der Femur aus der Fixierlösung entnommen und für die folgenden Sägearbeiten vorbereitet. Dazu wurde der Femur ca. 20 - 30 Minuten gewässert.

An den fixierten distalen Femurkondylen wurden die Ein- und Austrittsstellen der Bohrkanaäle aufgesucht und so die Lage des Transplantates in den Bohrkanaelen ermittelt.

Die Femura wurden in das Makro-Trennschleifsystem (EXAKT-Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit Hilfe eines Schraubstockaufsatzes fest eingespannt. Die Sägeebene wurde parallel zum vorher bestimmten Bohrkanal ausgerichtet. Es wurden jeweils zwei oder drei, 3 - 4 mm dicke Knochenscheiben abgetragen, so dass der Bohrkanal sichtbar war. Der Verlauf der Sägeebenen und die Anzahl der erhaltenen Knochenscheiben wurden in einem Sägeprotokoll dokumentiert. Alle Knochenscheiben wurden mit der Schnittfläche nach unten in ein Fixiergitter (Tissue Tek III, Miles Limited, Slough, England) gelegt. Sie wurden mit Tiernummer, Datum und Schnittebene beschriftet. Es wurden zwei Gruppen erstellt. Die jeweils mediale Knochenscheibe wurde für die Paraffineinbettung verwendet und die laterale Knochenscheibe für die Kunststoffeinbettung.

3.4.3 Paraffinschnitte

Paraffineinbettung der Implantate

Die entnommenen Implantate sowie die entnommenen kontralateralen vorderen Kreuzbänder wurden nach Fixierung gewässert und für die Paraffineinbettung vorbereitet.

Das durchgeführte Entwässerungsprotokoll ist im Anhang, im Verzeichnis der Entwässerungs- und Färbeprotokolle aufgeführt.

Anschließend wurden die Proben von den Korkscheiben entfernt und die tibiale und femorale Seite mit verschiedenen farbigen Fäden markiert.

Nach erfolgter Entkalkung durch die EDTA Lösung (EDTA Entkalkungslösung für technische Zwecke, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) und anschließender Entwässerung wurden die Präparate in Paraffin (Paraplast Plus®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA) mit Hilfe eines Paraffintanks (Leica EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch; Deutschland) und der entsprechenden Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet. Die einzelnen Paraffinblöcke wurden in das Mikrotom (Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingespannt und ausgerichtet. Die 4 µm dicken Schnitte wurden solange verworfen, bis eine Schnittebene erreicht war, in der das gesamte Präparat in der Längsebene gleichmäßig angeschnitten war. Die nun angefertigten Längsschnitte wurden auf silanisierte Adhäsionsobjektträger (HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen.

Paraffineinbettung der medialen Knochenscheiben

Die jeweils medialen Knochenscheiben wurden zur weiteren Paraffineinbettung in EDTA gegeben und bei 37 °C im Wärmeschrank (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) aufbewahrt. Die EDTA Lösung wurde zweimal in der Woche gewechselt, für insgesamt sieben Wochen. Anschließend erfolgte eine Entwässerung über 72 Stunden im Entwässerungsautomaten (TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Das Entwässerungsprotokoll ist im Anhang, im Verzeichnis der verwendeten Entwässerungs- und Färbeprotokolle aufgeführt.

Nach erfolgter Entkalkung und Entwässerung wurden die Knochenscheiben in Paraffin (Paraplast Plus®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA) mit Hilfe eines Paraffintanks (Leica EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) und der entsprechenden Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch; Deutschland) eingebettet. Die einzelnen Paraffinblöcke wurden in das Mikrotom (Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingespannt und ausgerichtet. Die 4 µm dicken Schnitte wurden solange verworfen, bis eine Schnittebene erreicht war, in der das gesamte Präparat in der Längsebene gleichmäßig angeschnitten war. Die nun angefertigten Längsschnitte wurden auf silanisierte Adhäsionsobjektträger (HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen.

3.4.4 Kunststoffschnitte

Kunststoffeinbettung der lateralen Knochenscheiben

In Vorbereitung auf die Kunststoffeinbettung durchliefen die medialen Knochenscheiben eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung. Das Entwässerungsprotokoll ist im Anhang im Verzeichnis der verwendeten Entwässerungs- und Färbeprotokolle aufgeführt. Die unentkalkten medialen Knochenscheiben wurden in eine Kunststofflösung aus Technovit 9100® (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Nach dem Auswaschen in Xylol (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, The Netherlands) wurden sie in eine Präinfiltrationslösung gegeben. Diese bestand aus 200 ml entstabilisierter Technovit 9100 Basislösung und 1 g „Härter 1“. Diese Präinfiltration erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend folgte die Infiltration. Dafür wurde Infiltrationslösung aus entstabilisierter Basislösung und 20 g Pulver 2 und 1 g „Härter 1“ hergestellt, wobei zuerst das Pulver in der Basislösung vollständig gelöst werden musste. Nun wurden die Knochenscheiben zwei mal für jeweils sieben Tage in 250 ml Technovit Infiltrationslösung gelegt und im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C infiltriert.

Für die Einbettung wurde ein Polymerisationsgemisch aus neun Volumenanteilen Stammlösung A und einem Volumenanteil Stammlösung B hergestellt. Für die Stammlösung A

wurden 80 g Pulver 2 in entstabilisierter Basislösung, auf einem Magnetrühr Tisch, bei Raumtemperatur, vollständig gelöst. Danach wurden 3 g „Härter 1“ hinzugefügt. Es entstanden 500 ml Lösungsmenge. Für die Stammlösung B wurden 44 ml entstabilisierte Basislösung mit 4 ml „Härter 2“ und 2 ml „Regler 5“ gemischt. Die Knochenscheiben wurden mit der Schnittfläche nach unten in die Formen gelegt, beschriftet und mit dem hergestellten Polymerisationsgemisch eingebettet. Die Formen wurden luftdicht verschlossen und zum Auspolymerisieren auf 0 – 6 °C gekühlt. Nach dem Aushärten wurden die Kunststoffblöcke aus den Formen gelöst und beschriftet.

Anfertigung der Kunststoffschnitte

Die Anfertigung von Kunststoffschnitten aus unentkalktem Knochen ermöglichte die Darstellung von Knochengewebe, Mineralisationsfronten und mineralisierten Strukturen. Die fertigen Kunststoffblöcke wurden mit einem Hartschnittmikrotom (Leica GmbH, Bensheim, Deutschland) weiter bearbeitet. Dazu wurden die Kunststoffblöcke parallel zur Schnittfläche in das Mikrotom eingespannt und mit einem Hubvorschub von 10 µm geschnitten, bis die erwünschte Schnittebene erreicht war. Die gewünschte Schnittebene war erreicht, wenn das gesamte Präparat gleichmäßig in der Längsebene angeschnitten war. Nun wurden 6 µm dicke Dünnschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger (Marienfeld, Laboratory Glassware, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland) aufgezogen. Während des Schneidens wurden Block und Messer mit Schneideflüssigkeit benetzt. Um Faltenbildung zu verhindern, wurde der Schnitt mit Streckflüssigkeit, bestehend aus 30 ml Butoxyethyl-Acetat (MERCK Schurchar, Hohenbrunn, Deutschland) und 70 ml 70%igem Alkohol benetzt und mit einem feinen Pinsel vorsichtig gestreckt. Abgedeckt mit Kisolfolie (MDS GmbH, Buseck, Deutschland) und Filterpapier wurden die Schnitte in eine Schnittpresse gegeben und im Wärmeschrank bei 36 °C für zwei Tage getrocknet.

3.4.5 Färben der Schnittpräparate

Für die histologische Auswertung mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurden Färbungen angefertigt, die unterschiedliche Gewebestrukturen hervorheben.

Es wurden eine HE-Färbung, eine Trichromfärbung nach Masson Goldner und eine Movat Pentachromfärbung angefertigt. Die ausführlichen Färbeprotokolle sind im Anhang, im Verzeichnis der angewendeten Entwässerungs- und Färbeprotokolle nachzulesen.

Anschließend wurden die gefärbten Präparate mit Vitro-Clud® (Vitro-Clud® Einschlussmittel für die mikroskopische Technik, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) und Deckgläsern (Menzel Gläser, Deutschland) eingedeckt.

In der Masson Goldner Trichromfärbung stellten sich Zellkerne schwarz, Zytoplasma ziegelrot, Erythrozyten orange-gelb, Bindegewebe und saure Mucossubstanzen grün und Osteoid rot dar. Diese Färbung war daher besonders gut geeignet zur Darstellung von Bindegeweben.

Als Übersichtsfärbung wurde eine HE-Färbung vorgenommen. In der HE-Färbung waren Zellkerne und saure Mucosa blau, alles weitere war rot.

In der Movat Pentachromfärbung stellten sich mineralisierter Knochen und Kollagen leuchtend gelb, mineralisierter Knorpel blau-grün, Knorpel dunkelrot, elastische Fasern rot, Zellkerne blauschwarz, Zytoplasma rötlich und saure Glucosaminoglykane leuchtend hellblau dar. Diese Färbung wurde angefertigt, um Knorpel und Kollagen wie es z. B. am Bandansatz vorkommt zu beurteilen.

3.5 Grundlagen der Immunhistochemie

In der Immunhistochemie wird die Antigen-Antikörperreaktion genutzt. So können bestimmte Strukturen, die als Antigen fungieren, mit Antikörpern markiert werden bzw. durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen und an den Antikörper gekoppelte Farbstoffe sichtbar gemacht werden.

In der Immunhistochemie wird hauptsächlich mit den Antikörpern IgG und IgM gearbeitet. Dafür müssen spezifische, auf das zu detektierende Epitop ausgerichtete, Antikörper

hergestellt werden. Man unterscheidet hierbei monoklonale und polyklonale Antikörper. Erzeugt werden sie in Spendertieren, die mit einem Antigen immunisiert werden.

Polyklonale Antikörper sind Antikörper, die von vielen verschiedenen Antikörper produzierenden Zellen erzeugt werden. Jeder Zelltyp produziert einen Antikörper, der nur an ein bestimmtes Epitop des Antigens bindet. Polyklonale Antikörper sind also immunchemisch verschiedene Antikörper, die verschiedene Epitope des Antigens erkennen und daran binden.

Monoklonale Antikörper hingegen sind das Produkt eines einzelnen Klons von Plasmazellen. Sie sind also immunchemisch identisch und reagieren nur mit dem einen Epitop des Antigens, gegen welches sie gerichtet sind. Im Spendertier wird hierdurch eine antigenspezifische Immunantwort induziert. Aus den Lymphknoten und der Milz werden B-Lymphozyten gewonnen und mit Myelomzellen fusioniert (Hybridisierung). Diese antikörperbildenden Hybridome werden dann selektiert und im Kulturmedium klonal vermehrt. Anschließend können die monoklonalen Antikörper gewonnen werden.

3.5.1 Die FVIIIrA Färbung

Die FVIIIrA Färbung war geeignet um Gefäße in Bandmaterial darzustellen, sie gab somit Aufschluss über die Revaskularisierung. Bei dieser immunhistochemischen Färbung wurde das in den Endothelzellen kleinster Kapillaren vorkommende Faktor-VIII Trägerprotein (*Faktor-VIII-related Antigen*, FVIIIrA) des Von Willebrand Faktors, mittels Markierung durch polyklonale Antikörper angefärbt. Dafür war das Vorhandensein glatter Muskelzellen nicht nötig. Sie stellt damit besonders zur Darstellung der frühen, auf kapillarer Ebene ablaufenden Revaskularisierung die Methode der Wahl dar (UNTERHAUSER et al. 2003).

Für diese Färbung wurden die Präparate für zwei mal zehn Minuten in Xylool (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, The Netherlands) entparaffiniert. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe bis 70 % (Ethanol 100Vol.-%, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) und anschließend Aqua dest. für je zwei Minuten.

Die Präparate wurden dann in 100 ml PBS (*phosphate-buffered Saline*; Phosphatpufferlösung) pH 7,2 – 7,4 (CHROMA, Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) gemischt mit 900 ml Aqua dest. gegeben. Nach fünf Minuten wurde der Vorgang mit frischer Phosphatpufferlösung für nochmals fünf Minuten wiederholt.

Nach Abklopfen der überschüssigen Pufferlösung, Umrandung der Präparate mit einem Fettstift (PAP PEN, G. Kisker, Produkte für die Biotechnologie, Steinfurt, Deutschland) und Lagerung in einer Feuchtkammer wurde eine Pepsinlösung aufgetragen.

Durch die vorherige Fixierung der Proben in Formalin und die spätere Einbettung in Paraffin, kam es durch Denaturierung zur Ausbildung von Methylbrücken, welche Gewebsantigene maskierten, und so einen Nachweis mit einem Primärantikörper verhinderten. Zum enzymatischen Aufbruch dieser Methylbrücken und somit zum Freilegen der Antigen determinanten wurde Pepsin 0,1 % (Pepsin, SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gelöst in 0,01 N HCL (HCL Salzsäure 1 N, F. MERCK, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 3 ml N HCL mit 297 ml Aqua dest. gemischt. Es entstand eine 0,01 N HCL Lösung. Nun wurden 300 mg Pepsin in 300 ml 0,01 N HCL gelöst, so dass eine 0,1%ige Pepsinlösung entstand.

Auf alle Präparate wurden je 400 µl Pepsinlösung aufgetragen, und die Präparate in der Feuchtkammer für 30 Minuten bei 36 °C in den Wärmeschrank (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) gestellt. Anschließend wurden sie erneut für zwei mal fünf Minuten in PBS gegeben.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde nun das Normalserum gelöst in PBS aufgetragen. Dafür wurde Normalserum Ziege (Normal Goat Serum, S-100, VECTOR Laboratories, Inc., Burlingame, CA) verwendet, wovon 80 µl in 3920 µl PBS gelöst und gemischt (Vortex Assistent WMZ, Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland) wurden. Je 400 µl dieser Lösung wurden auf jedes Präparat aufgetragen und diese dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer gelagert.

Anschließend wurden auf jedes Präparat je 300 µl der primären Antikörperlösung aufgetragen. Als primären Antikörper wurde ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen

(Faktor VIII rabbit polyclonal, BIOCARE, Deutschland) verwendet. Von diesem wurden 4 µl in 3960 µl einer Antikörperlösung (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako, Deutschland) gegeben und vermischt. So ergab sich eine Verdünnung von 1:100. Diese Antikörperlösung blieb über Nacht auf den Präparaten bei 4 °C in der Feuchtkammer.

Am nächsten Morgen wurde die überschüssige Lösung vorsichtig abgeklopft und die Präparate für jeweils zwei mal fünf Minuten in PBS gegeben. Nun wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen. Hier wurde ein Anti Kaninchen Antikörper, hergestellt in der Ziege (Biotinylated Anti-Rabbit IgG Affinity purified made in goat, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) verwendet. 80 µl dieses sekundären Antikörpers wurden mit 80 µl Normalserum und 3840 µl PBS gemischt. Von diesem Gemisch wurden je 300 µl auf die Präparate aufgetragen. Bei Raumtemperatur blieb die Lösung für 30 Minuten auf den Präparaten in der Feuchtkammer.

Nach dem Abklopfen wurde nochmals für zwei mal fünf Minuten in PBS gespült. Nun wurde bei Raumtemperatur der AB Komplex aufgetragen. Dieser war Bestandteil des VECTASTAIN ABC KIT (Alkaline Phosphatase Universal, AK, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland). Hierfür wurden 5 ml PBS mit einem Tropfen, der ca. 5 µl entsprach, Reagenz A und einem Tropfen Reagenz B gemischt. Von diesem Gemisch wurden je 300 µl auf die Präparate in der Feuchtkammer aufgetragen und für 50 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach nochmaligem Spülen in PBS für zwei mal fünf Minuten, wurde Chromogenpuffer für zwei mal fünf Minuten aufgetragen. Dieser Chromogenpuffer hatte einen pH von 8,2 und setzte sich aus 3,96 g Sigma HCL T325, 0,54 g Sigma T 1503 (SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 2,63 g NaCl (MERCK 6404, F. Merck, Darmstadt, Deutschland) und 300 ml Aqua dest zusammen. Nun wurde ein alkalisches Phosphatase Substrat (Substrat KIT, Alkaline Phosphatase Substrate KIT 1, SK-5100, VECTOR, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) aufgetragen. Die alkalische Phosphatase katalysierte die Substratreaktion, durch die Chromogen in ein gefärbtes Endprodukt umgewandelt wurde. Hierfür wurden 5 ml Chromogenpuffer mit jeweils 2 Tropfen der Lösungen 1 - 3 des

Substratkits gut vermischt. Danach wurden die Präparate für eine Minute in PBS, dann eine Minute in Aqua dest. gespült. Nun folgte eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (Färbeprotokoll im Anhang, im Verzeichnis der verwendeten Entwässerungs- und Färbeprotokolle).

Abschließend wurden die Präparate mit Aquatex (Aquatex, wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie, MERCK K Graff, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

In dieser immunhistochemischen Färbung FVIIIrA stellte sich das Zytoplasma der Endothelzellen leuchtend pink dar. Durch die Kerngegenfärbung waren Zellkerne dunkelblau, das restliche Gewebe war zart violett.

3.5.2 Kollagen I Färbung

Zum Nachweis kollagener Fasern wurde eine immunhistochemische Reaktion der Kollagen I Fasern genutzt. Diese Färbung wurde einmal mit polyklonalen spezifisch gegen Schweinekollagen gerichteten Antikörpern und einmal mit polyklonalen spezifisch gegen Rattenkollagen gerichteten Antikörpern angefertigt.

Kollagen I Färbung mit polyklonalen spezifisch gegen Schweinekollagen gerichteten Antikörpern

Hierfür wurden Paraffinschnitte zwei mal zehn Minuten in Xylol (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, The Netherlands) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 bis 70 % (Ethanol 100Vol.-%, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) für je zwei Minuten entwässert. Nach dem Spülen in Aqua dest. wurden sie für fünf Minuten in PBS (*phosphate-buffered Saline*; Phosphatpufferlösung) pH 7,2 – 7,4 (CHROMA Phosphatpufferkonzentration, CHROMA, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) 1:10 mit Aqua dest. gegeben. Die Präparate wurden mit einem Fettstift (PAP PEN, G. Kisker, Produkte für die Biotechnologie, Steinfurt, Deutschland) umrandet und in die Feuchtkammer gegeben. Hyaluronidase (Hyaluronidase from sheep testes powder Type II, lyophilied, H2126, SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde in PBS gelöst, bis eine 0,2%ige Lösung entstand.

Von dieser 0,2%igen Hyaluronidaselösung wurden nun je 250 µl auf jedes Präparat pipettiert und die Präparate in der Feuchtkammer liegend anschließend für 15 Minuten bei 37 °C in den Wärmeschrank gegeben. Nach 15 Minuten folgte zweimaliges Spülen in PBS für je fünf Minuten. Das verwendete Normalserum Ziege (Normal Goat Serum, S-100, VECTOR Laboratories, Inc., Burlingame, CA) wurde in PBS zu einer 5%igen Lösung vorbereitet. Dazu wurden 250 µl Normalserum Ziege in 4750 µl PBS gelöst und im Vortex (Vortex Assistent WMZ, Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland) gemischt. Je Präparat wurden ca. 250 µl aufgetragen und bei Raumtemperatur 30 Minuten in der Feuchtkammer belassen. Nach 30 Minuten wurde der Überstand abgeklopft und der primäre Antikörper aufgetragen. Es wurde ein im Kaninchen hergestellter polyklonaler Schweineantikörper (Collagen I porcine, made in rabbit, BP800 7S, ACRIS, Aachen, Deutschland) verwendet. Er wurde in Diluent (Antibody Diluent with Background Reducing Components, DAKO, Deutschland) gelöst, so dass eine Verdünnung von 1:100 entstand. Auf jedes Präparat wurden wieder ca. 250 µl aufgetragen und die Präparate über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Morgen wurden die Präparate nach abklopfen des Überstandes für zwei mal fünf Minuten in PBS gegeben. Der biotinylierte Zweitantikörper (Biotinylated IgG Anti-Rabbit, made in goat, VECTOR Laboratories, Inc., Burlingame, CA) wurde in einer Verdünnung von 1:150 zusammen mit dem Normalserum Ziege 2%ig in PBS gelöst. Auf jedes Präparat wurden von dieser Lösung ca. 250 µl aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Es folgte Spülen für zwei mal fünf Minuten in PBS. Der AB-Komplex wurde in einer Verdünnung von 1:100 angesetzt. Dieser ist Bestandteil des VECTASTAIN ABC KIT (Alkaline Phosphatase Universal, AK, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland). Dafür wurden 5 ml PBS mit 5 µl Reagenz A und 5 µl Reagenz B gemischt. Diese Mischung wurde auf alle Präparate aufgetragen und für 50 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Es folgte wieder zwei mal fünf Minuten PBS. Anschließend wurde ein Chromogenpuffer für zwei mal fünf Minuten aufgetragen. Dieser Chromogenpuffer hatte einen pH von 8,2 und setzte sich aus 3,96 g Sigma HCL T325, 0,54 g Sigma T 1503 (SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 2,63 g

NaCl (MERCK 6404, F. Merck, Darmstadt, Deutschland) und 300 ml Aqua dest. zusammen. Nun wurde eine Lösung mit dem Alkaline Phosphatase Standart Substrat Kit (Alkaline Phosphatase Standart Kit, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) angefertigt. Diese Lösung setzte sich aus 5 ml Chromogenpuffer, 2 Tropfen Lösung 1, 2 Tropfen Lösung 2 und 2 Tropfen Lösung 3 zusammen, die gut durchmischt und lichtdicht abgefüllt wurden. Diese Lösung wurde nun auf alle Präparate aufpipettiert und unter mikroskopischer Kontrolle einwirken lassen. Die alkalische Phosphatase katalysierte die Substratreaktion, durch die Chromogen in ein gefärbtes Endprodukt umgewandelt wurde. Wenn das gewünschte Färbeergebnis erreicht war, wurde die Reaktion in PBS abgebremst. Nach dem Spülen in Aqua dest. folgte eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer (Färbeprotokoll im Anhang, Verzeichnis der verwendeten Entwässerungs- und Färbeprotokolle) und das Eindeckeln der Präparate mit Aquatex (Aquatex, wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie, MERCK K Graff, Darmstadt, Deutschland).

Kollagen I Färbung mit polyklonalen spezifisch gegen Rattenkollagen gerichteten Antikörpern

Die Durchführung dieser immunhistochemischen Reaktion entsprach der o. g. Färbung mit polyklonalen spezifisch gegen Schweinekollagen gerichteten Antikörpern, lediglich die Einwirkzeit der 0,2%igen Hyaluronidase war mit 30 Minuten bei Raumtemperatur deutlich länger und die Verdünnung des primären Antikörpers (Collagen I rat, polyclonal made in rabbit, Quartett, Berlin, Deutschland) betrug 1:50.

Durch diese Reaktion stellten sich Kollagen Typ I Fasern rosa dar. Der Hintergrund war blasslila und Zellkerne waren dunkelblau.

Alle im Anhang aufgeführten Entwässerungs- und Färbeprotokolle sind im Anhang aufgeführt. Sie wurden von den Mitarbeitern der Labore der Charité in Anlehnung an Romeis, B. „Mikroskopische Technik“ (1989) etabliert und sind bewährte Hausprotokolle.

3.6 Deskriptive histologische Auswertung

Die Einarbeitung und Betreuung bei der deskriptiven histologischen Auswertung erfolgte in erster Linie durch Dr. med. vet. Hanna Schell, Projektleiterin, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Julius-Wolff-Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration, Charité Berlin.

3.6.1 Durchlichtmikroskopie

Für die histologische Auswertung der gefärbten Dünnschnittpräparate wurde ein Mikroskop (Axioskop 40, Zeiss) mit 1,25-, 2,5-, 5-, 10-, 20- und 40iger Objektiven benutzt. Fotos wurden mit der Axio Cam MRC5 (Zeiss) am Mikroskop mit Hilfe des Programms Axio Vision (Axio Vision Release 4.8 Leadtools® for Win32-Version 15.0) erstellt. Die oben genannten Färbungen wurden angewandt, um verschiedene Gewebe darzustellen und auszuwerten. Die HE-Färbung wurde als Übersichtsfärbung benutzt. Die Masson Goldner Trichrom Färbung wurde zur Zelldifferenzierung, zur Beurteilung von Umbauvorgängen am Knochen und zur Beurteilung des Transplantates hinsichtlich Zellularität, Nekrosen und Rundzellinfiltrationen genutzt. In der Movat Pentachrom Färbung wurden die Art der Bandinsertion, chondroide Zellen und Mineralisationsfronten dargestellt und beurteilt.

Die FVIIIrA Färbung wurde genutzt zur Darstellung von Endothelzellen im Transplantat, zur Beurteilung der Vaskularisierung und Neovaskularisierung des Transplantates sowie zur quantitativen Auswertung der Anzahl der Gefäßanschnitte.

Die Kollagen I Färbungen mit polyklonalen spezifisch gegen Ratten- und Schweinekollagen gerichteten Antikörpern wurden zur Beurteilung des *Bandremodelings* und der Implantatintegration herangezogen.

3.7 Quantifizierung der Gefäße

Die quantitative Auswertung der Vaskularisation bzw. Neovaskularisation der Implantate wurde in der immunhistochemischen FVIIIrA Färbung vorgenommen.

Am Durchlichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss) wurden mit einer Mikroskopkamera (Axio Cam MRC 5, Zeiss) und der dazugehörigen *Software* (Axio Vision Release 4.8 Leadtools® for Win32-Version 15.0) Mosaikaufnahmen aller Präparate in der 20er Vergrößerung aufgenommen. Der dafür ausgewählte Bereich im einzelnen Präparat wurde möglichst zentral, in allen Präparaten gleich groß und so gewählt, dass möglichst wenig Hintergrund auf den Aufnahmen war. Für diese Aufnahmen wurde nun mit Hilfe des Computerprogrammes Image J (Image J 1.46) ein definiertes Gesichtsfeld, eine *region of interest (ROI)* festgelegt. Anschließend wurde diese *ROI* so oft wie möglich in die einzelnen Aufnahmen gelegt. Dabei wurde auf eine gleichmäßige, mäanderförmige Verteilung auf dem gesamten Präparat geachtet. In jedem Einzelpräparat konnten so zwischen 15 und 25 *ROI* gelegt werden. Nun wurden in jeder einzelnen *ROI* die Gefäßanschnitte markiert und mit Hilfe eines *Cellcounter* (Image J 1.46n) gezählt. Es wurde darauf geachtet, dass nur Gefäßanschnitte mit erkennbarem Lumen und deutlicher Färbung gezählt wurden. Mehrfache Längsanschnitte eines Gefäßes wurden nur einmal gezählt, ebenso Gefäßanschnitte, die sich über mehrere *ROI* erstreckten.

3.8 Score

Ziel einer jeden Kreuzbandrekonstruktion ist ein dem nativen VKB möglichst ähnliches Ergebnis. Nach einer Kreuzbandrekonstruktion kommt es zu einer Integration des Transplantates bzw. Implantates. Weiler et al. (2002) konnten in ihrer Arbeit eine direkte Bandinsertion des Transplantates nachweisen. Zur Beurteilung des Reifegrades dieser Bandinsertion entwickelte die Arbeitsgruppe um Unterhauser 2006 einen *Score*, welchen sie im selben Jahr auf einem Kongress in Innsbruck vorstellten. Schlichting (2008) beschrieb und verwendete diesen *Score* in ihrer Dissertation. Mit Hilfe dieses *Scores* wird die Bandinsertion anhand ihres histologischen Erscheinungsbildes in die Grade 0 - 4 eingeteilt (Tab. 2) (SCHLICHTING 2008). Die Ausbildung eines direkten Bandansatzes wurde an der Gelenkfläche und mit Hilfe des o. g. *Scores* beurteilt.

Klassifikation	Beschreibung
0	Keine Anzeichen einer direkten Bandinsertion
1	Frühe direkte Bandinsertion, unverkalkte chondroide Zellen
2	Frühe direkte Bandinsertion, verkalkte chondroide Zellen
3	Reifende direkte Bandinsertion mit teilweise vier Zonenaufbau aus Band, Faserknorpel, Kalkknorpel und Knochen
4	Reife direkte Bandinsertion mit vier Zonenaufbau

Tab. 2 Score zur Beurteilung einer entstehenden direkten Bandinsertion nach Unterhauser et al. (2006) (SCHLICHTING 2008)

3.9 Statistische Auswertung

Lediglich für die quantitative Auswertung der Gefäßanschnitte in der FVIIIrA Färbung wurde eine statistische Auswertung vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 20 (SPSS Inc.). Eine Normalverteilung der Daten wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests sowohl für die Sechswochengruppe ($p=0,246$) als auch für die Sechsmonatsgruppe ($p=0,816$) überprüft und nachgewiesen. Da die Daten normalverteilt waren, sowohl für die einzelnen Gesichtsfelder, als auch für den Mittelwert, wurden parametrische Testverfahren verwendet. Die Mittelwerte der Gruppen wurden verglichen mittels Shapiro-Wilk-Test und T-Test. Der ungepaarte T-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen, allerdings einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der nativen Vergleichsgruppe.

Die errechneten Werte sowie eine graphische Darstellung sind dem Ergebnisteil angefügt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Histologische Ergebnisse

Die Auswertung der histologischen Ergebnisse erfolgte in erster Linie deskriptiv. Lediglich die Auszählung der Gefäßanschnitte in der FVIIIrA Färbung wurde semiquantitativ vorgenommen.

4.1.1 Ergebnisse der Sechswochengruppe

Bandpräparate

In allen sieben Präparaten dieser Gruppe war das Implantat deutlich erkennbar, vollständig erhalten und revitalisiert (Abb. 2). Zentral bestand es überwiegend aus langgestreckten, reifen Fibrozyten mit spindelförmigen Zellkernen in gleichmäßiger Längsausrichtung. Diese zentralen Bereiche waren sonst hypozellulär (Abb. 3). Ausgehend von intermediär nach peripher wurden die Zellkerne der Fibrozyten ovoid bis rund und ihre Anzahl war erhöht, Fibroblasten waren erkennbar.

In den peripheren Bereichen waren alle sieben Transplantate von lockerem, hyperzellulärem Bindegewebe umgeben. Es fanden sich hauptsächlich unreife Fibrozyten mit runden Zellkernen. Eine klare Faserausrichtung war nicht erkennbar (Abb. 4). Dieses lockere Bindegewebe war von zahlreichen Blutgefäßen und bei drei der sieben Präparate vereinzelt auch von Granulozyten durchsetzt. Ausgehend von diesem lockeren Bindegewebe der peripheren Bereiche zogen vereinzelt bindegewebige Stränge in die intermediären Bereiche, sie führten Blutgefäße mit. Der Übergang zwischen dem straffen Bindegewebe und dem lockeren Bindegewebe war fließend aber klar erkennbar (Abb. 5). Zusätzlich wurde das lockere Bindegewebe von einer dünnen zwei- bis achtlagigen Zellschicht umgeben, die einer synovialen Deckschicht entsprach (Abb. 6). Diese Zellschicht war in sechs von sieben Präparaten ausgebildet. Anzeichen für Immunzellinfiltrationen wurden nicht gefunden.

Femorale Präparate

Der intraossäre Anteil des Transplantates lag im Bohrkanal, begrenzt durch Knochengewebe des Os femoris.

Folgender allgemeiner Aufbau des Bohrkanals stellte sich in allen sieben Präparaten dar: die Wände des Bohrkanals bestanden aus z. T. neu gebildetem Geflechtknochen. Ihm schlossen sich Osteoidsäume, z. T. ausgeprägte Osteoidsäume, mit rundkernigen Osteoblasten an. Aus dem Geflechtknochen zogen Sharpey'sche Fasern, durch die sich anschließende bindegewebige Zwischenschicht (*fibrous interzone*, FIZ) in die Tunnelmitte zu den Kollagenfasern des Implantates (Abb. 7). Die Kollagenfasern des Implantates waren längs, in Richtung Tunnelausgang ausgerichtet, parallel zur Zugrichtung des Implantates.

Die FIZ war in allen sieben Präparaten zwischen den Bohrkanalwänden und dem Implantat unterschiedlich stark ausgebildet. Am stärksten ausgebildet war sie am Grund des Bohrkanals, dem Tunnelboden. Diese bindegewebige Zwischenschicht bestand auch hier aus ungerichteten, lockerem Bindegewebe mit Fibroblasten, vereinzelt Erythrozyten, Riesenzellen und kollagenen Fasern. Am Tunnelboden war sie hyperzellulär. Die Zellen waren in zwei der sieben Präparate in Nestern angeordnet. Die Zellkerne waren rund (Abb. 8).

Sharpey'sche Fasern konnten in fast allen Bereichen gesehen werden. Ihre Ausrichtung war je nach Lokalisation senkrecht zum Implantat oder in dessen Zugrichtung.

Anzeichen einer lokalen Entzündungsreaktion wurden nur in einem der sieben Präparate, in der Nähe von Resten des zur Fixierung des Implantates genutzten Nahtmaterials gefunden.

Bandinsertion

Bei den Sechswochentieren war in keinem der sieben Präparate eine reife, direkte Bandinsertion ausgebildet. Aber in allen sieben Präparaten waren Anzeichen für den Beginn einer direkten Bandinsertion erkennbar.

In Anlehnung an den im Kapitel Material und Methoden beschriebenen *Score* von Unterhauser et al. (2006) (SCHLICHTING 2008), wurden die Präparate dieser Gruppe von 1 - 3 klassifiziert. In der Sechswochengruppe gab es vier Präparate, die der Klasse 1 zugeordnet wurden. Hier waren in der Region der Bandinsertion chondroide Zellen nachweisbar (Abb.9). Zwei Präparate wurden in die Klasse 2 eingeteilt. Die chondroiden Zellen in diesen Präparaten waren bereits z. T. kalzifiziert (Abb. 10, 11 und 12). Ein Präparat entsprach der Klasse 3. Hier war an verschiedenen Stellen ein vier Zonenaufbau nachweisbar (Abb. 13 und 14).

Eine Tabelle mit allen Werten der einzelnen Präparate ist am Ende dieses Kapitels angefügt.

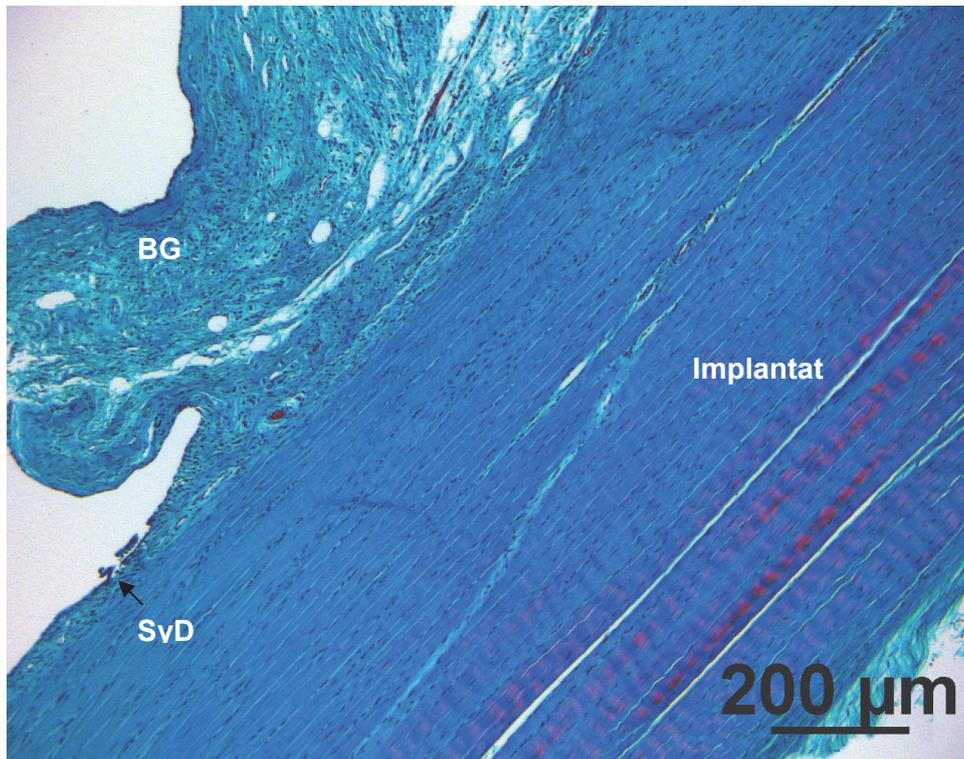


Abb. 2 Implantat 6 Wochen post Op. Das vollständig erhaltene und vital erscheinende Implantat mit anhängendem Bindegewebe (BG) und synovialer Deckschicht (SyD). Minipig 210i, Masson Goldner Färbung

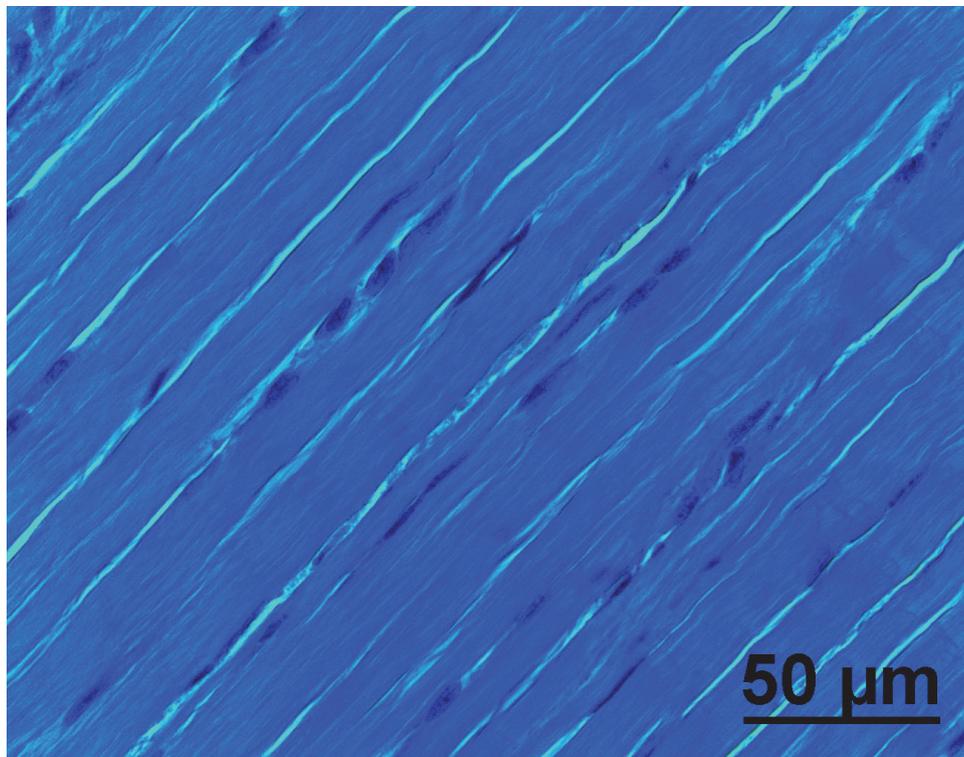


Abb. 3 Implantat 6 Wochen post Op. Vergrößerung eines zentralen Bereiches des Implantates. Das Implantat erscheint vital mit ovoid bis spindelförmigen Zellkernen, gleichmäßiger Ausrichtung und Fältelung. Minipig 210i Masson Goldner Färbung

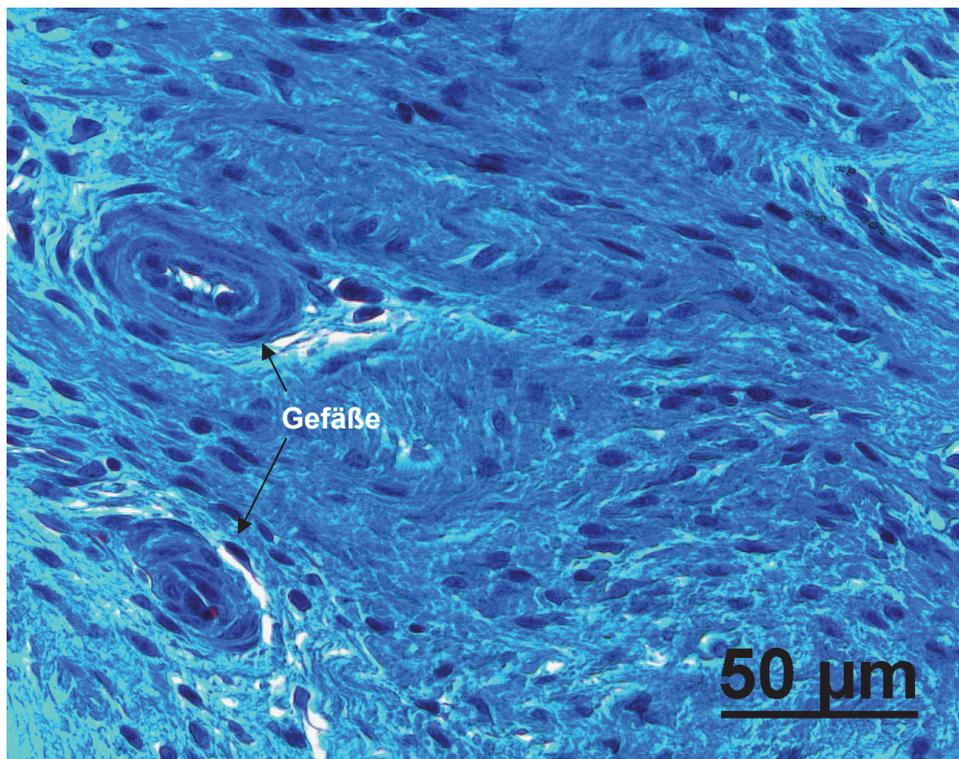


Abb. 4 Implantat 6 Wochen post Op. Dem Implantat anhängendes lockeres Bindegewebe mit ungerichteten Fibroblasten und Gefäßen. Minipig 215i, Masson Goldner Färbung

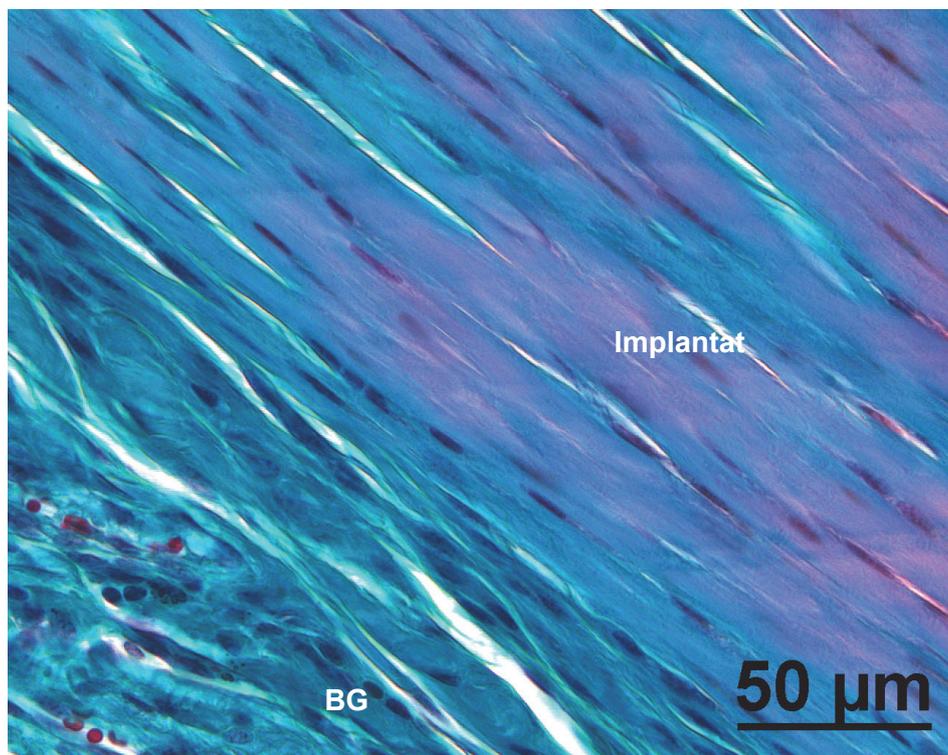


Abb. 5 Implantat 6 Wochen post Op. Vergrößerung des peripheren Bereiches des Implantates mit anhängendem Bindegewebe (BG), deutlich unterscheidbar an der Faserausrichtung. Im Vergleich zu Abb. 3 erscheint der periphere Bereich des Implantates hyperzellulär. Minipig 267i, Masson Goldner Färbung

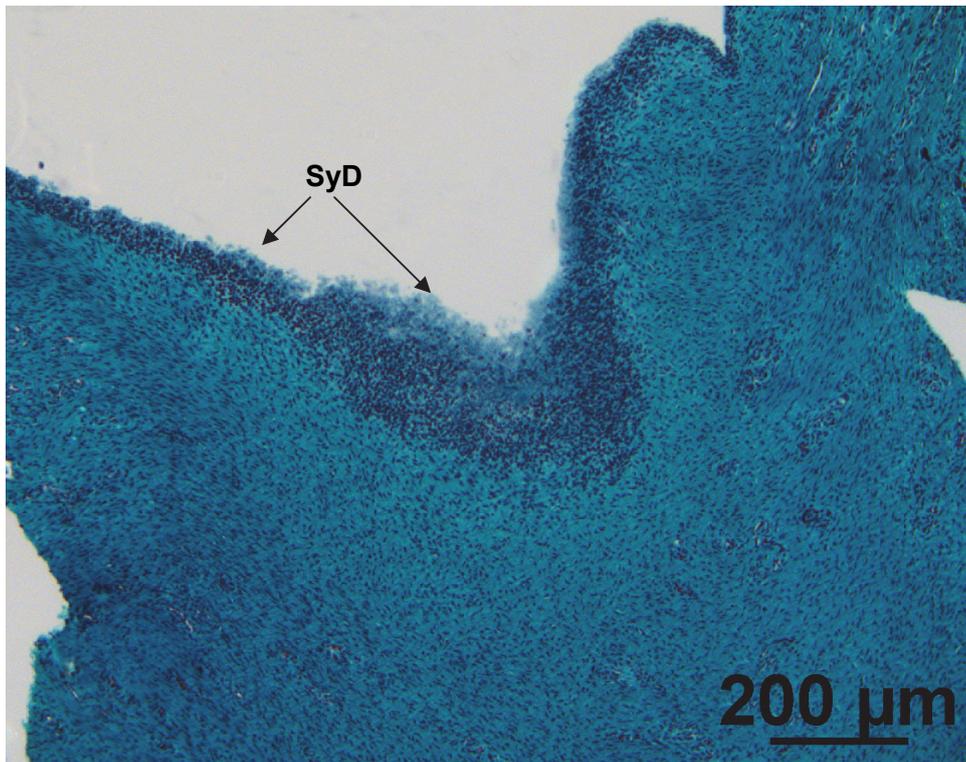


Abb. 6 Implantat 6 Wochen post Op. Ausgeprägte synoviale Deckschicht (SyD). Minipig 286i, Masson Goldner Färbung

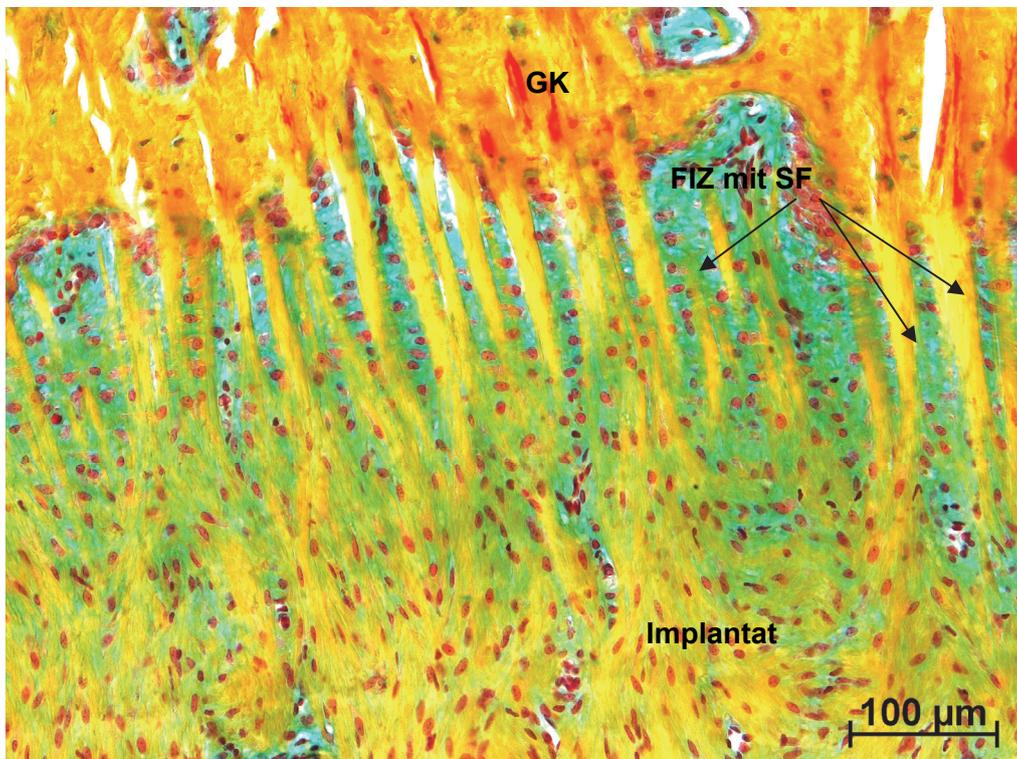


Abb. 7 Tunnelmitte 6 Wochen post Op. Ausgeprägte Sharpey'sche Fasern (SF) ziehen aus dem neu gebildeten Geflechtknochen (GK) durch die FIZ in das Implantat. Minipig F224, Femur links, Movat Pentachrom Färbung

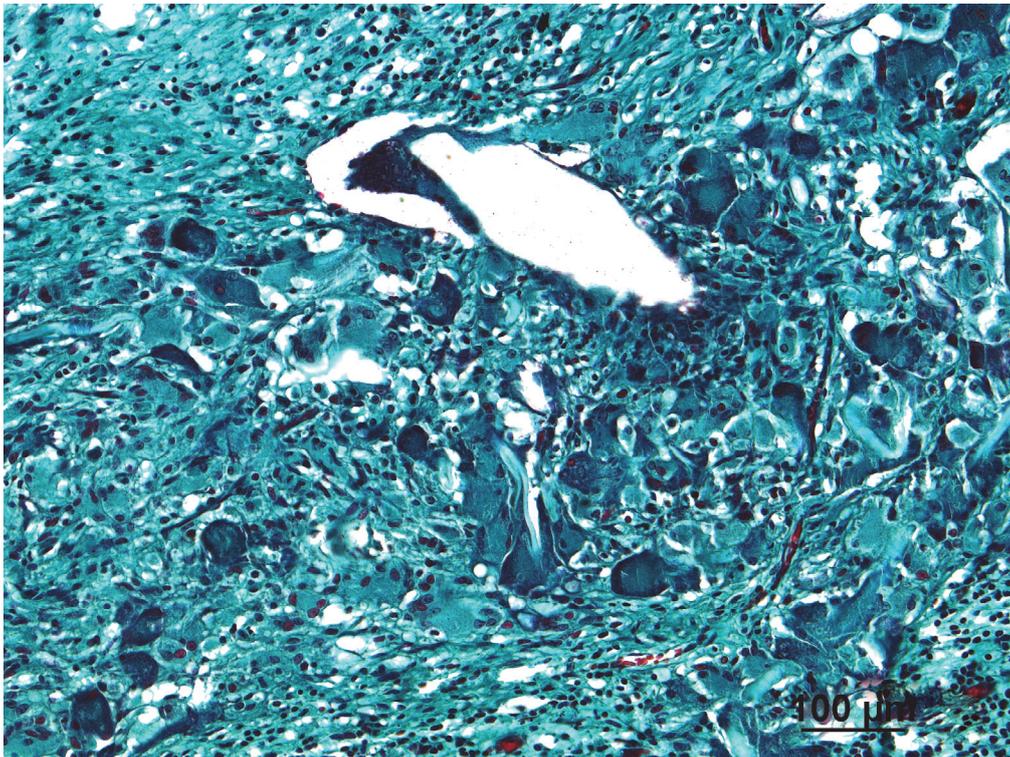


Abb. 8 FIZ am Tunnelboden 6 Wochen post Op. Ungeordnete FIZ am Tunnelboden mit hyperzellulärem Bindegewebe und massenhaft Riesenzellen (MRZ). Minipig F209, Femur links, Masson Goldner Färbung ca. x20

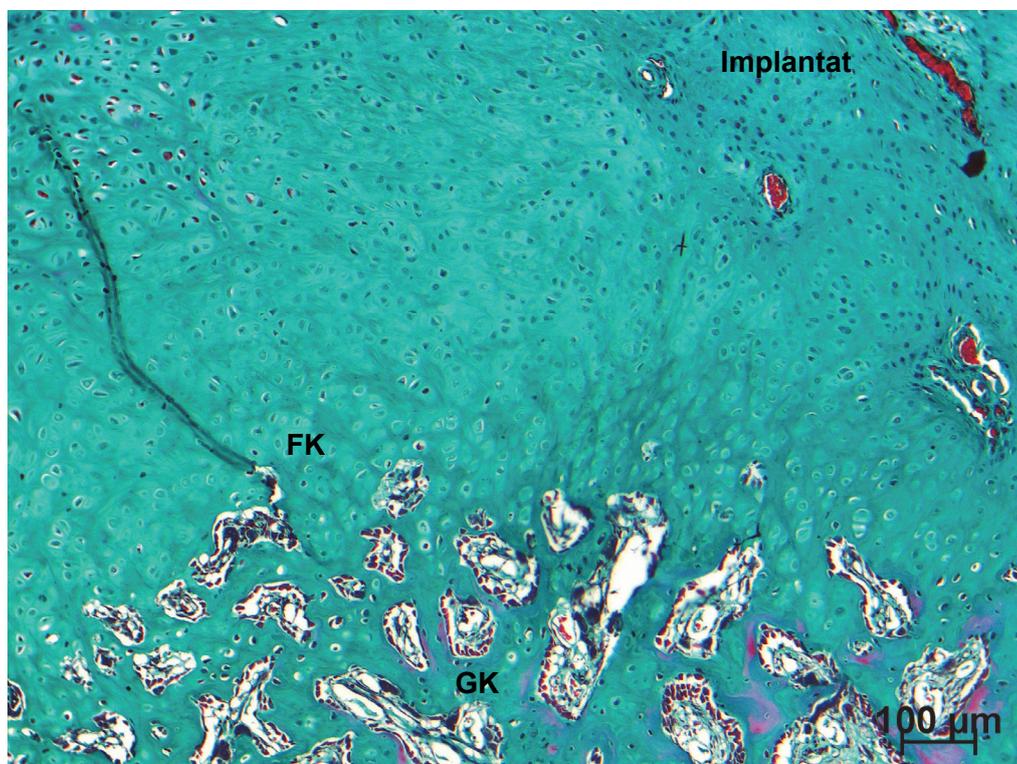


Abb. 9 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Aus dem neugebildeten Geflechtknochen (GK) ziehen kollagene Fasern Richtung Implantat, dazwischen liegen bereits Fasernorpelzellen (FK). Minipig F215 Femur links, Masson Goldner Färbung

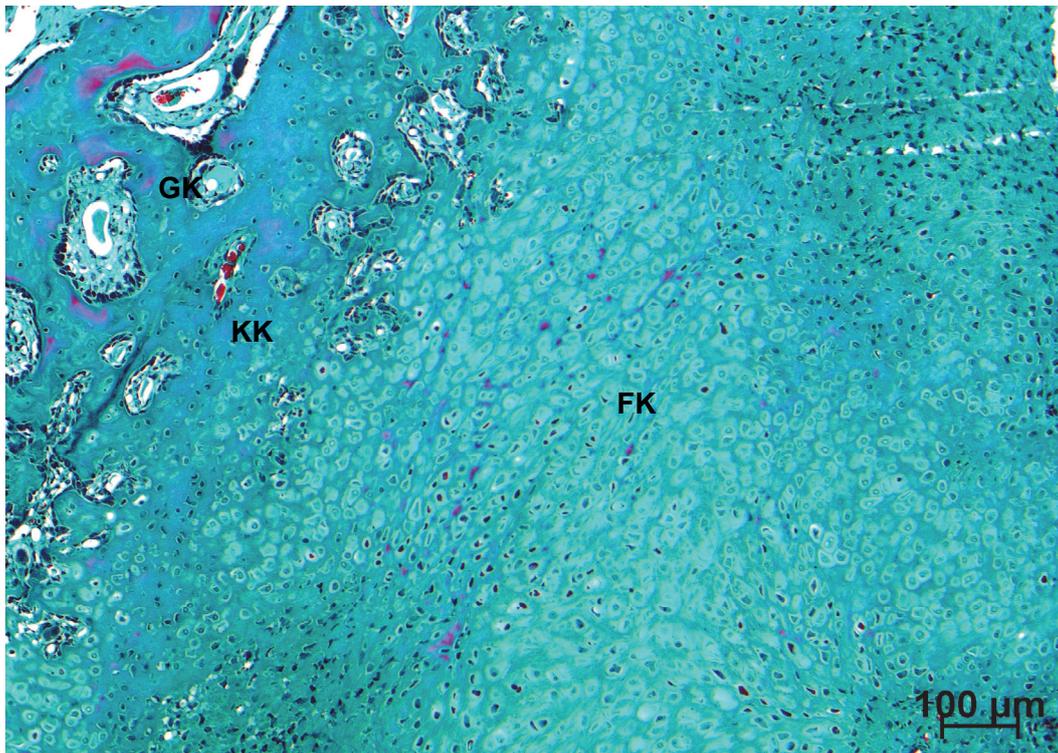


Abb. 10 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Unreife Bandinsertion mit Geflechtknochen (GK), kalzifiziertem Knorpel (KK) und Faserknorpel (FK). Minipig F209 Femur links, Masson Goldner Färbung

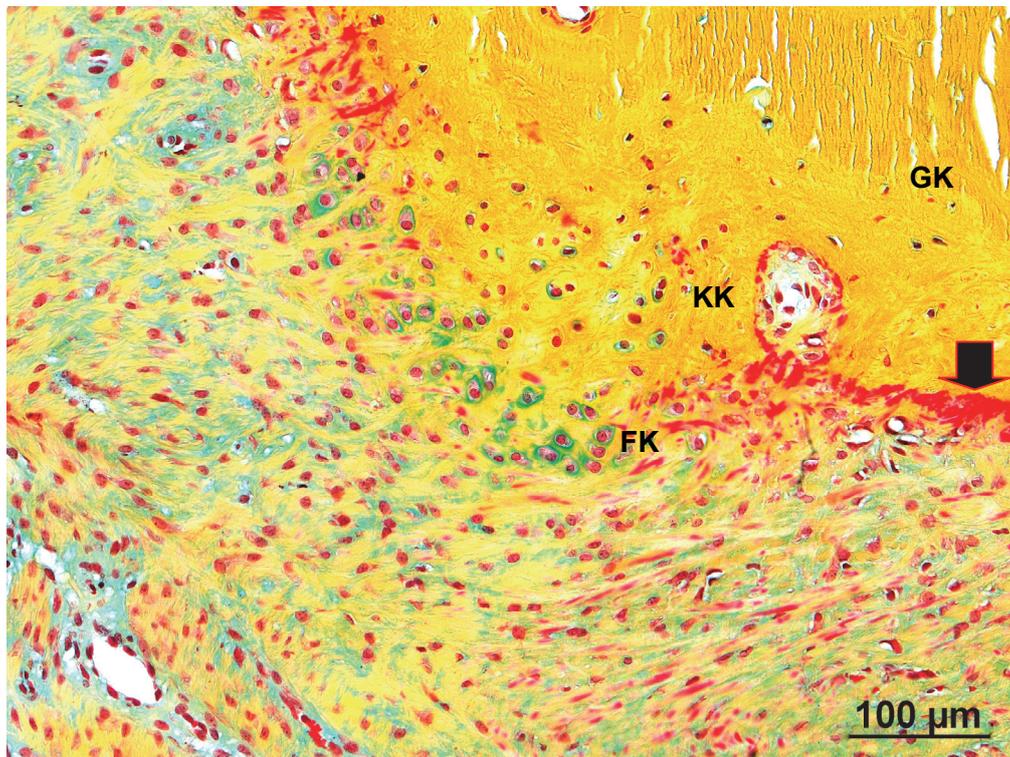


Abb. 11 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Kollagenfasern durchdringen die Knorpelschichten und inserieren im Geflechtknochen (GK). Dazwischen liegen noch unregelmäßig chondroide Zellen (FK), z. T. bereits kalzifiziert (KK). Osteoidsäume (schwarzer Pfeil) zeugen von aktiver Geflechtknochensynthese. Minipig F267 Femur links, Movat Pentachrom Färbung

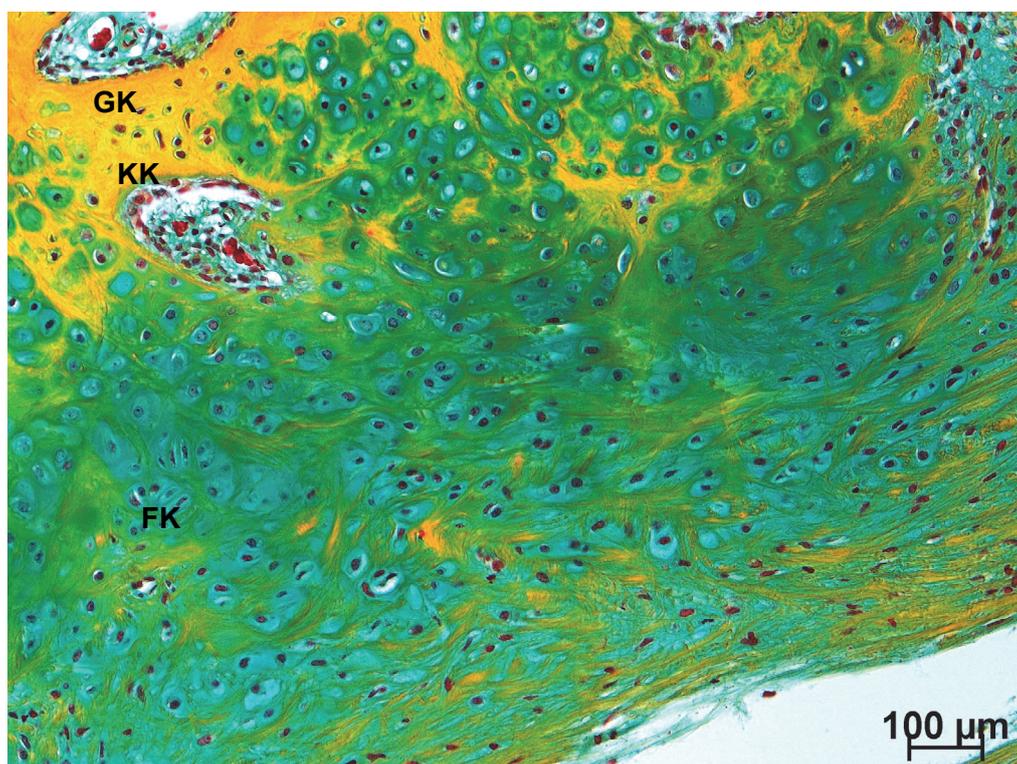


Abb. 12 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Ausgeprägte kalzifizierte chondroide Zellen (KK) und Faserknorpelzellen (FK) im Insertionsgebiet. Minipig F267 Femur links, Movat Pentachrom Färbung

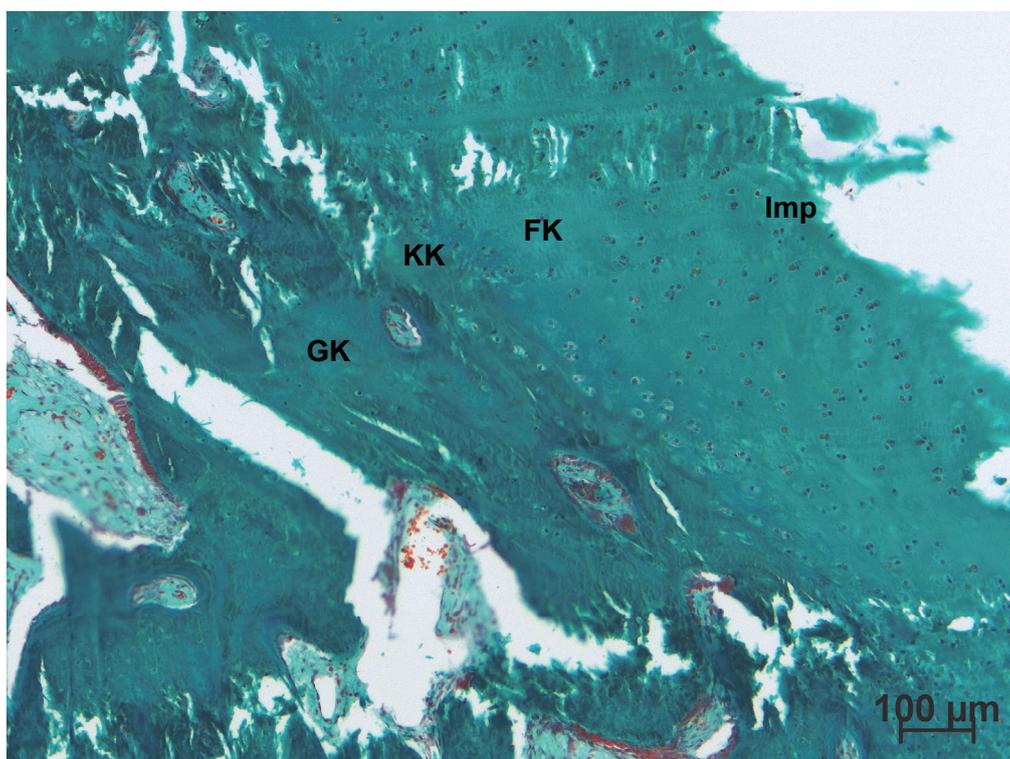


Abb. 13 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Insertionsgebiet mit stellenweisen 4-Zonen Aufbau, Geflechtknochen (GK), Kalkknorpel (KK), Faserknorpel (FK) und Implantat (Imp). Minipig F224, Femur links, Masson Goldner Färbung

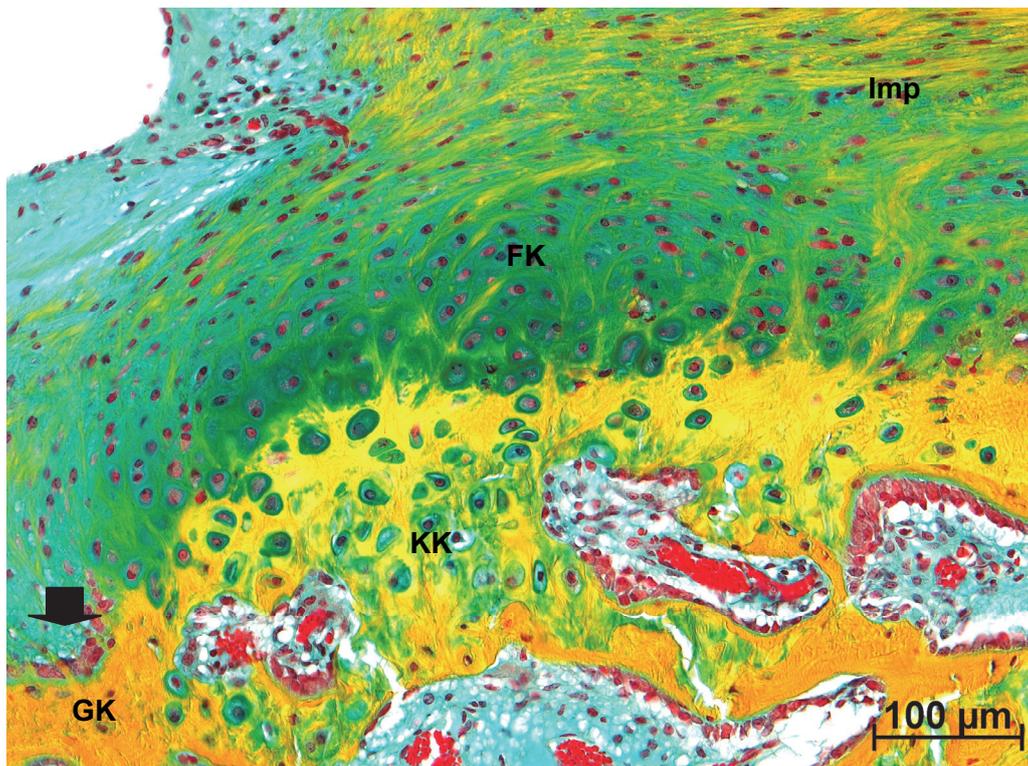


Abb. 14 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Insertionsgebiet mit stellenweisen 4-Zonen Aufbau, Geflechtknochen (GK), Kalkknorpel (KK), Faserknorpel (FK) und Implantat (Imp). Zahlreiche Osteoblasten (schwarzer Pfeil) zeugen von aktiver Osteosynthese. Minipig F224, Femur links, Movat Pentachrom Färbung

4.1.2 Ergebnisse der Sechsmonatsgruppe

Bänder

Die sechs Implantate der Sechsmonatstiere zeigten deutliche Veränderung im Gegensatz zu den Sechswochentieren (Abb. 15).

Es waren nur wenige hypozelluläre Gebiete mit straffen Fasern erhalten, stattdessen dominierten aufgelockerte Kollagenfasern mit Fibroblasten und Gefäßen (Abb. 16). Vor allem in Gefäßnähe befanden sich Fibroblasten mit runden Zellkernen. Intermediär und zentral waren die Zellkerne ovoid bis spindelförmig. Insgesamt waren alle Präparate hyperzellulär mit einer weitgehend homogenen Zell- und Gefäßverteilung. Eine beginnende bindegewebige Septierung der Implantate war erkennbar, jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den nativen VKB. In dieser Septierung folgten Gefäße und Fibroblasten den bindegewebigen Septen. Eine synoviale Deckschicht war auch in dieser Gruppe erkennbar und in allen sechs Präparaten ausgebildet (Abb. 17).

Femorale Präparate

Am Tunnelausgang fand sich in fünf von sechs Präparaten eine breite Schicht kalzifizierter Knorpelmatrix, mit z. T. kalzifizierten chondroiden Zellen. Häufig ging diese in den Gelenkknorpel über. Die kalzifizierten chondroiden Zellen bildeten die Insertionsstelle des Implantates. In einem von sechs Präparaten in der Sechsmonatsgruppe ließen sich im Bereich des Tunnelausgangs nur Sharpey'schen Fasern ohne dazwischen liegende chondroide Zellen feststellen. In der Tunnelmitte und am Tunnelboden hingegen waren in allen sechs Präparaten ausgeprägte Sharpey'sche Fasern zu finden, sie zogen aus dem neugebildeten Geflechtknochen in das Implantat (Abb. 18, 19, 20 und 21). Ihre Ausrichtung entsprach der Zugrichtung des Implantates.

Eine FIZ war in keinem der Präparate mehr erkennbar, stattdessen war das gesamte Implantat homogener vaskularisiert und aufgelockerter. Der neugebildete Geflechtknochen grenzte direkt an das Implantat. Der Bohrkanal erschien enger (Abb. 22). In einem der sechs Präparate hatten sich innerhalb des Implantates chondroide Zellen

gebildet. Diese chondroide Zellinsel war nur auf einer Seite des Implantates ausgebildet und hatte keine Verbindung zum Knochengewebe (Abb. 23). Weiterhin konnten vereinzelte chondroide Zellverbände im Bereich der Epiphysenfugen gefunden werden (Abb. 24).

Bei drei der sechs Präparate befanden sich Reste des verwendeten Nahtmaterials am Boden des Bohrtunnels. In diesen Bereichen war das Bindegewebe stark aufgelockert, z. T. vakuolisiert und hyperzellulär. Hier fanden sich besonders viele Gefäße. In der Nähe dieser Gefäße fanden sich Fibroblasten und z. T. Fremdkörperriesenzellen. Die Ausprägung einer Bandinsertion durch Sharpey'sche Fasern war in diesen Bereichen stark vermindert (Abb. 25 und 26).

Bandinsertion

Die beginnende Ausbildung einer direkten Bandinsertion war in fünf von sechs Präparaten zu beobachten (Abb. 27). In Anlehnung an den im Kapitel Material und Methoden beschriebenen *Score* nach Unterhauser et al. (2006) (SCHLICHTING 2008) konnten die Präparate von 0 - 4 klassifiziert werden. In den vorliegenden Untersuchungen gab es bei einem Präparat keinen Hinweis auf eine direkte Bandinsertion. Das histologische Bild an der Gelenkfläche war hier dominiert von Sharpey'schen Fasern und kollagenen Fasern, es entsprach somit der Klasse 0. Zwei Präparate konnten mit 2 klassifiziert werden, mit z. T. verkalkten chondroiden Zellen. Drei Präparate entsprachen der Klasse 3. Hier waren an verschiedenen Stellen ein 4 Zonenaufbau ausgebildet. Kein Präparat konnte mit 4 klassifiziert werden (Abb. 28).

Klassifizierung der direkten Bandinsertion nach Score					
	0	1	2	3	4
Sechswochengruppe	0	4	2	1	0
Sechsmonatsgruppe	1	0	2	3	0

Tabl. 3 Klassifizierung der direkten Bandinsertion beider Gruppen nach dem Score von Unterhauser et al. (2006) (SCHLICHTING 2008). Sechswochengruppe n=7 Tiere, Sechsmonatsgruppe n=6 Tiere.

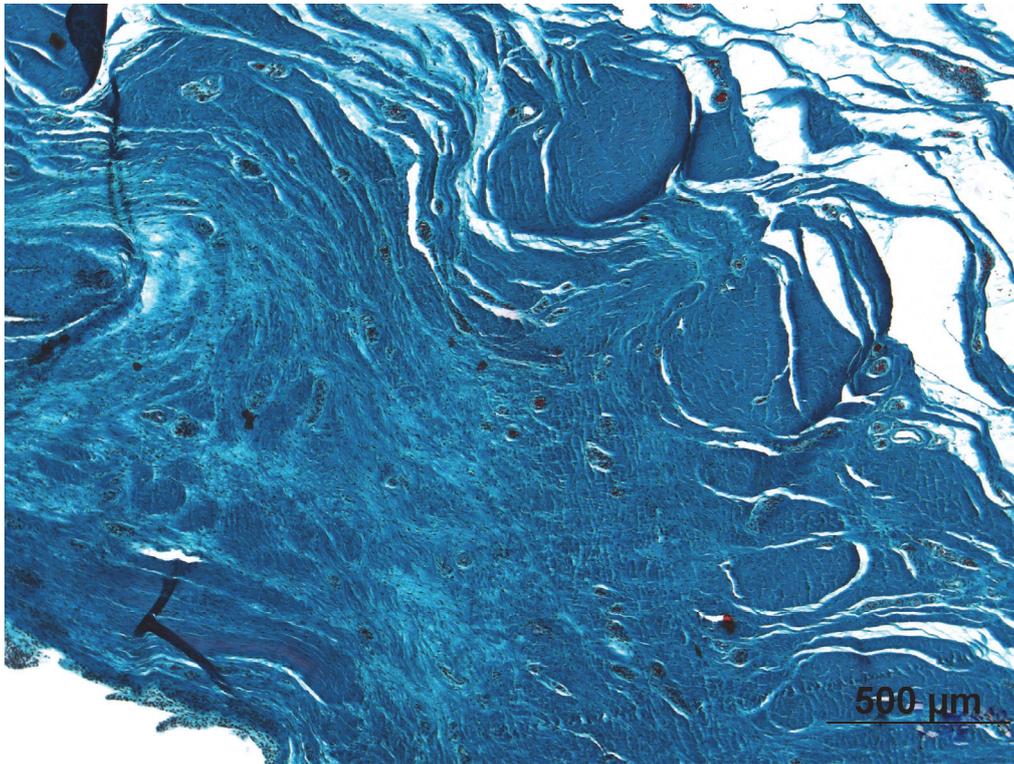


Abb. 15 Implantat 6 Monate post Op. Das Implantat erscheint aufgelockerter und zellreicher. Minipig 222i, Masson Goldner Färbung ca. x5

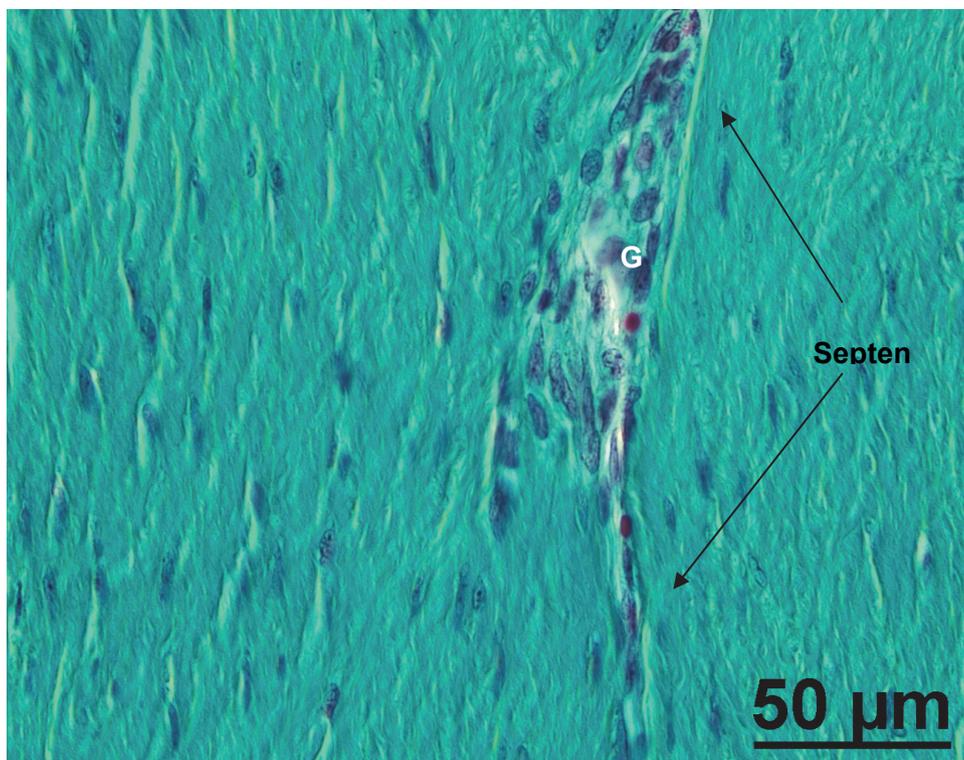


Abb. 16 Implantat 6 Monate post Op. Vergrößerung eines zentralen Bereiches. Die Zellkerne sind ovoid bis spindelförmig, bindegewebige Septen mit Gefäßen (G) und rundkernigen Zellen sind sichtbar. Minipig 203i, Masson Goldner Färbung

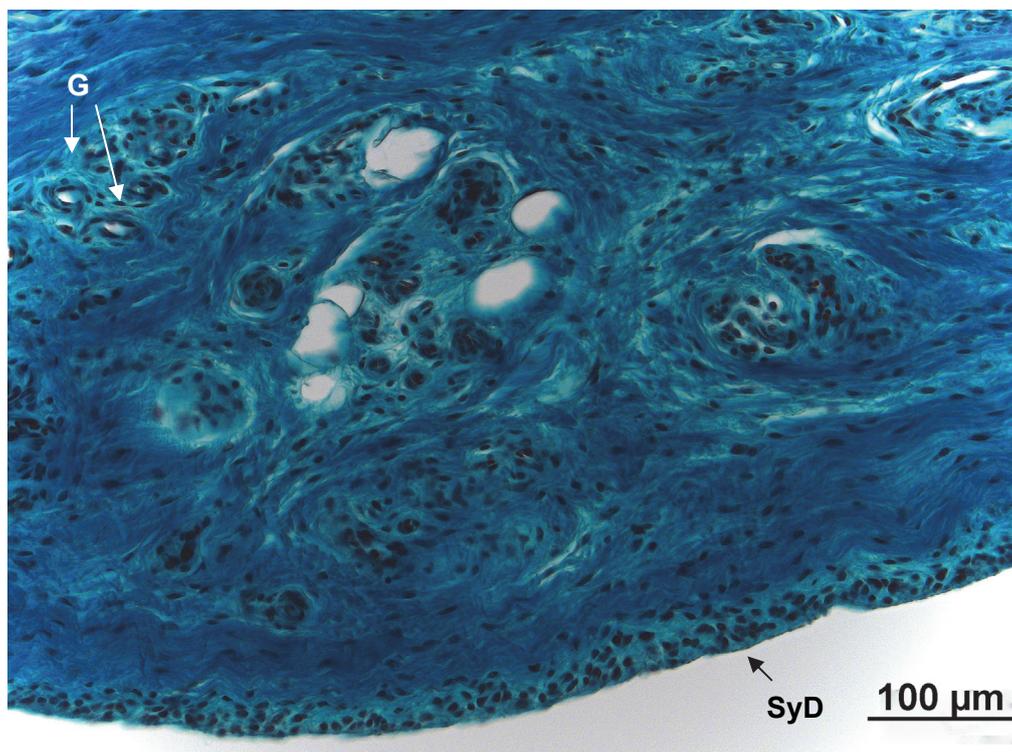


Abb. 17 Implantat 6 Monate post Op. Dem Implantat anhängendes lockeres Bindegewebe mit synovialer Deckschicht (SyD) und zahlreichen Gefäßen (G). Minipig 222i, Masson Goldner Färbung

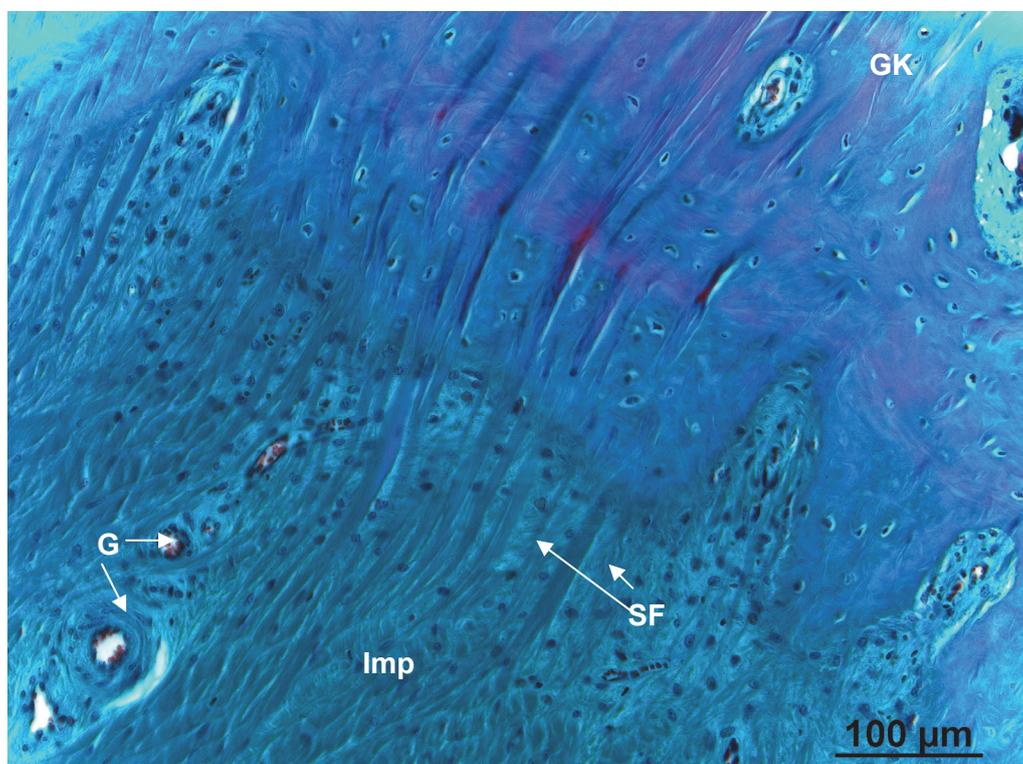


Abb. 18 Tunnelmitte 6 Monate post Op. Ausgeprägter neugebildeter Geflechtknochen (GK). Aus diesem ziehen Sharpey'sche Fasern (SF) in das Implantat (Imp). Mehrere Gefäße (G) sind sichtbar. Minipig F290 Femur links, Masson Goldner Färbung

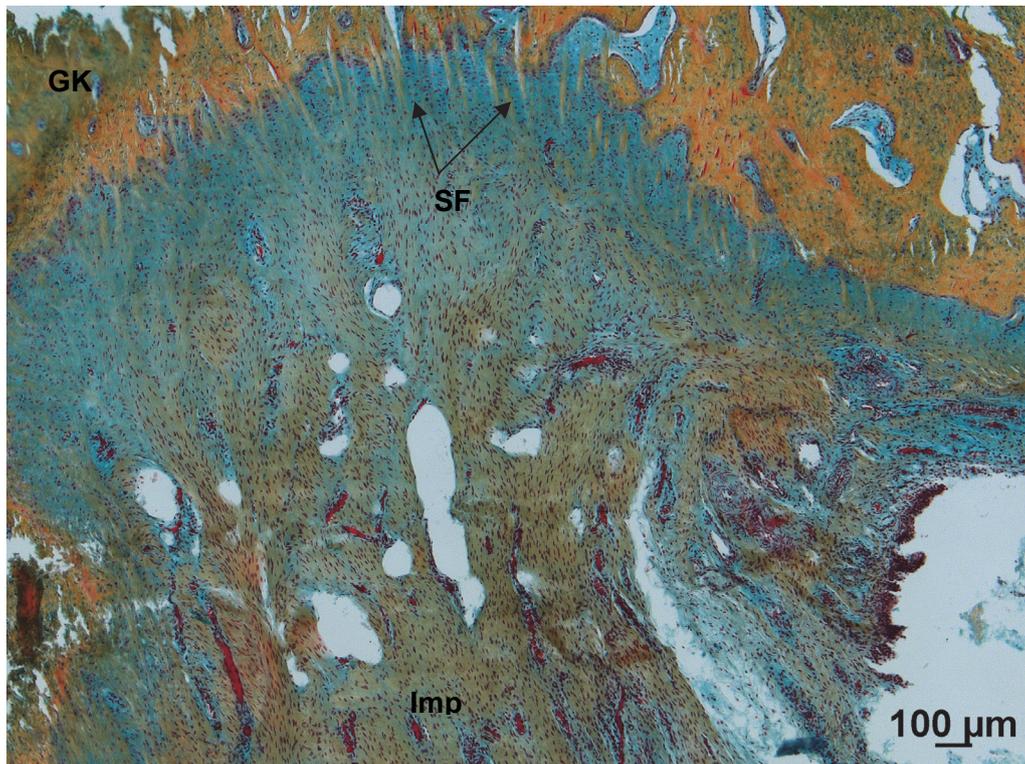


Abb. 19 Tunnelboden 6 Monate post Op. Sharpey'sche Fasern (SF) ziehen aus dem Geflechtknochen in das Implantat (Imp). Minipig F290, Femur links, Movat Pentachrom Färbung

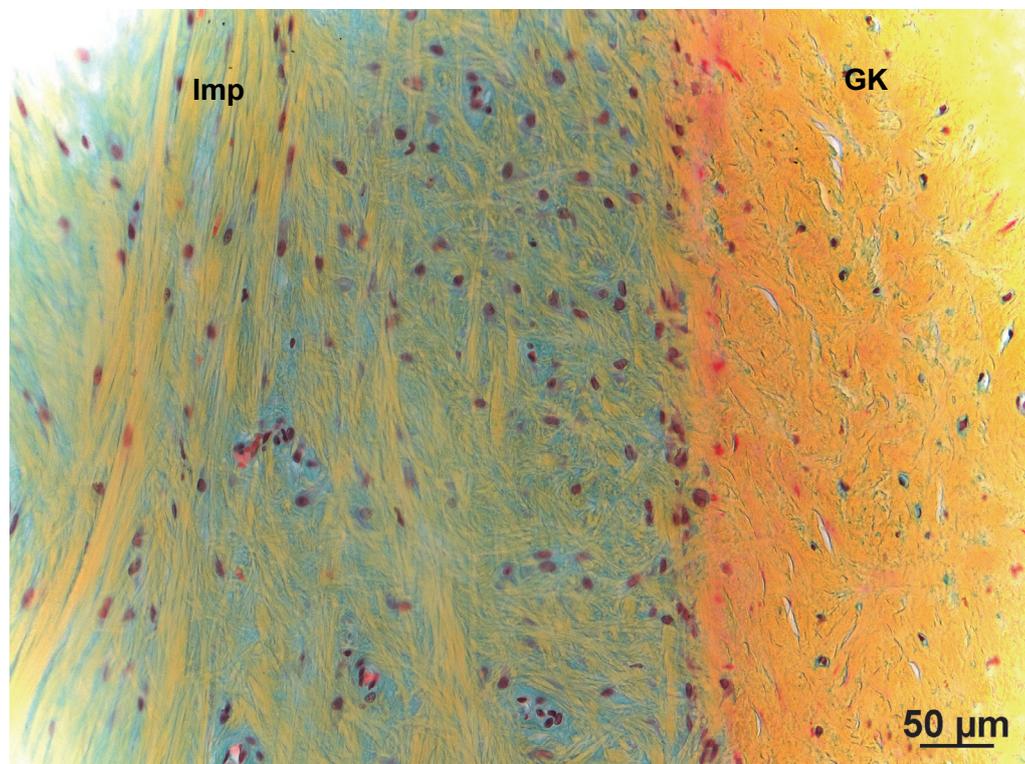


Abb. 20 Tunnelboden 6 Monate post Op. Sharpey'sche Fasern ziehen aus dem Geflechtknochen (GK) in das Implantat (Imp). Minipig F222, Femur links, Movat Pentachrom Färbung

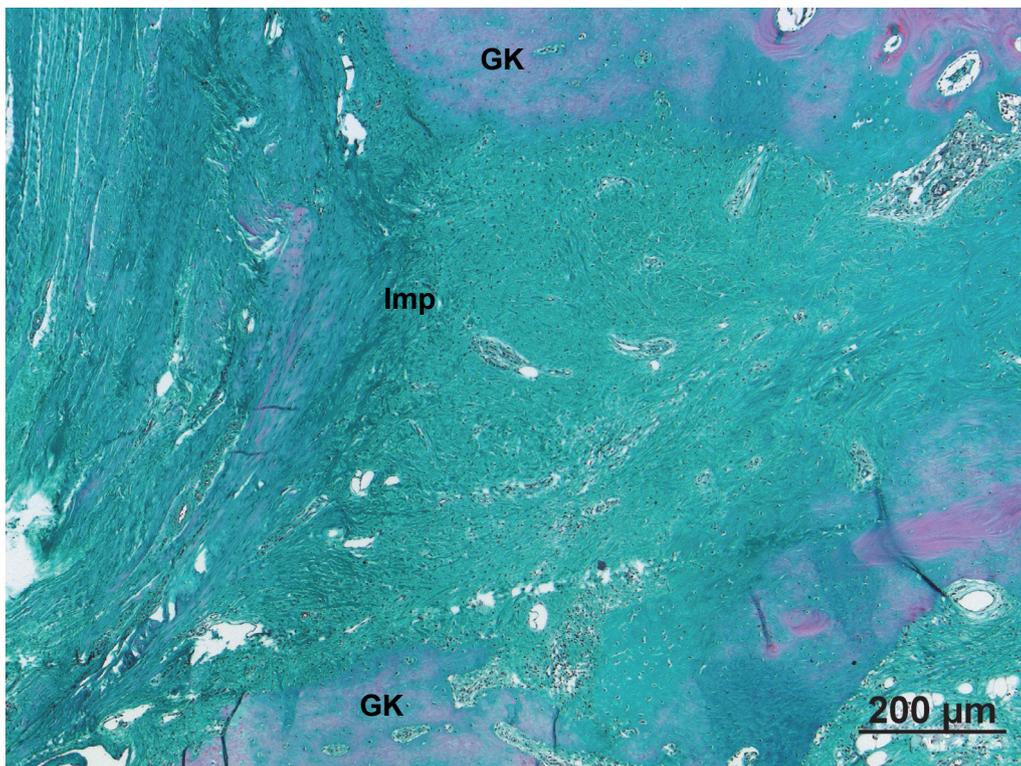


Abb. 21 Tunnelausgang 6 Monate post Op. Übersicht Tunnelausgang. Neu gebildeter Geflechtknochen (GK) engt den Bohrtunnel ein und grenzt direkt an das Implantat (Imp). Eine FIZ ist nicht mehr erkennbar. Minipig F266, Femur links, Masson Goldner Färbung

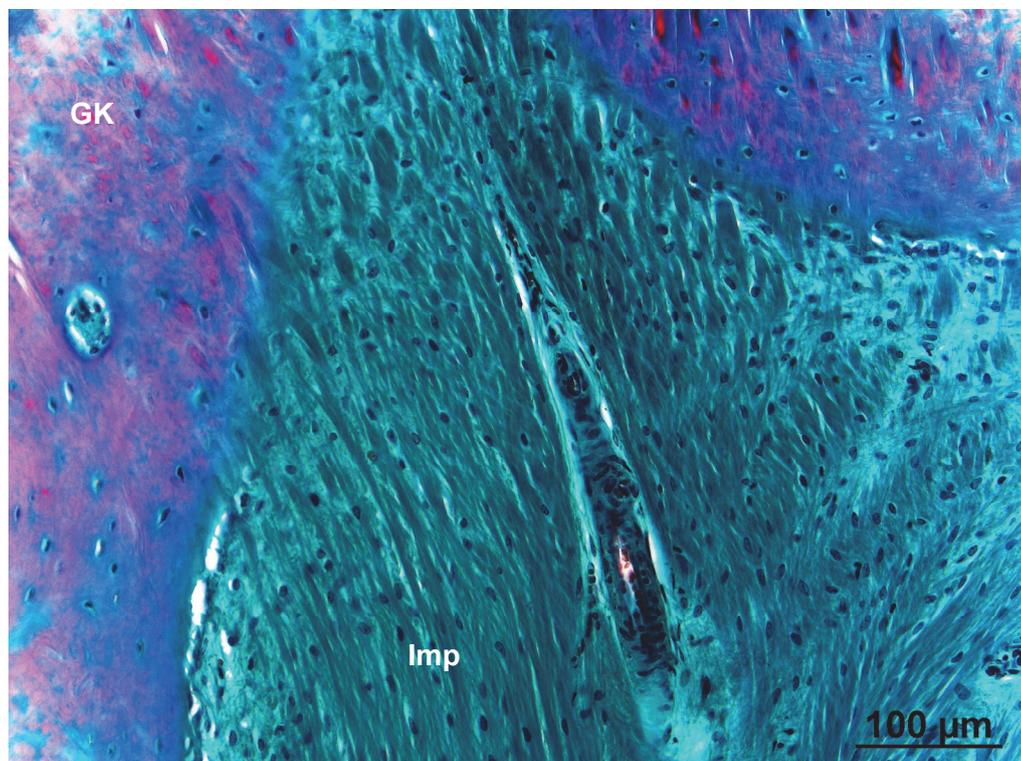


Abb. 22 Tunnelmitte 6 Monate post Op. Ausgeprägte Sharpey'sche Fasern ziehen aus dem Geflechtknochen (GK) in das Implantat (Imp). Minipig F287, Femur links, Masson Goldner Färbung ca. x20

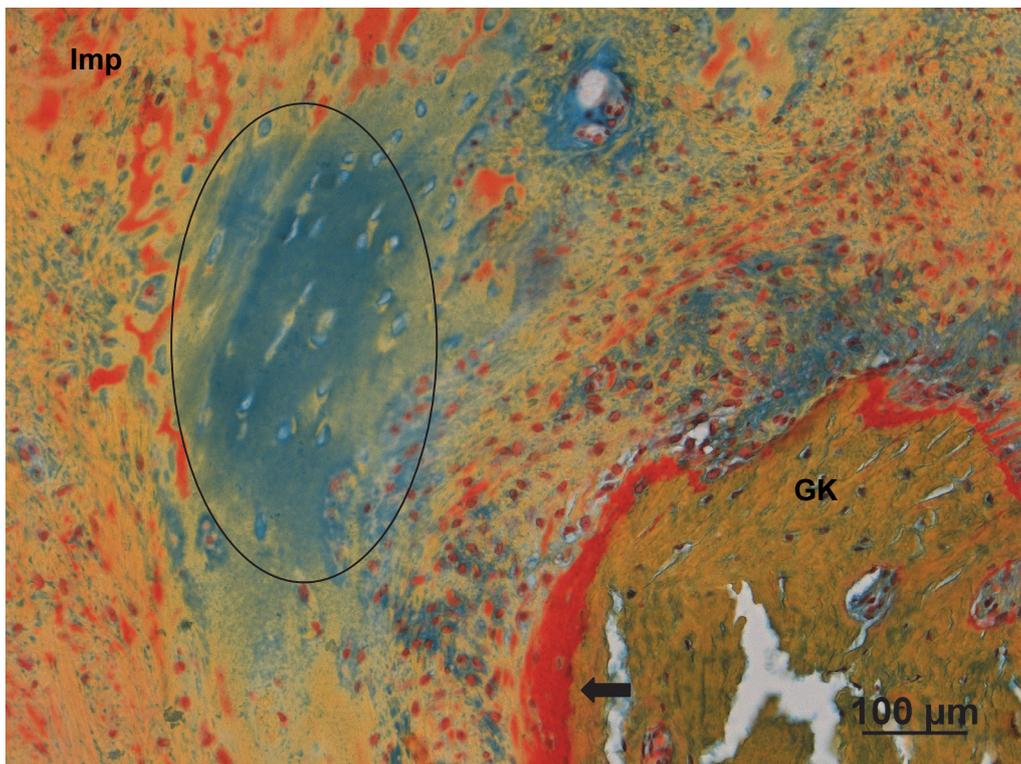


Abb. 23 Tunnelausgang 6 Monate post Op. Solitäre Chondroide Zellinsel (Ellipse) im Implantat (Imp) im Tunnelausgangsbereich. Geflechtknochen (GK) mit ausgeprägtem Osteoidsaum (Pfeil). Minipig F212, Femur links, Movat Pentachrom Färbung ca. x20

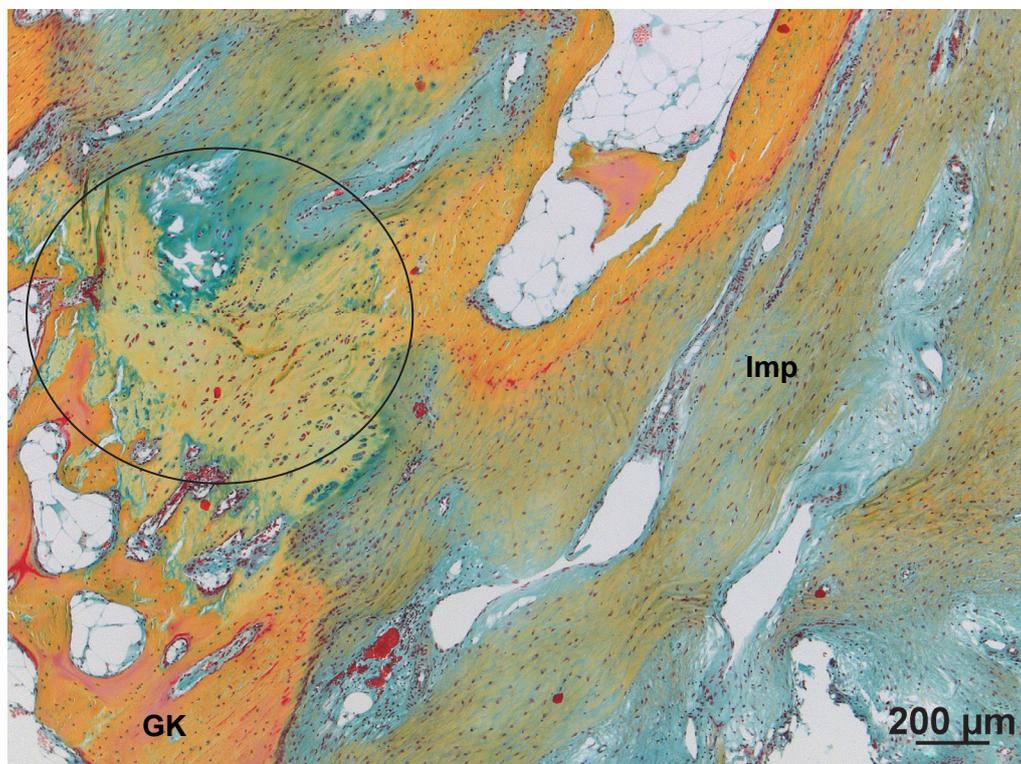


Abb. 24 Tunnelmitte 6 Monate post Op. Chondroide Zellverbände (Ellipse) im Bohrtunnel im Bereich der durch die Bohrung eröffneten Epiphysenfugen. Sie verbinden sich mit dem Implantatgewebe (Imp). Minipig F222, Femur links, Movat Pentachrom Färbung

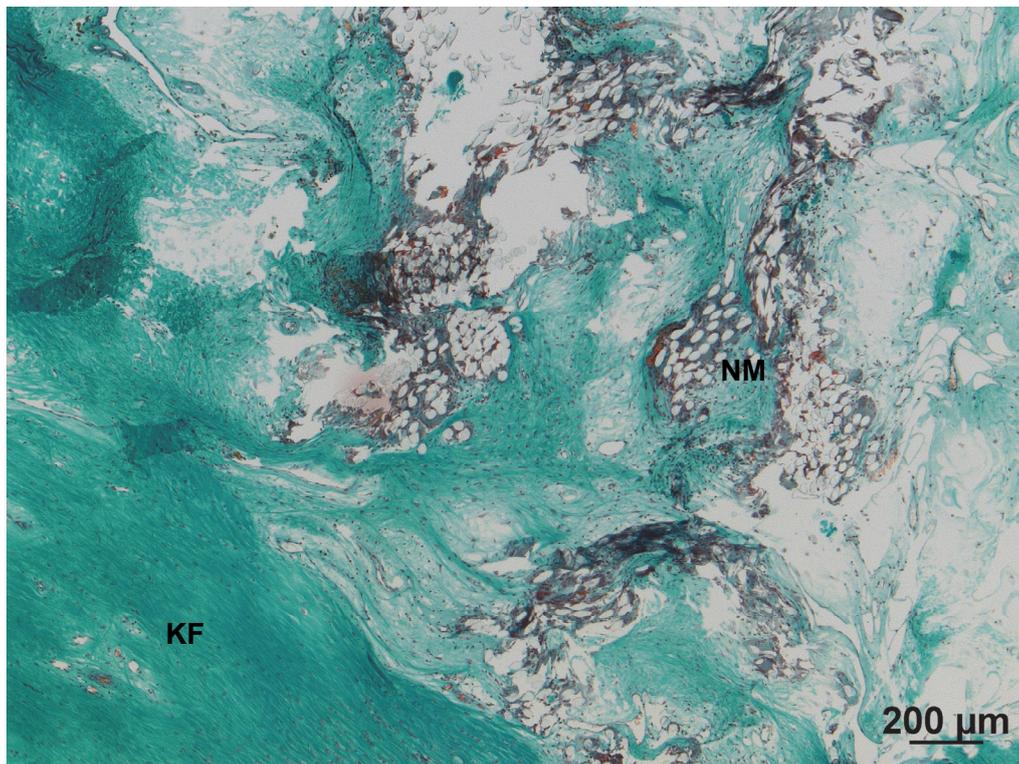


Abb. 25 Tunnelmitte 6 Monate post Op. Reste des zur Verankerung genutzten Nahtmaterials (NM) in der Tunnelmitte. Die Kollagenfasern (KF) sind hier stark aufgelockert. Minipig F222, Femur links, Masson Goldner Färbung

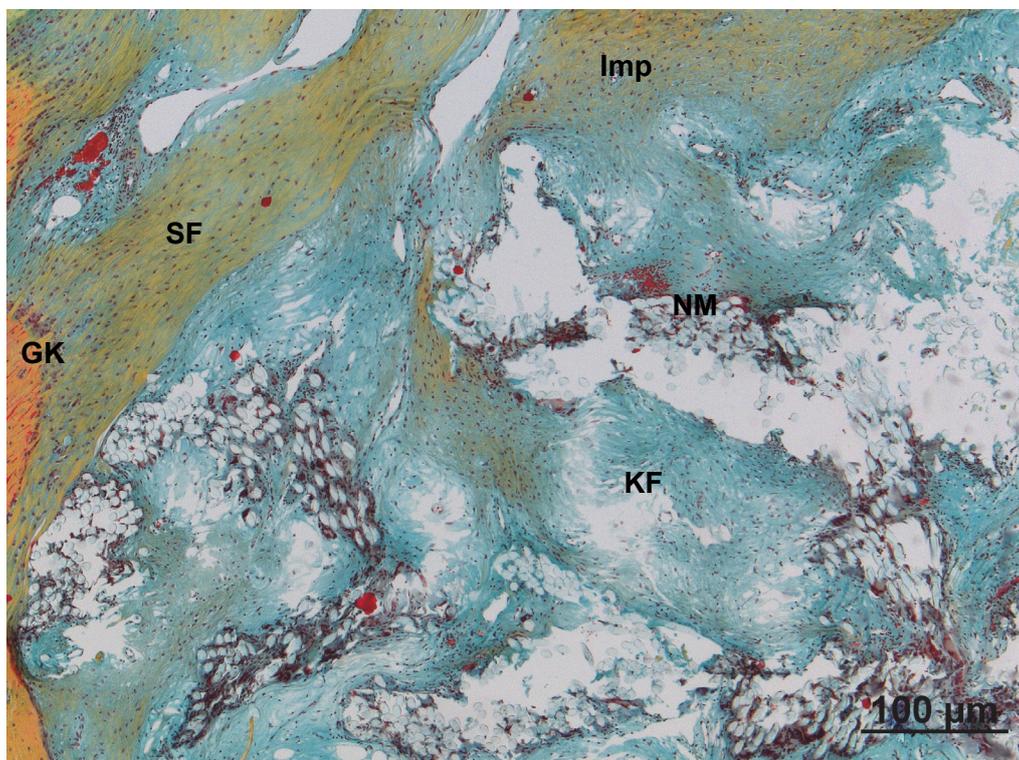


Abb. 26 Tunnelmitte 6 Monate post Op. Rest des zur Verankerung genutzten Nahtmaterials (NM) in der Tunnelmitte. Die Sharpey'schen Fasern (SF) sind in diesem Bereich vermindert, die Kollagenfasern (KF) stark aufgelockert. Die Insertion des Implantates (Imp) am Geflechtknochen (GK) erscheint hier unregelmäßig. Minipig F222, Femur links, Movat Pentachrom Färbung ca. x5

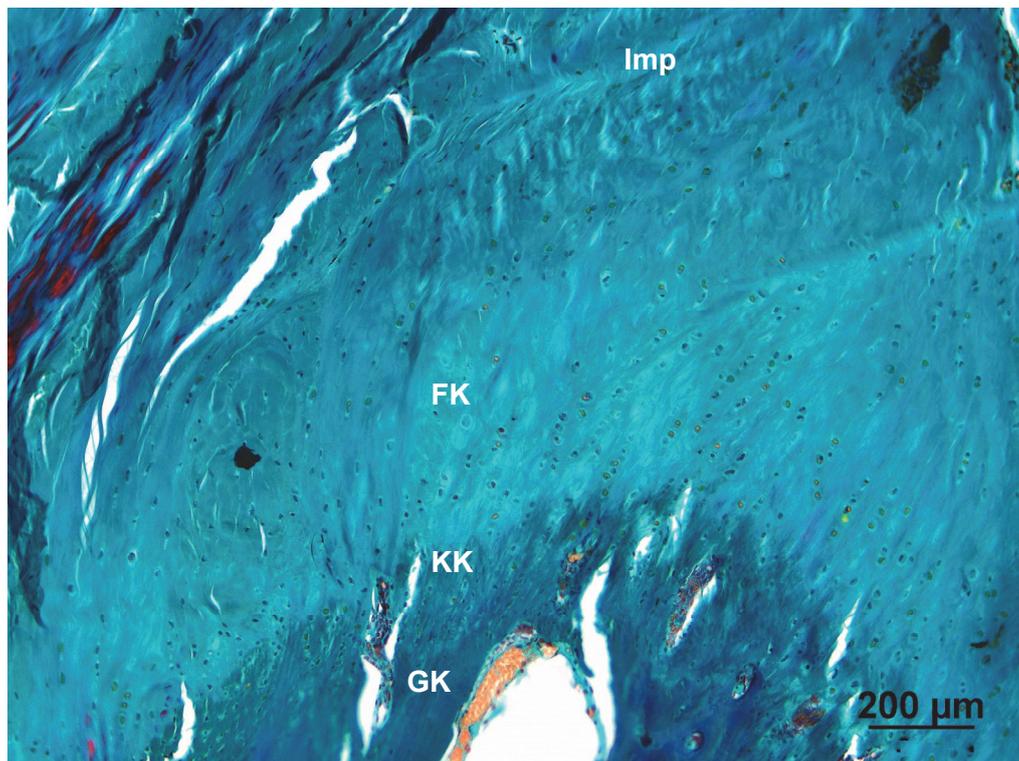


Abb. 27 Bandinsertion 6 Monate post Op. Sharpey'sche Fasern (SF) ziehen im Bereich des Tunnelausgangs aus dem Geflechtknochen (GK) in das Implantat (Imp), dazwischen säulenartig angeordneter Faserknorpel (FK) und z. T. kalzifizierter Knorpel (KK). Minipig F212, Femur links Masson Goldner Färbung

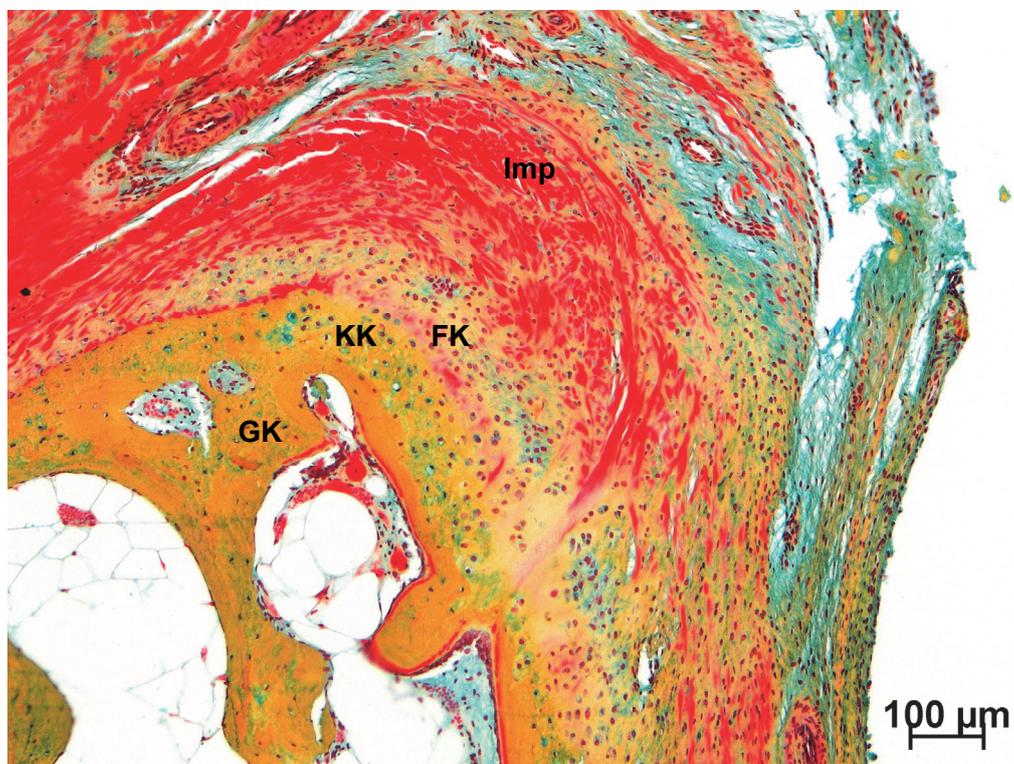


Abb. 28 Bandinsertion 6 Monate post Op. Teilweise 4 Zonen Aufbau mit Geflechtknochen (GK), kalzifiziertem Knorpel (KK), Faserknorpel (FK) und Implantat (Imp). Minipig F203, Femur links, Movat Pentachrom Färbung

4.2 Quantifizierung der Gefäße mit der FVIIIrA Färbung

4.2.1 Sechswochengruppe

In allen sieben Präparaten war eine ausgeprägte Vaskularisierung erkennbar. Die höchste Gefäßdichte fand sich peripher im lockeren Bindegewebe, im subsynovialen Bereich. Nach intermediär und zentral nahmen sowohl Anzahl als auch Größe der Gefäße ab. Zentral befanden sich nur wenige, bei zwei Präparaten, auch keine Gefäße (Abb. 30). Bei Tiernummer 268 dieser Gruppe zeigte sich ein anderes Bild, hier war die Gefäßverteilung sehr homogen und auch in den zentralen Bereichen befanden sich homogen Gefäße (Abb. 31). Die quantitative Auswertung der Anzahl der Blutgefäße ergab im Mittelwert sechs Gefäße pro Gesichtsfeld in der 20er Vergrößerung in dieser Gruppe. Im Minimum waren es 0 und im Maximum 32 Gefäße pro Gesichtsfeld pro Präparat.

Eine Ausnahme war das bereits o. g. Präparat mit der Tiernummer 268 mit durchschnittlich 11 Gefäßen pro Gesichtsfeld. In diesem Präparat waren in jedem Gesichtsfeld Gefäße vorhanden.

4.2.2 Sechsmonatsgruppe

In den Präparaten dieser Gruppe war die Gesamtanzahl an Gefäßanschnitten im Vergleich zur Sechswochengruppe höher. Der Mittelwert lag in dieser Gruppe bei acht Gefäßanschnitten pro Gesichtsfeld in der 20er Vergrößerung. Das Minimum lag auch in dieser Gruppe bei 0 Gefäßanschnitten pro Gesichtsfeld, das Maximum bei 35 Gefäßanschnitten pro Gesichtsfeld pro Präparat.

Die Verteilung der Gefäße war insgesamt homogener als in der Sechswochengruppe. Es fanden sich auch zentral Gefäße (Abb. 32,33, 34 und 35).

Auch hier bildete ein Präparat mit der Tiernummer 266 eine Ausnahme. In diesem Präparat waren deutlich weniger Gefäßanschnitte zu finden, im Mittelwert 1 Gefäßanschnitt pro Gesichtsfeld. Auch die Verteilung war im Vergleich zu den anderen Präparaten dieser Gruppe anders, so fanden sich zentral Bereiche ohne Gefäßanschnitte. Mikroskopisch entsprach dieses Präparat eher den Präparaten der Sechswochengruppe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Anzahl der Gefäße in der Sechsmonatsgruppe größer war als in der Sechswochengruppe, der Unterschied im T-Test jedoch nicht signifikant war.

4.2.3 Kontralaterale native Kreuzbänder

In den Präparaten der nativen VKB der kontralateralen Seite war die Gefäßdichte im Vergleich zu den Versuchsgruppen signifikant niedriger ($p=0,009$ zur Sechswochengruppe, $p=0,018$ zur Sechsmonatsgruppe). Der Mittelwert lag bei 2 Gefäßanschnitten pro Gesichtsfeld in der 20er Vergrößerung. Das Minimum lag bei 0 und das Maximum bei 6 Gefäßanschnitten pro Gesichtsfeld in der 20er Vergrößerung.

Die höchste Gefäßdichte war in allen Präparaten im subsynovialen Raum auffindbar. Von hier aus begleiteten vereinzelte Gefäße Bindegewebsstränge in die peripheren und zentralen Bereiche der Präparate.

Auf der folgenden Seite sind alle Ergebnisse in einem Grafen (Abb. 29) dargestellt.

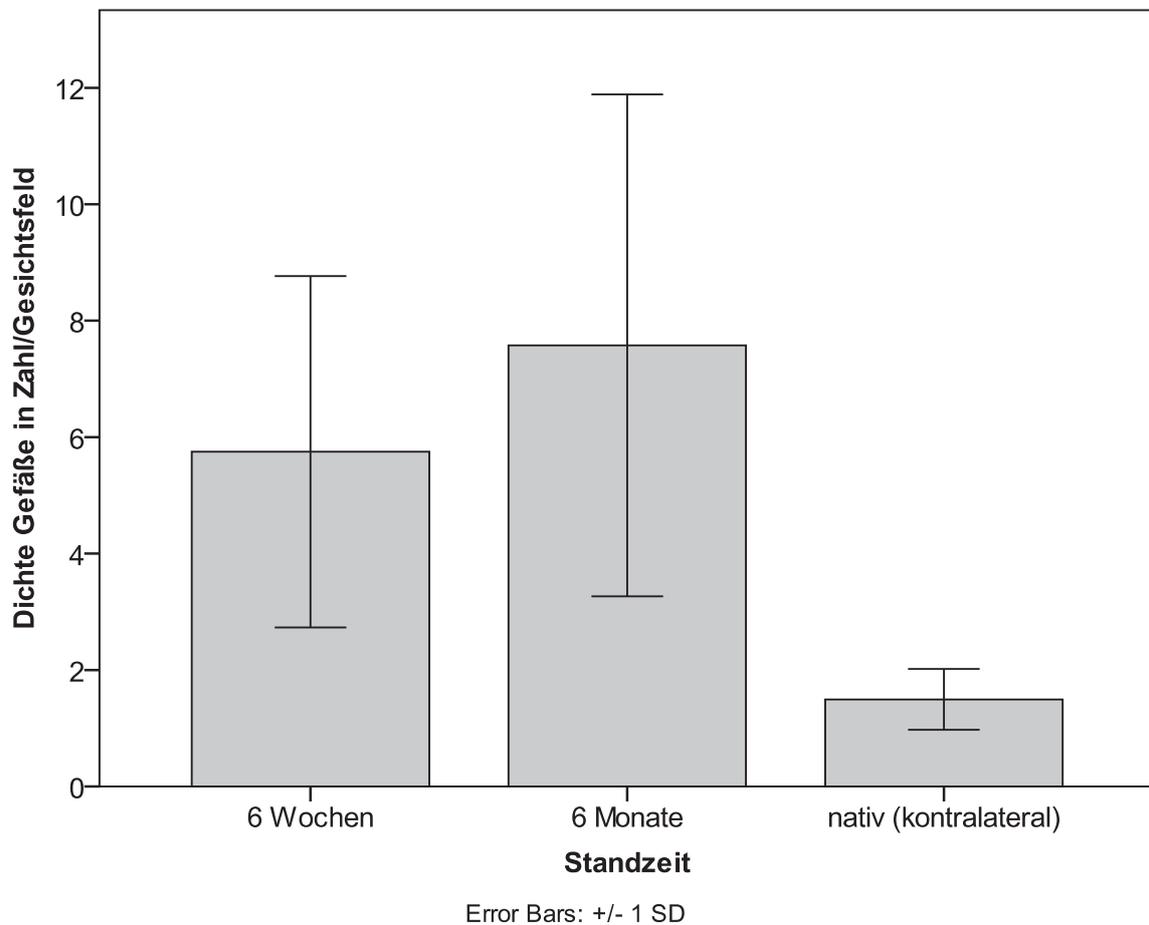


Abb. 29 Grafische Darstellung der Dichte der Gefäße in Zahlen pro Gesichtsfeld bei 20x Objektiv in den Präparaten der Sechswochengruppe (n=7), der Sechsmontatsgruppe (n=6) und den nativen Präparaten der kontralateralen Gliedmaße. Die Gefäßdichte der nativen Präparate (n=3) war im Vergleich zu den Präparaten der Versuchsgruppen deutlich geringer. Die Anzahl der Gefäße in der Sechsmontatsgruppe war im Vergleich zur Sechswochengruppe höher, der Unterschied war jedoch im T-Test nicht signifikant. Signifikant war hingegen der Unterschied zwischen den nativen VKB und den Präparaten der Sechswochengruppe (p=0,009) und den Präparaten der Sechsmontatsgruppe (p=0,018). Fehlerbalken: ±1SD

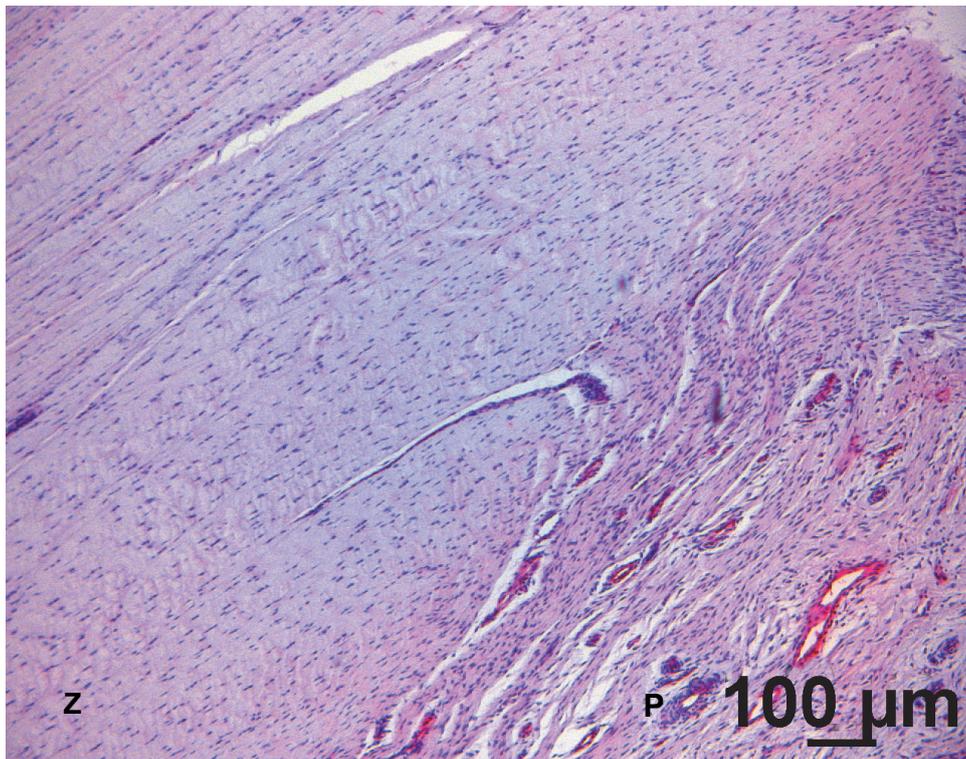


Abb. 30 Implantat 6 Wochen post Op. Nach 6 Wochen sind v. a. peripher (P) Gefäße nachweisbar, wo hingegen die zentralen Implantatbereiche (Z) in diesem Präparat noch gefäßfrei sind. Die Gefäße stellen sich in dieser Färbung leuchtend pink dar. Minipig 210i, FVIIIrA Färbung

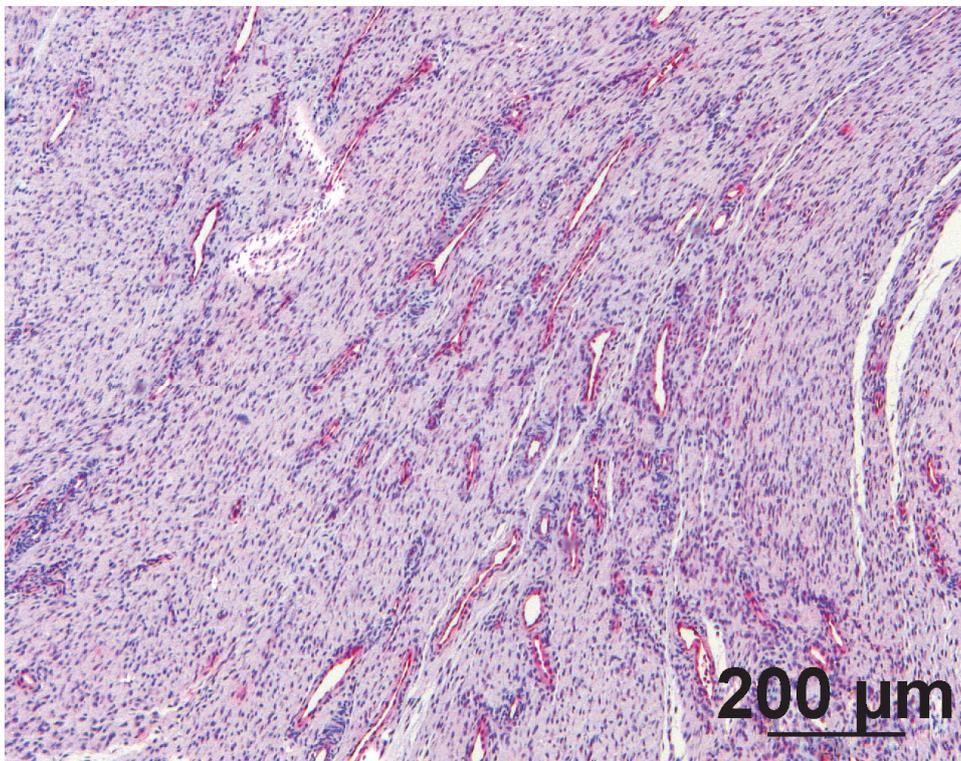


Abb. 31 Implantat 6 Wochen post Op. Abweichend von den anderen Präparaten dieser Gruppe, ist die Revaskularisierung dieses Präparates weiter fortgeschritten und die Gefäßverteilung deutlich homogener bis in die zentralen Bereiche. Die Gefäße stellen sich in dieser Färbung leuchtend pink dar. Minipig 286i, FVIIIrA Färbung

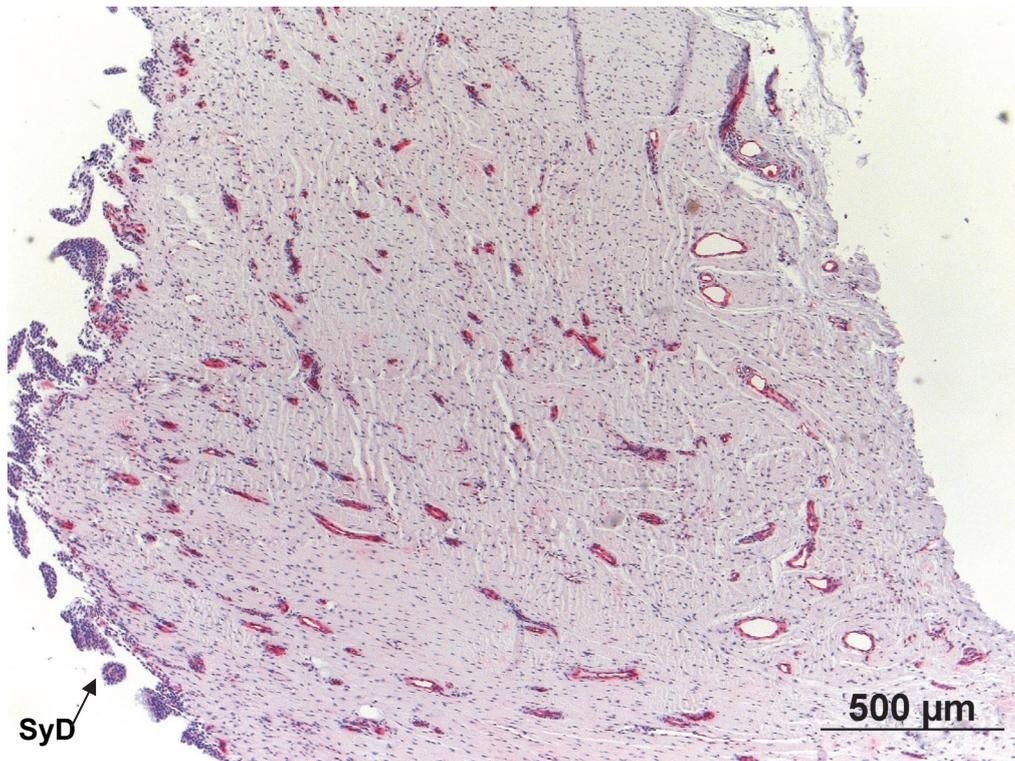


Abb. 32 Implantat 6 Monate post Op. Nach 6 Monaten sind die Präparate in allen Bereichen homogen vaskularisiert, vital und von einer synovialen Deckschicht (SyD) umgeben. Gefäße stellen sich in dieser Färbung leuchtend pink dar. Minipig 222i, FVIIIrA Färbung

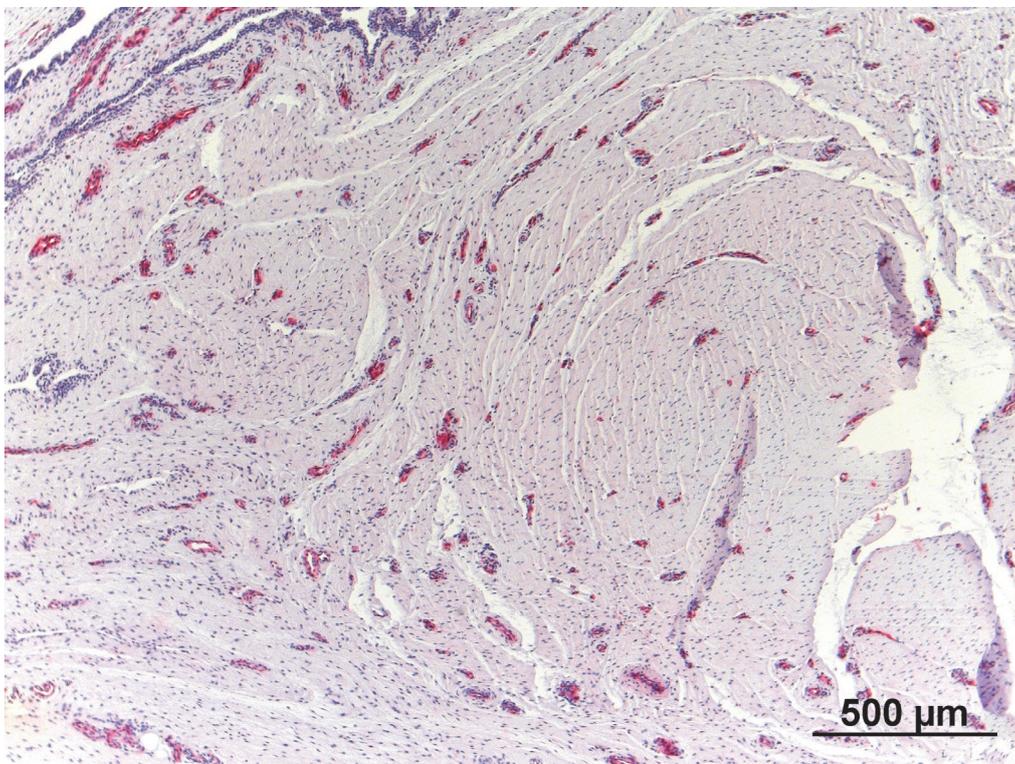


Abb. 33 Implantat 6 Monate post Op. Ein weiterer Bereich des oberen Präparates, auch hier ist eine homogene Gefäßverteilung sichtbar. Gefäße stellen sich in dieser Färbung leuchtend pink dar. Minipig 222i, FVIIIrA Färbung

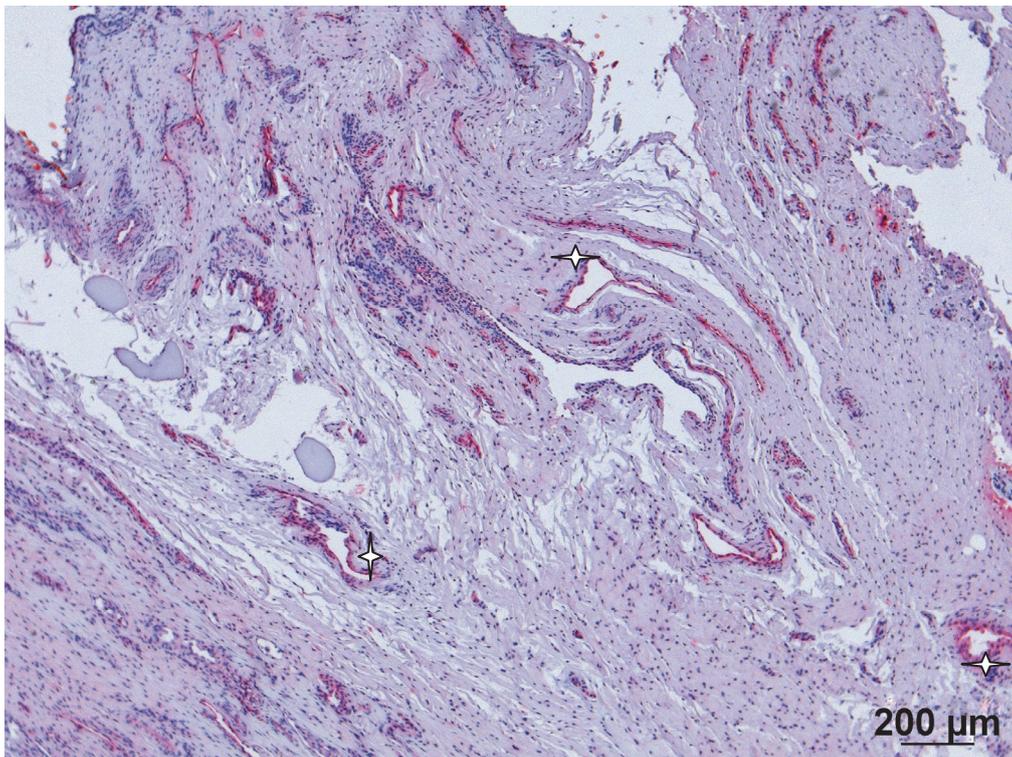


Abb. 34 Implantat 6 Monate post Op. In diesem Präparat ist ebenfalls eine homogene Vaskularisierung erkennbar. Vereinzelt sind bereits größere Gefäße (Stern) sichtbar. Die Gefäße stellen sich in dieser Färbung leuchtend pink dar. Minipig 266i, FVIIIrA Färbung

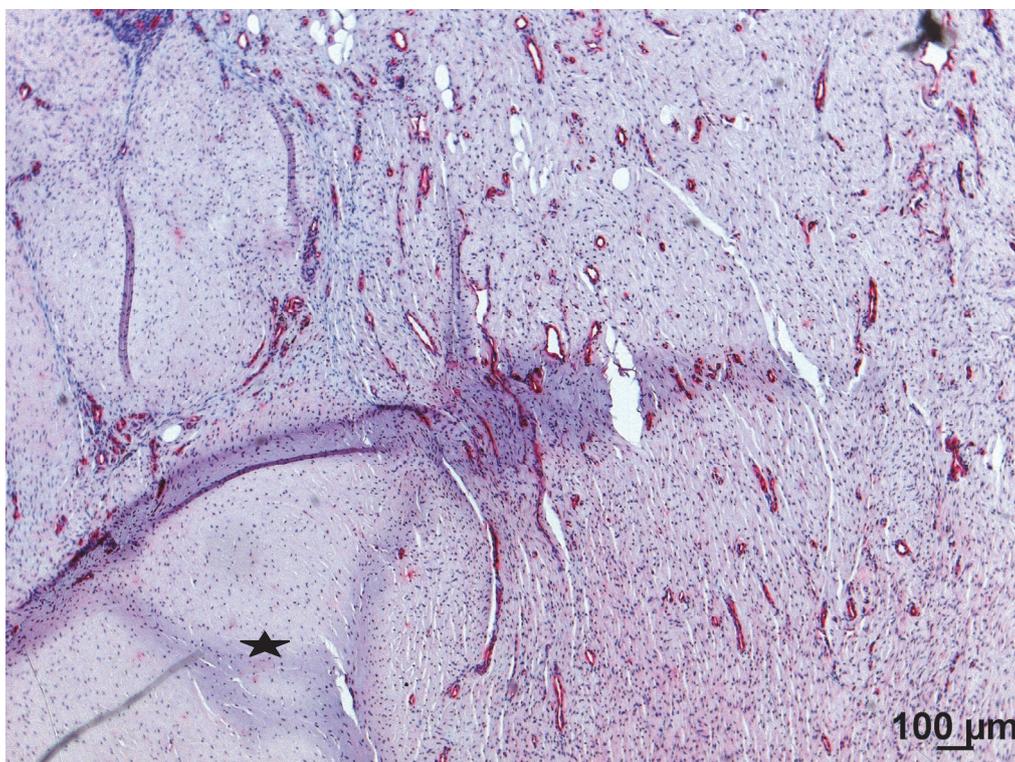


Abb. 35 Implantat 6 Monate post Op. In diesem Präparat sind ebenfalls alle Bereiche vaskularisiert, aber die Verteilung nicht in allen Bereichen so homogen wie bei den vorherigen Präparaten (Stern). Die Gefäße stellen sich in dieser Färbung leuchtend pink dar. Minipig 290i, FVIIIrA Färbung

4.3 Kontrollpräparate

Natives Implantat

Das ursprüngliche Implantat wurde zum besseren Vergleich ebenfalls histologisch aufgearbeitet und gefärbt. In der Masson Goldner Färbung stellte es sich azellulär, bestehend aus straffen Kollagenfasern dar. Die Faserrichtung war je nach Schnittebene geordnet, eine Kollagenbündelung gab es nicht (Abb. 36, 37). Es war vollständig gefäßfrei und eine synoviale Deckschicht war nicht vorhanden.

Natives vorderes Kreuzband (VKB)

Weiterhin wurden die nativen VKB der kontralateralen Gliedmaße histologisch aufgearbeitet und gefärbt (Abb. 38, 39 und 40). In der Masson Goldner und der Movat Pentachrom Färbung waren sie normozellulär, septiert mit regelrechter Fältelung (*crimp*). Die Zellkerne waren oval bis langgestreckt und entsprachen adulten Fibrozyten. Es war eine deutliche Kollagenbündelbildung erkennbar. In den Septen eingebettet waren vereinzelte Gefäße erkennbar. Eine 2 - 4lagige synoviale Deckschicht war vorhanden. Für die Vergleichbarkeit der regulären Bandinsertion wurden Fotos eingefügt (Abb. 41 und 42). Ebenfalls wurde eine FVIIIrA Färbung der nativen VKB zum Vergleich angefertigt (Abb. 43). Hier konnten v. a. in den subsynovialen und peripheren Bereichen Gefäße nachgewiesen werden. In den bindegewebigen Septen liegend konnten sie vereinzelt auch intermediär und peripher gefunden werden.

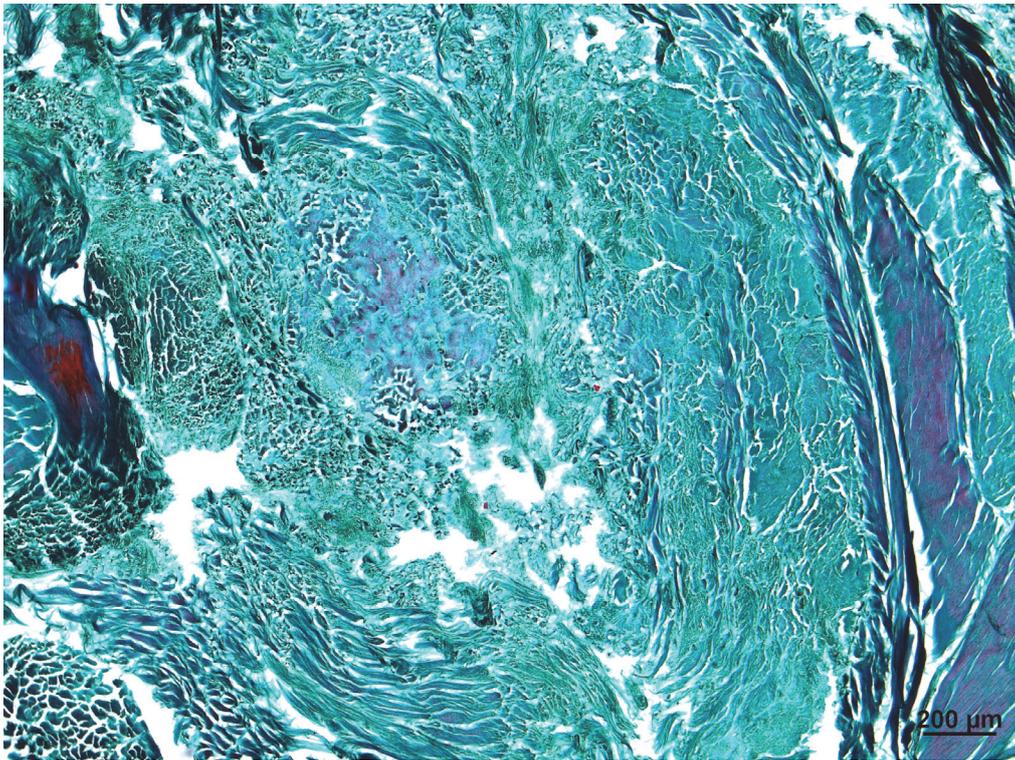


Abb. 36 Implantat nativ. Das Präparat des nativen Implantates zeigt Längst- und Querschnitte von zell- und gefäßfreien Kollagenfasern. Masson Goldner Färbung ca. x5

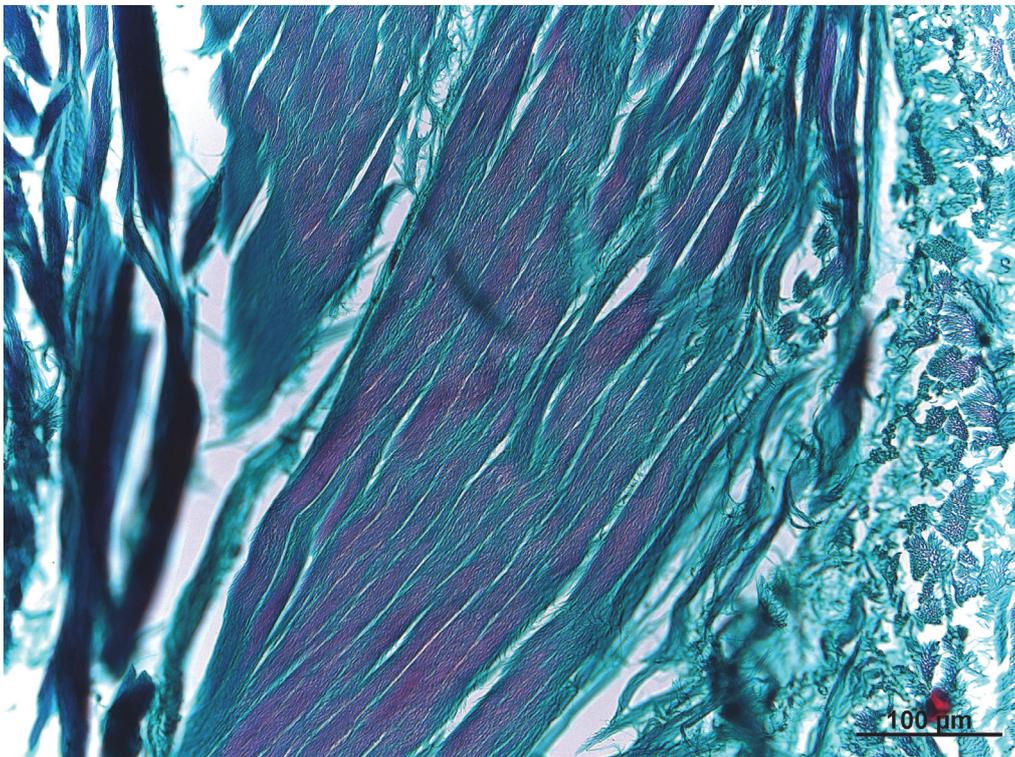


Abb. 37 Implantat nativ. Vergrößerung eines Bildausschnittes des nativen Implantates. Zell- und gefäßfreie Kollagenfasern im Längst- und Querschnitt sind erkennbar. Masson Goldner Färbung ca. x20

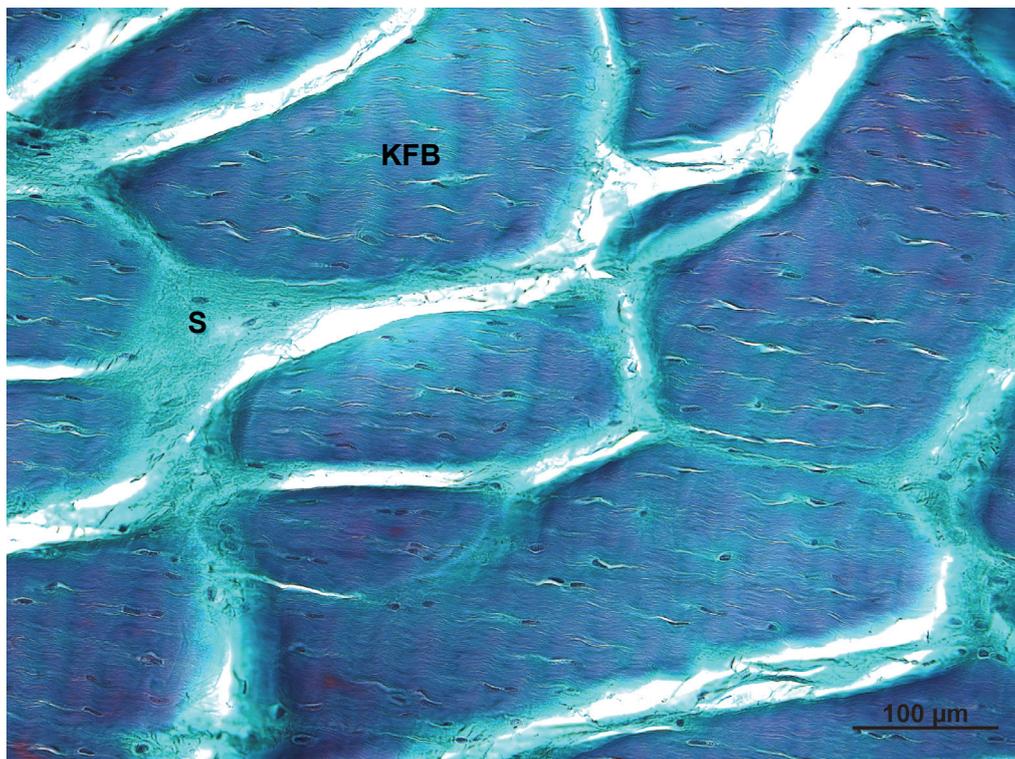


Abb. 38 VKB nativ. Präparat des nativen VKB der rechten Gliedmaße. Gut erkennbar ist die Kollagenfaserbündelung (KFB) und die Septierung (S) mit lockerem Bindegewebe. Minipig K207, Femur rechts, Masson Goldner Färbung

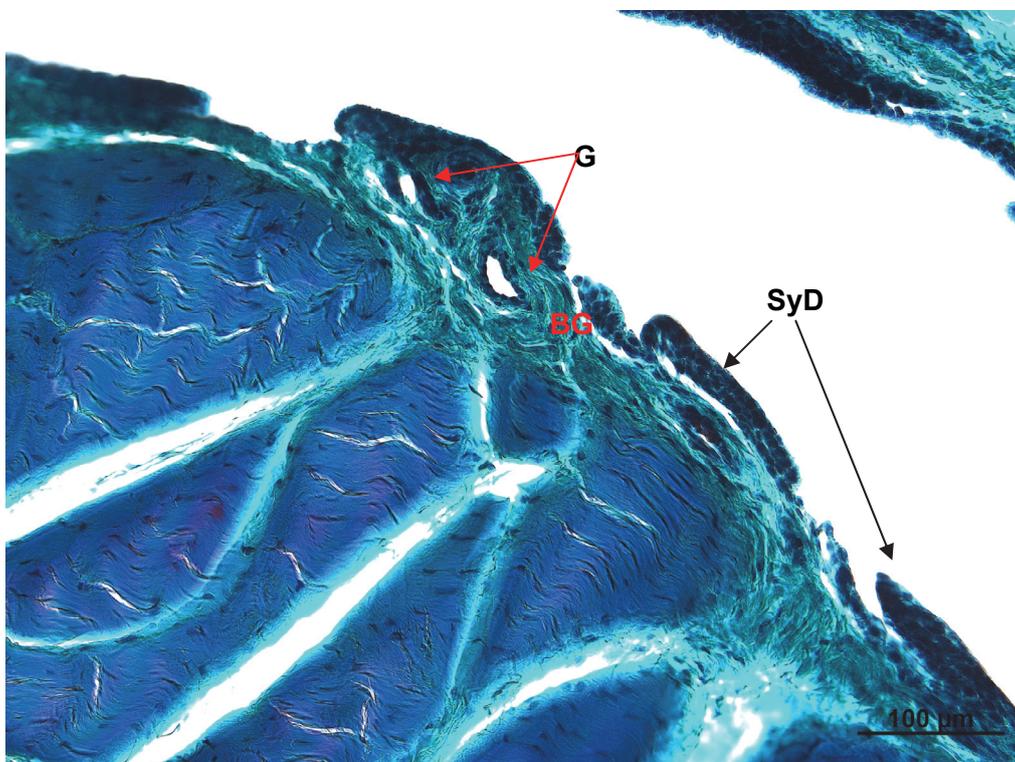


Abb. 39 VKB nativ. Auch das native VKB der rechten Gliedmaße ist von einer gefäßreichen (G) subsynovialen Bindegewebsschicht (BG) umgeben, der eine synoviale Deckschicht (SyD) aufliegt. Minipig K207, Femur rechts, Masson Goldner Färbung ca. x20

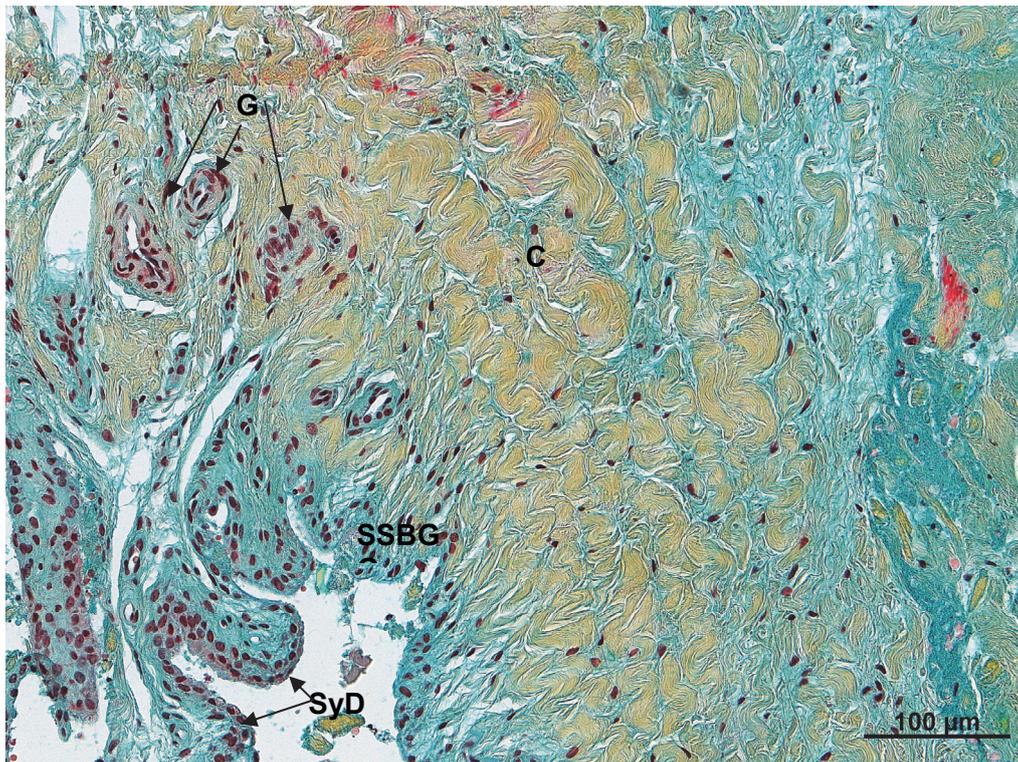


Abb. 40 VKB nativ. Natives VKB der rechten Gliedmaße mit ausgeprägter Fältelung (*crimp*; C), einer zell- und gefäßreichen (G) subsynovialen Bindegewebsschicht (SSBG) und einer synovialen Deckschicht (SyD). Minipig K203, Femur rechts, Movat Pentachrom Färbung

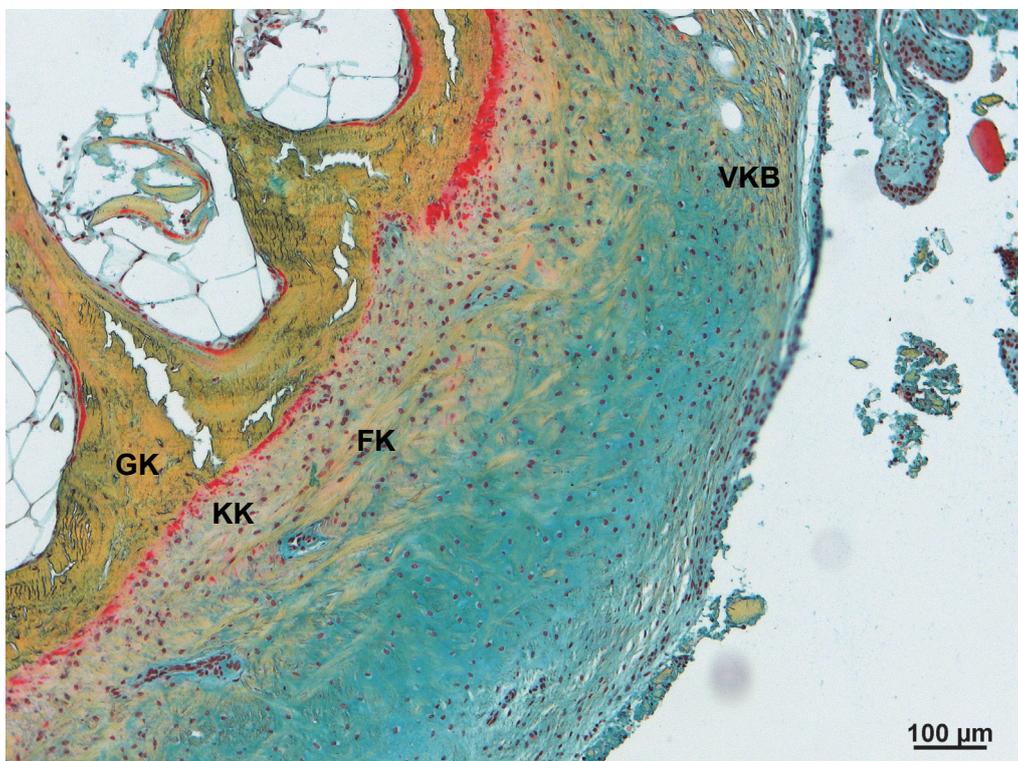


Abb. 41 VKB nativ. Peripherer Bereich der beginnenden Bandinsertion des nativen VKB der rechten Gliedmaße. 4-Zonen Aufbau mit Geflechtknochen (Gk), kalzifiziertem Knorpel (KK), Faserknorpel (FK) und VKB. Minipig K203, Femur rechts, Movat Pentachrom Färbung

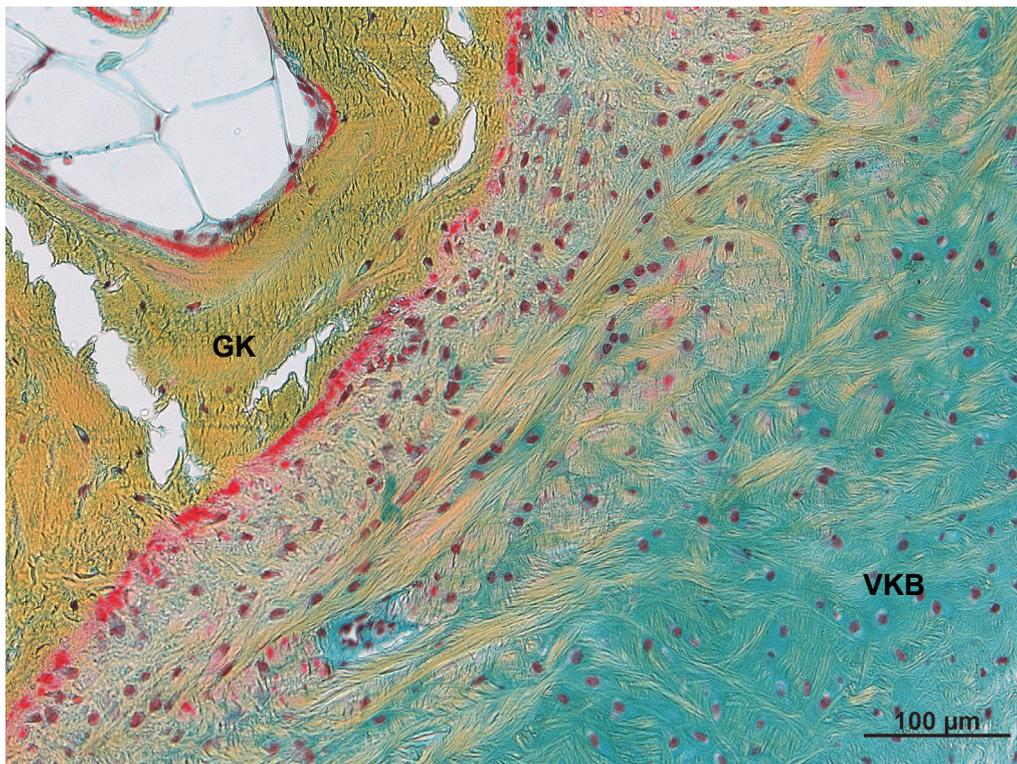


Abb. 42 VKB nativ. Vergrößerung eines Bildausschnittes des gleichen Präparates wie in Abb. 40. Geflechtknochen (GK) und inserierendes VKB. Minipig K203, Femur rechts, Movat Pentachrom Färbung



Abb. 43 VKB nativ. FVIIIrA Färbung des nativen VKB der rechten Gliedmaße. Gut erkennbar sind die nachweisbaren Gefäße im Bindegewebe des subsynovialen Bandbereichs (großer Kasten) und im Bindegewebe der Septen (Ellipse). Eine ausgeprägte synoviale Deckschicht (SyD) stellt sich ebenfalls dar. Minipig K203, Femur rechts, FVIIIrA Färbung

4.4 Nachweis von Kollagen I

4.4.1 Nachweis von Kollagen I vom Schwein mit spezifischen polyklonalen Antikörpern

In den Präparaten der Sechswochengruppe waren bei drei von sieben Präparaten angefärbte Bereiche erkennbar. In diesen Präparaten war eine gute Differenzierung zwischen Kollagen I vom Schwein und anderen Geweben möglich (Abb. 44). Bei den vier anderen Präparaten dieser Gruppe waren keine klar differenzierten Bereiche mehr erkennbar, es gab eine homogene Färbung. Diese vier Präparate wiesen zusätzlich durch einen hohen Zellgehalt auf (Abb. 45). In den femoralen Präparaten stellten sich bei drei der sieben Präparate besonders die Bereiche des Tunneleingangs und der Bandinsertionsflächen dar. Bei drei Präparaten gab es in diesen Bereichen nur eine diffuse Hintergrundfärbung (Abb. 46, 47 und 48). In allen Präparaten waren v. a. Bindegewebe und Gefäße klar gefärbt.

Die Präparate der Sechsmonatsgruppe waren deutlich homogener angefärbt, es gab nur noch wenige kleine Bereiche in denen die Färbung schwächer ausgeprägt war. Eine genaue Differenzierung war nicht mehr möglich. Lediglich in einem der sechs Präparate waren noch einige wenige Areale differenzierbar (Abb. 49, 50 und 51). Das zur Kontrolle mitgefärbte Präparat des Implantates hatte sich nicht angefärbt.

4.4.2 Nachweis von Kollagen I von der Ratte mit spezifischen polyklonalen Antikörpern

In den Bandpräparaten der Sechswochengruppe waren lediglich bei zwei der sieben Präparate dezente Farbunterschiede zwischen den zentralen und den peripheren Bereichen erkennbar, insofern, dass die peripheren Bereiche dezent heller waren. Eine spezifische Anfärbung einzelner Bereiche war nicht erkennbar. Insgesamt waren die Präparate alle homogen blass (Abb. 52, 53 und 54). In allen sieben femoralen Präparaten gab es keinen Nachweis von Kollagen I der Ratte. In den sechs Präparaten der Sechsmonatsgruppe war kein Nachweis von Kollagen I der Ratte mehr möglich (Abb. 55).

Das als Kontrolle mitgefärbte Präparat des Implantates war angefärbt (Abb. 56).

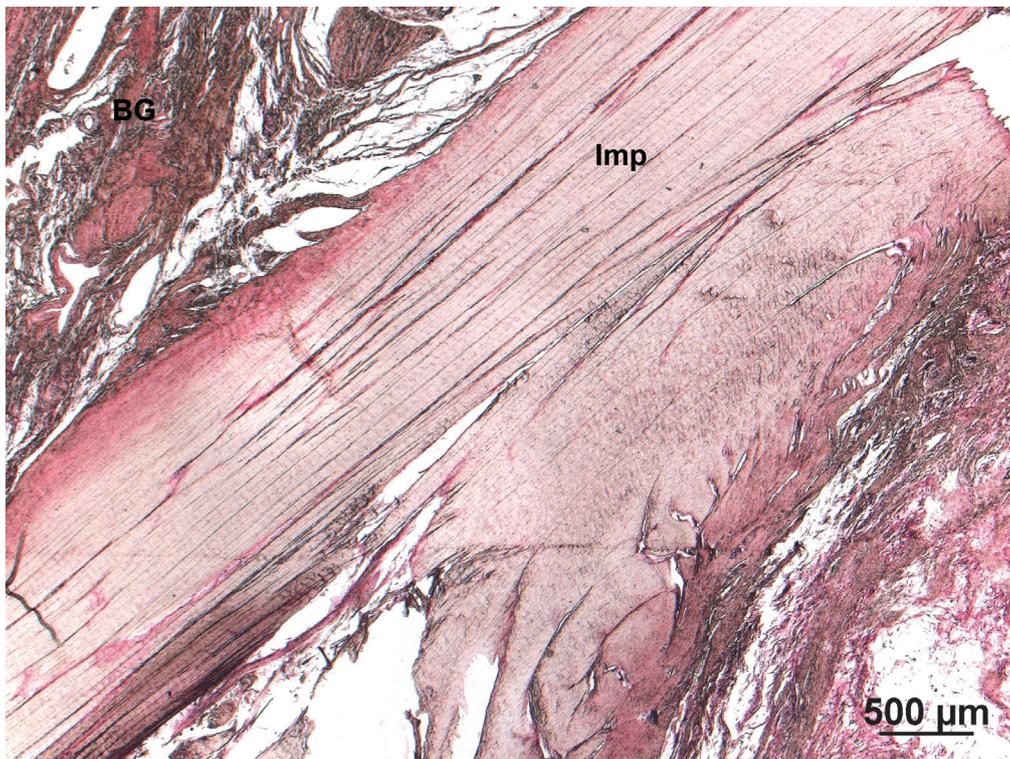


Abb. 44 Implantat 6 Wochen post Op. In diesem Präparat sind v. a. das anhängende Bindegewebe (BG) und die peripheren Implantatbereiche (Imp) markiert, zentral ist nur wenig Kollagen I vom Schwein (pink) nachweisbar. Minipig 210i, Kollagen I Färbung Schwein

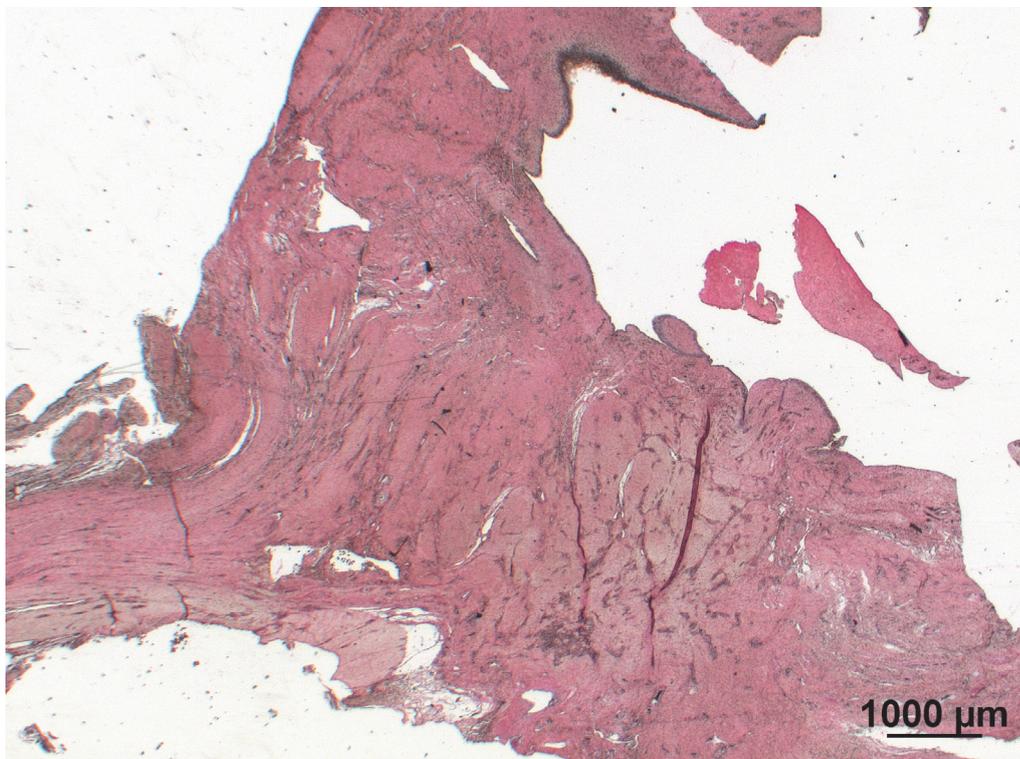


Abb. 45 Implantat 6 Wochen post Op. Das gesamte Präparat ist annähernd homogen gefärbt, einzelne Bereiche sind nur noch schwer zu differenzieren. Minipig 286i, Kollagen I Färbung Schwein (pink gefärbt)

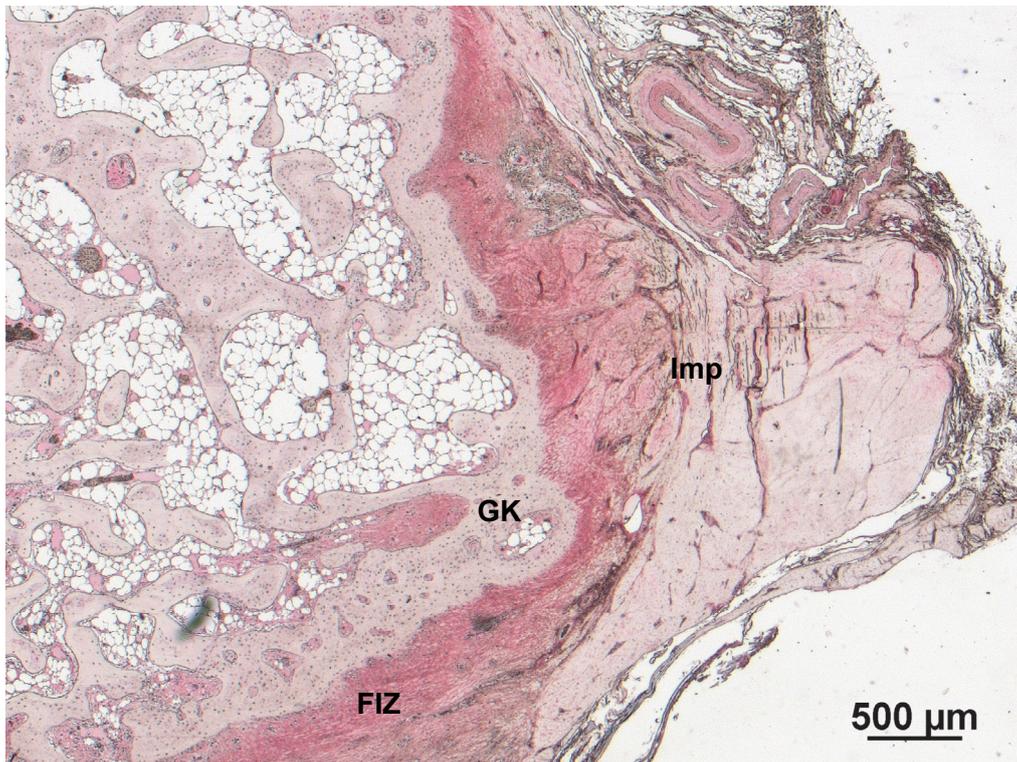


Abb. 46 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Zentrale Bereiche des Implantates (Imp) sind noch ungefärbt. Beginnende Markierung in den peripheren Implantatbereichen, ausgehend von der FIZ, die dem Geflechtknochen (GK) anliegt. Minipig 207F, Femur links, Kollagen I Färbung Schwein (pink gefärbt)

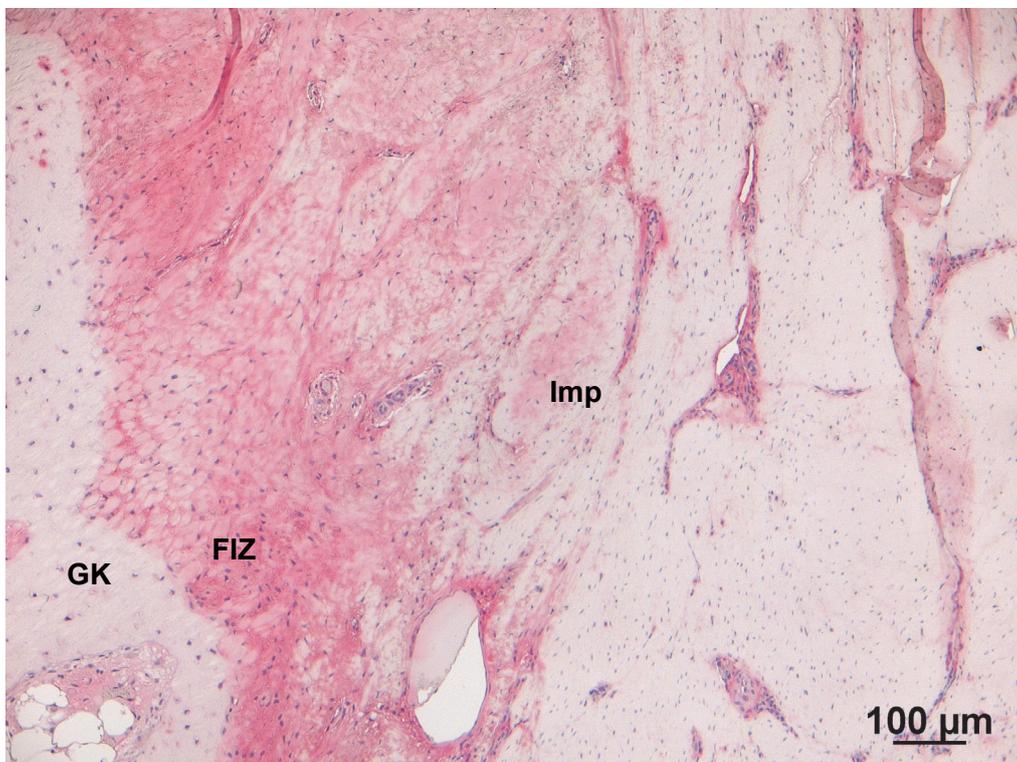


Abb. 47 Tunnelmitte 6 Wochen post Op. Deutliche Markierung im Bereich der FIZ, zwischen Geflechtknochen (GK) und Implantat (Imp) und in den peripheren Implantatbereichen. Minipig 207F, Femur links, Kollagen I Färbung Schwein (pink gefärbt)

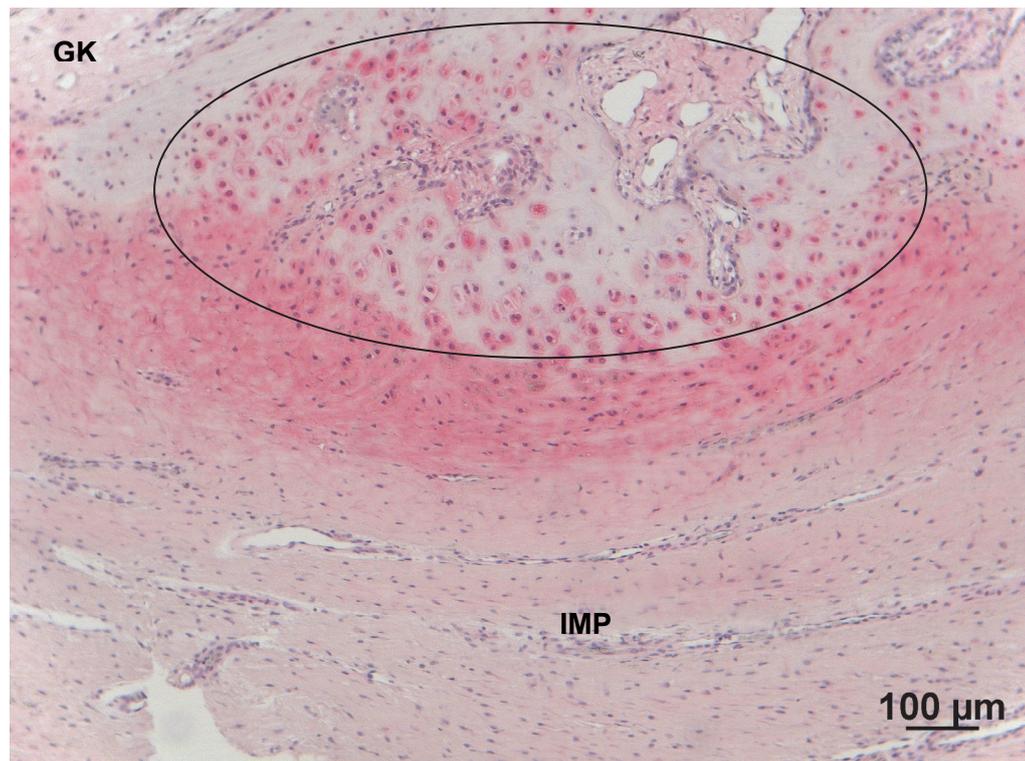


Abb. 48 Bandinsertion 6 Wochen post Op. Dem Geflechtknochen (GK) folgende chondroide Zellen (Ellipse) und Bindegewebszellen sind deutlich markiert. Das Implantat (Imp) ist zentral noch unmarkiert. Minipig 209F, Femur links, Kollagen I Färbung Schwein (pink gefärbt)

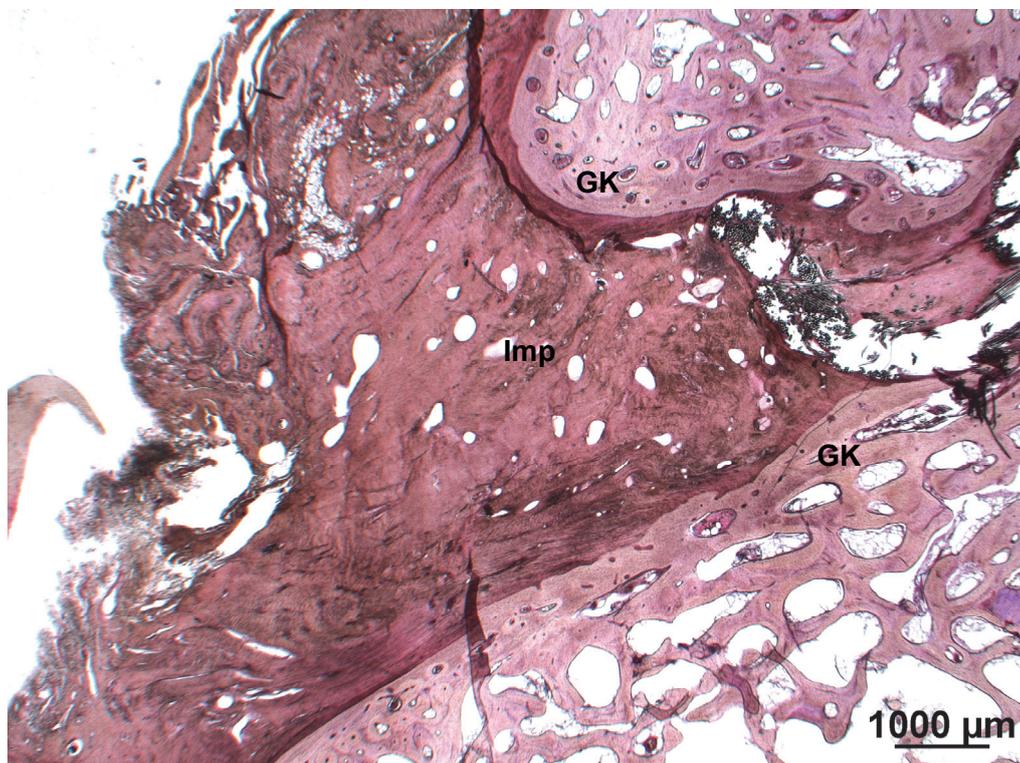


Abb. 49 Tunnelausgangsbereich 6 Monate post Op. Das gesamte Implantat (Imp) ist deutlich markiert, zu beiden Seiten der deutlich schwächer gefärbte Geflechtknochen (GK). Minipig 290F, Femur links, Kollagen I Färbung Schwein (pink gefärbt)



Abb. 50 Bandinsertion 6 Monate post Op. Ausgehend vom deutlich markierten Insertionsgebiet am Geflechtknochen (GK), ist nun das gesamte Implantat (Imp) homogen gefärbt. Minipig 222F, Femur links, Kollagen I Färbung Schwein (pink gefärbt)

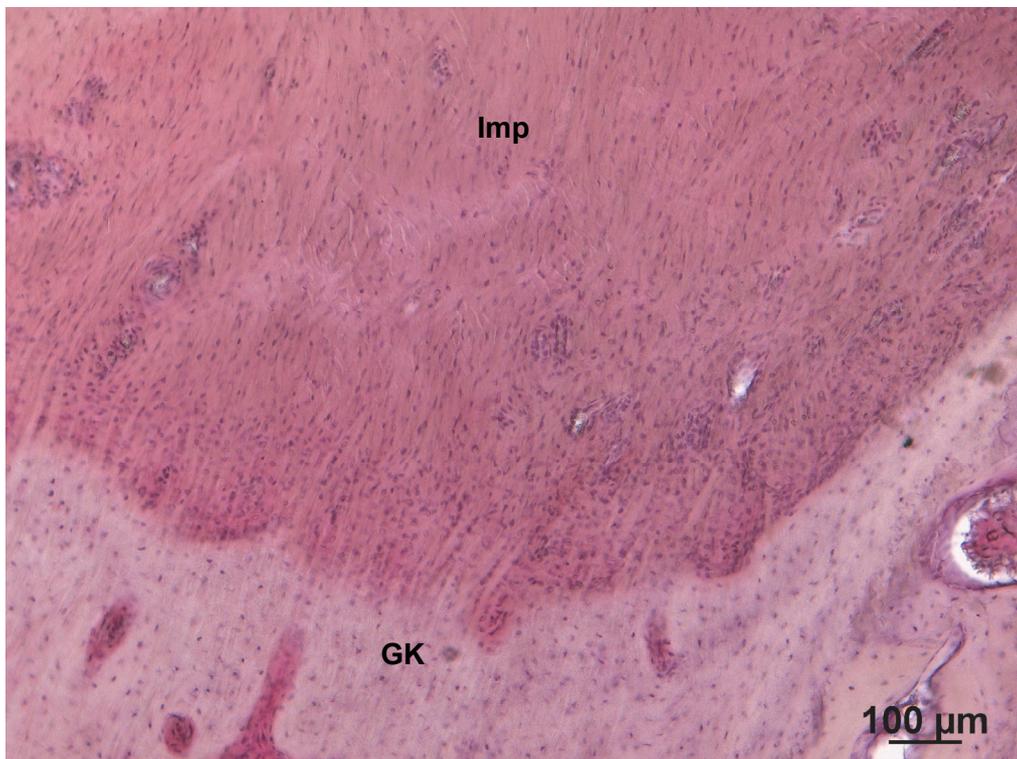


Abb. 51 Tunnelausgang 6 Monate post Op. Detailaufnahme des deutlich markierten Insertionsgebietes am Geflechtknochen (Gk). Das gesamte Implantat (Imp) ist homogen gefärbt. Minipig 290F, Femur links, Kollagen I Färbung Schwein (pink gefärbt)

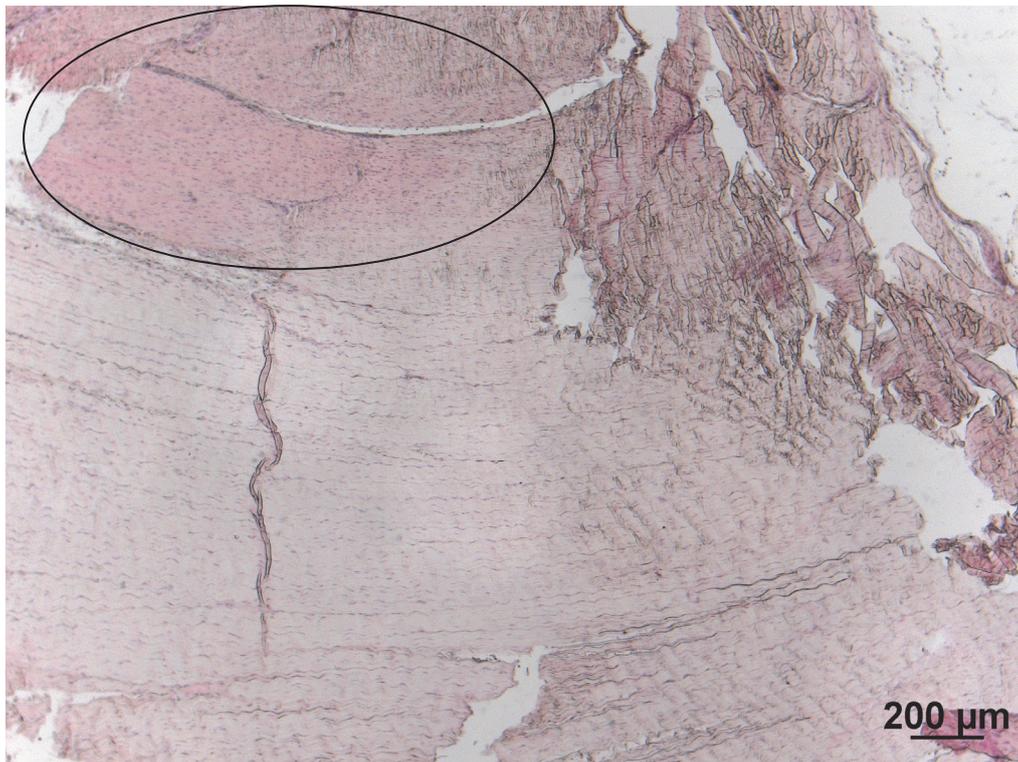


Abb. 52 Implantat 6 Wochen post Op. Es war nur eine ggr. Markierung in vereinzelt Implantatbereichen sichtbar (Ellipse), im restlichen Präparat ist kein Kollagen I der Ratte nachweisbar. Minipig 209i, Kollagen I Färbung (pink gefärbt) Ratte

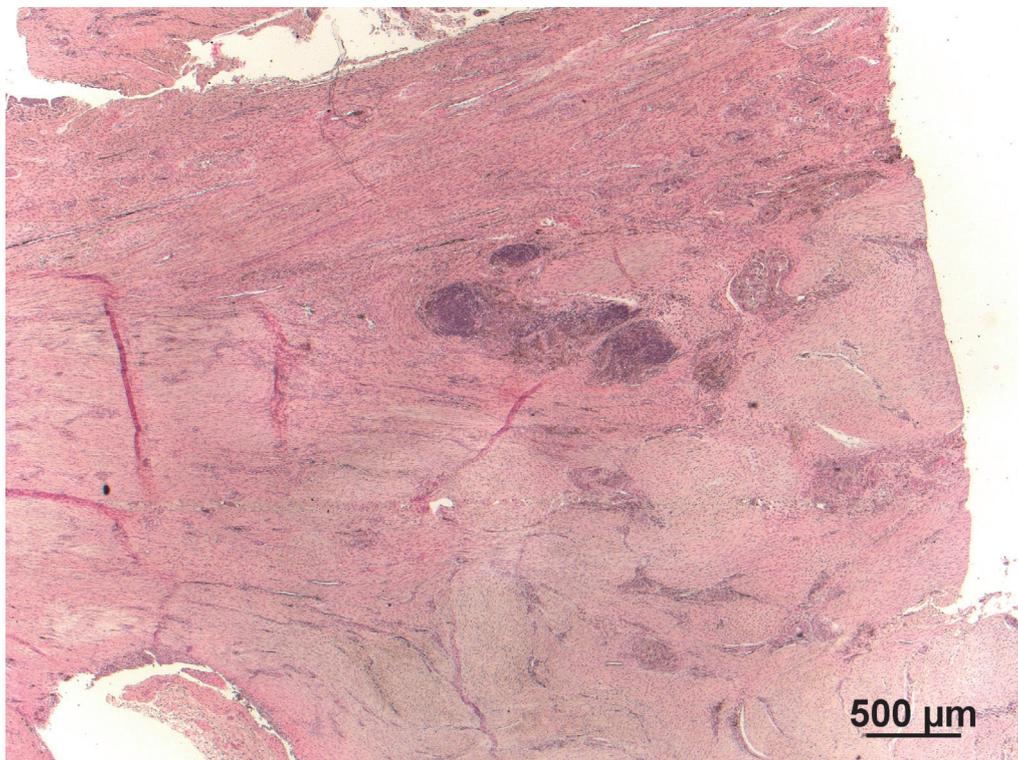


Abb. 53 Implantat 6 Wochen post Op. Das gesamte hyperzelluläre Präparat ist unterschiedlich stark gefärbt, eine Differenzierung einzelner Bereiche ist nicht möglich. Minipig 215i, Kollagen I Färbung Ratte (pink gefärbt)

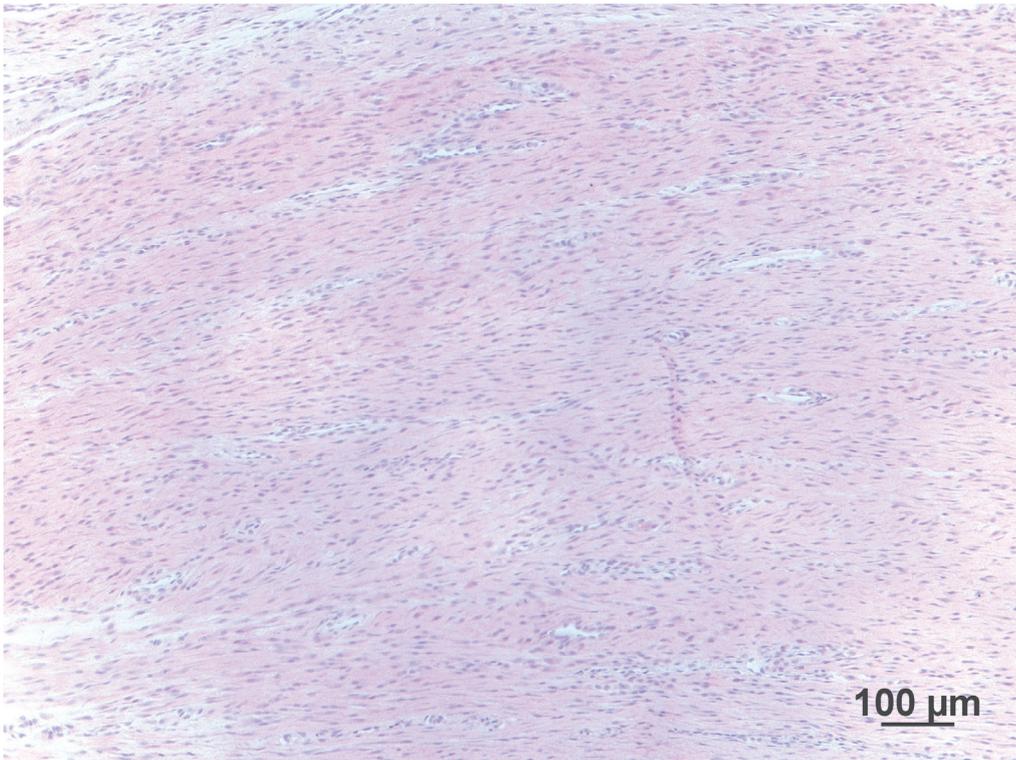


Abb. 54 Implantat 6 Wochen post Op. Detailaufnahme des zentralen Bereiches eines Implantates. Nur ggr. Hintergrundfärbung erkennbar, eine klare Differenzierung ist nicht möglich. Minipig 286i, Kollagen I Färbung Ratte (pink gefärbt)

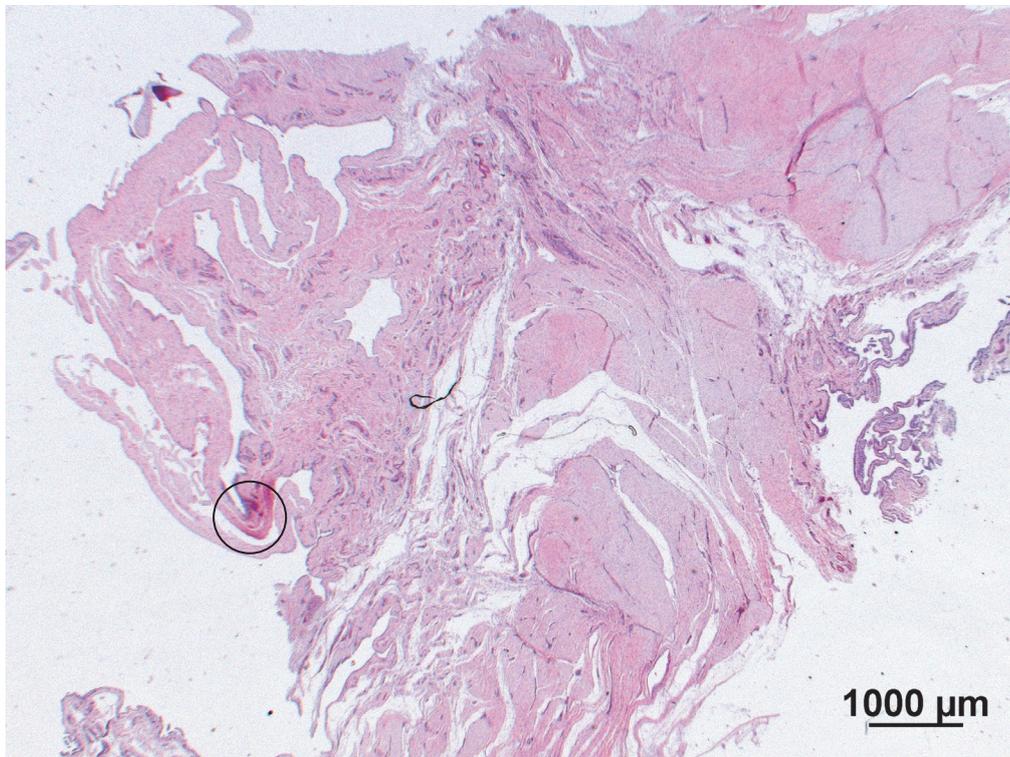


Abb. 55 Implantat 6 Monate post Op. Übersichtsaufnahme. Nur ggr. diffuse Hintergrundfärbung erkennbar, lediglich in einem kleinen Bereich (Kreis) ist eine spezifische Anfärbung erkennbar. Minipig 203i, Kollagen I Färbung Ratte (pink gefärbt)

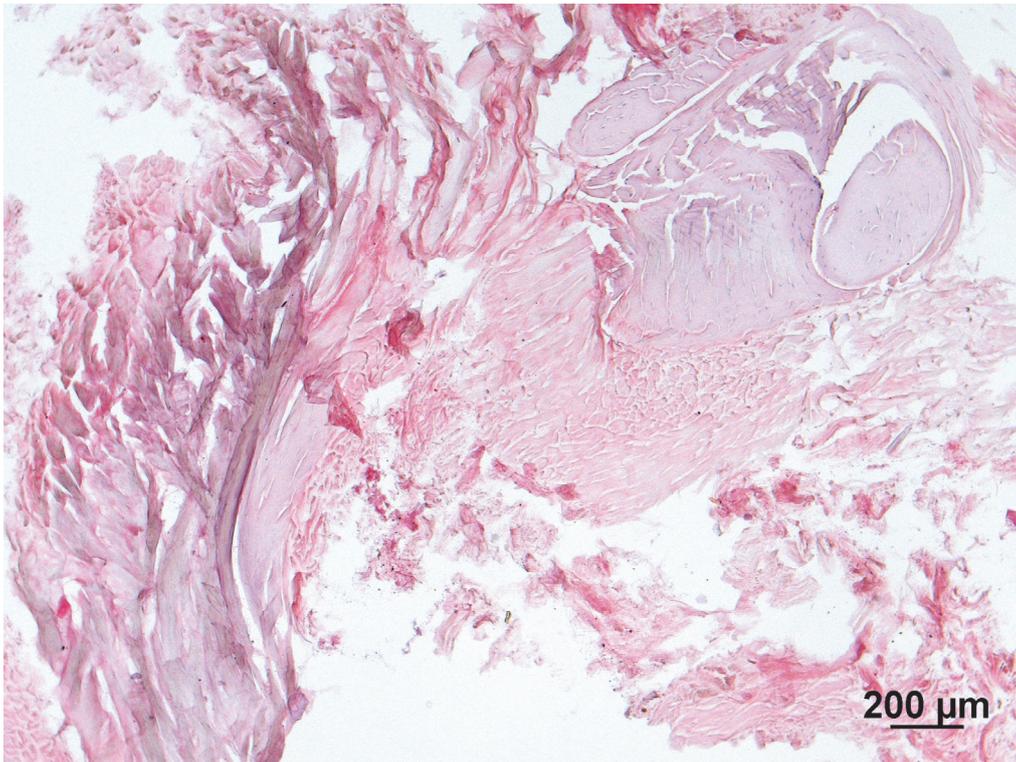


Abb. 56 Implantat nativ. Das Präparat des nativen Implantats ist deutlich gefärbt. Kollagen I Färbung Ratte (pink gefärbt)

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde die Einheilung eines xenogenen Implantates zur Rekonstruktion des VKB untersucht. Dabei wurden primär der intraartikuläre Bandumbau und die Implantateinheilung in einem Zeitraum bis sechs Monate post operationem untersucht. Die Entwicklung der mechanischen Eigenschaften über die Zeit wurde in einer anderen Dissertation untersucht (Simon Bischoffsberger, „Biomechanische Untersuchung von biomaterialbasierten Kreuzbandkonstrukten.“).

Es wurde ein neuartiges Implantat aus Rattenkollagen entwickelt und zur Rekonstruktion des VKB benutzt. Ziel dieser Entwicklung war ein Implantat, das im Gegensatz zu den derzeit üblichen autologen Transplantaten keine Risiken hinsichtlich der Entnahmemorbidität und daraus resultierende postoperative Komplikationen birgt. Beurteilt wurden die Bandeinheilung anhand des *Remodelings* und der Revaskularisierung. Zusätzlich wurde die Ausbildung der Bandinsertion beurteilt.

5.1 Das Tiermodell

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Tiermodell mit Minipigs gewählt. Alle Tiere waren älter als ein Jahr. Zum Ausschluss geschlechtsspezifischer Einflüsse auf die Ergebnisse, wurden männliche und weibliche Tiere gleichmäßig auf die einzelnen Versuchsgruppen verteilt. Die Ergebnisse beider Geschlechter unterschieden sich nicht.

Es gab bisher die verschiedensten Tiermodelle für Untersuchungen des VKB.

Wen et al. (2010) sowie Wallace und Amiel (1991) haben ihre Untersuchungen an Kaninchen durchgeführt. Bei den Untersuchungen von Wallace und Amiel (1991) stellte sich allerdings heraus, dass das Bandgewebe beim Kaninchen avaskulär ist. Weiterhin ist die minimale Belastung des Transplantates post operationem, bedingt durch die Käfighaltung der Kaninchen, ein Faktor, der die Vergleichbarkeit mit der Humanmedizin stark einschränkt.

Murray et al. (2004) untersuchten das zelluläre und mikrovaskuläre Erscheinungsbild verschiedener Spezies. In ihrer Untersuchung zeigte das ovine VKB eine höhere Vaskularität und Zellularität im Vergleich zum humanen VKB. Das VKB des Hundes kam dem humanen VKB am nächsten (MURRAY et al. 2004).

Goertzen et al. (1993) stellten bei ihren Untersuchungen am Hund sechs Wochen nach Ersatz des VKB die Ausbildung von Knorpeldefekten im Kniegelenk fest. Sie wirkten sich störend auf den Heilungsverlauf des VKB Ersatzes aus. Diese Beobachtung machten Tomita et al. (2001) in ihrem Hundemodell allerdings nicht, ihre Begrenzung waren die zu kurzen und zu dünnen *Hamstringsehnen* des Hundes.

Das Schaf hat sich in vielen Studien bewährt (BOSCH u. KASPERCZYK 1992; RADFORD et al. 1996; RUSHTON et al. 1998; WEILER et al. 2001; SCHEFFLER et al. 2008). Seine Anatomie, Biomechanik und Morphologie des Kniegelenkes ähnelt stark der des Menschen. Die zellulären Abläufe während des *Remodelingprozesses* sind durchaus mit denen des Menschen vergleichbar (SCRANTON et al. 1998). Seitz et al. (1997) untersuchten die Gefäßversorgung des ovinen VKB mittels Injektionstechnik. Das ovine VKB wird durch die A. genicularis media, die von der A. poplitea stammt und der A. genicularis descendens, die von der A. femoralis stammt, versorgt. Sie bilden im Bereich der synovialen Scheide ein periligamentöses Gefäßnetz, aus dem wiederum kleinste Gefäße in die VKB einsprossen und als intraligamentäre Gefäße zur Versorgung beitragen. Diese Gefäßversorgung entspricht der des humanen VKB (SEITZ et al. 1997).

1998 verglichen Xerogeanes et al. die VKB von Schwein, Ziege und Schaf und stellten fest, dass das VKB des Schweines dem des Menschen am ähnlichsten ist. Vor allem die Ähnlichkeit zum menschlichen Knie, die Größe und die Vergleichbarkeit mit anderen großen Tiermodellen bei der VKB Rekonstruktion sprechen für das Schweinemodell (XEROGEANES et al. 1998). Auch hämatologische Charakteristika entsprechen denen des Menschen, was wichtig ist für die Vergleichbarkeit der Wundheilung (MUELLER et al. 2001).

Die Haltung und der Umgang mit Schweinen als Versuchstiere werden oftmals als schwierig empfunden, daher werden sie selten verwendet. Fleming et al. (2009)

arbeiteten in ihrer Studie ebenfalls mit einem Schweinemodell und erklärten, dass Arbeit und Pflege relativ einfach sind.

Die Haltung und der Umgang mit den in dieser Untersuchung verwendeten Minipigs gestalteten sich problemlos. Minipigs sind kleiner und leichter als Hausschweine, daher sind sowohl Haltung und auch Umgang mit ihnen deutlich erleichtert. Mit den o. g. anatomischen und biologischen Vorteilen des Schweines stellte das Minipig das ideale Versuchstier für die vorliegende Studie dar.

Bei allen Untersuchungen zum Ersatz des VKB am Tiermodell stellte das postoperative Management einen Diskussionspunkt dar. Post operationem durchlaufen Menschen ein differenziertes Nachbehandlungsprotokoll mit Entlastung der Gliedmaße und gezielten physiotherapeutischen Maßnahmen. Diese kontrollierte Rehabilitation erfolgt über Wochen bis Monate. Im Gegensatz dazu kommt es im Tiermodell post operationem nach Abklingen der initialen Beschwerden zu einer uneingeschränkten Belastung der operierten Gliedmaße. Diese frühzeitige unkontrollierte Belastung kann sowohl den Heilungsprozess beeinflussen als auch zum Implantatversagen führen. In dieser Studie wurde kein Implantatversagen im Sinne von Ausreißen des Implantates durch erhöhte Belastung beobachtet. Alle Tiere belasteten die operierte Gliedmaße spätestens ab der sechsten Woche.

5.1.1 Das Implantat

Im Gegensatz zu den oben angeführten Tiermodellen wurde in der vorliegende Studie ein xenogenes Implantat verwendet. Dazu wurden Kollagenfasern aus Rattenschwänzen isoliert und anschließend zur Sterilisation einer Gamma-Bestrahlung unterzogen.

In Voruntersuchungen wurden die Auswirkungen der Gamma-Sterilisation auf das Implantat getestet, sie hatte keine Auswirkungen auf die Reißfestigkeit. Auch der schonende Umgang mit den Kollagenfasern bei deren Gewinnung war sicherlich ausschlaggebend für die gute Reißfestigkeit. Bei der hier angewandten Technik wurden die Fasern bei der Gewinnung nicht gezupft, sondern durch Drehung der einzelnen Wirbelkörper schonend gelöst.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Gamma-Sterilisation der Implantate mit einer Bestrahlungsdosis von über 25 kGy durchgeführt. Diese Bestrahlung diente in erster Linie der Sterilisation der Implantate. Weiterhin führte die Bestrahlung in dieser Dosis zusammen mit dem durchgeführten Waschverfahren dazu, dass keinerlei zelluläre Komponenten an der Faser blieben, es handelte sich also um einen reinen Kollagenfaden. Durch diese Vorgehensweise wurden Immunreaktionen nahezu ausgeschlossen. In der histologischen Auswertung gab es keine Anzeichen für Immunreaktionen.

Auch Stone et al. (2007) verwendeten ein xenogenes Transplantat zur VKB Rekonstruktion. Sie untersuchten die Heilung und die Funktionalität eines vorbehandelten Patellarsehnentransplantates aus dem Schwein an Rhesusaffen. Histologisch fanden sie eine zelluläre Infiltration und ein *Transplantatremodeling*, welche den Mechanismen der Ligamentisierung entsprachen. Biomechanisch konnten sie keine Unterschiede zu den allogenen Transplantaten feststellen (STONE et al. 2007).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Verwendung xenogener Materialien durchaus möglich ist, dass aber spezielle Vorbehandlungen, ähnlich denen bei allogenen Materialien, nötig sind, um Immunreaktionen zu vermeiden.

5.1.2 Die Implantatverankerung

Die Verankerung der Implantate in dieser Studie wurde extraartikulär und indirekt, mittels *Endobutton* durchgeführt. Diese Fixationsart wurde gewählt, um die Untersuchung der Knochen-Band-Einheilung nicht durch Implantate wie Interferenzschrauben oder *Cross-Pins* zu erschweren bzw. zu beeinflussen. Des Weiteren wurde diese Art der Verankerung in Tiermodellen häufig gewählt und ermöglichte so die Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen. Auch bei knochenblockfreien Transplantaten beim Menschen wird diese Fixationstechnik noch häufig angewendet.

Erwähnt werden muss jedoch, dass diese Art der Verankerung eine andere Knochen-Band-Einheilung und ein anderes *Remodeling* zeigen kann als eine anatomische Verankerung auf Gelenkkniveau. So kann es z. B. zu verstärkten Transplantat- / Implantatbewe-

gungen kommen. Mögliche Folgen sind eine elastische, longitudinale Verformung mit Scherbewegungen und horizontalen Bewegungen mit Scheibenwischereffekt sowie eine verzögerte Einheilung des Gewebes am Tunneleingang (JANSSON et al. 1999). Es kann eine Aufweitung des Bohrkanals entstehen, die eine Insuffizienz in Form von Eindringen synovialer Flüssigkeit und daraus folgendem Implantatversagen nach sich zieht (MÜLLER et al. 2007). Die Vorteile der knochenblockfreien Transplantate sind ihre hohe Ausreißfestigkeit und der vollständige Kontakt zwischen Transplantat und Knochen im Bohrkanal (LÜTZNER u. BOTTESI 2009), daraus resultiert eine gute Einheilung. Ma et al. (2004) verglichen in einer Untersuchung die femorale Fixierung mittels modifizierter Endobutton-Technik und die Verankerung mittels Schraube. Sie konnten keine Unterschiede der klinischen Parameter feststellen, Tunnelaufweitungen wurden bei beiden Techniken beobachtet (MA et al. 2004).

In vielen anderen Studien wurden Interferenzschrauben im *press-fit* Verfahren angewandt (WEILER et al. 2002; HUNT et al. 2006). Weiler et al. (2002) verglichen in einer Arbeit die Bandinsertion von anatomischen, mit biodegradierbaren Interferenzschrauben fixierten Transplantaten mit nicht anatomischen, extrakortikal fixierten Transplantaten. 24 Wochen post operationem waren bei den mit Interferenzschrauben fixierten Transplantaten direkte Bandansätze ausgebildet. In der anderen Gruppe gab es zu diesem Zeitpunkt keine Anzeichen einer direkten Bandinsertion (WEILER et al. 2002). Auch Hunt et al. (2006) fixierten ihre Implantate mit biodegradierbaren Interferenzschrauben und konnten ebenfalls bereits nach 24 Wochen einen direkten Bandansatz nachweisen. Allerdings fanden sie zu früheren Zeitpunkten auch Rundzellinfiltrate und Fremdkörperriesenzellen in Implantatnähe. Die biodegradierbare Interferenzschraube war nach 104 Wochen vollständig verschwunden (HUNT et al. 2006).

Nachteilig ist die Gefahr der Beschädigung des Transplantates durch die Interferenzschraube. Besonders bei Verwendung großer Schrauben mit scharfen Windungen besteht die Gefahr der Transplantatbeschädigung. Lützner und Bottesi (2009) beschrieben weiterhin eine im Vergleich verringerte Primärstabilität und v. a. tibial die Gefahr des Herausgleitens des Transplantates bei zu klein dimensionierter Schraube.

In der vorliegenden Untersuchung wurden keine Hinweise auf eine Bohrkanalweitung oder eine verzögerte Knochen-Band-Einheilung gefunden. Ein Implantatversagen kam nicht vor.

5.2 Histologie

5.2.1 Die Übersichtsfärbungen

Für die histologischen Auswertungen wurden verschiedene Färbungen angefertigt. So wurden für die Übersicht eine HE-Färbung und eine Masson Goldner Trichrom Färbung angefertigt. Die Masson Goldner Trichrom Färbung wurde zur Zelldifferenzierung insbesondere bindegewebiger und knöcherner Strukturen genutzt. Mit dieser Färbung wurden Aussagen hinsichtlich der Zellularität, Nekrosen und Rundzellinfiltrationen gemacht. In der Movat Pentachrom Färbung wurden die Art der Bandinsertion, chondroide Zellen und Mineralisationsfronten dargestellt und beurteilt.

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Bandinsertion im Hinblick auf eine direkte Bandinsertion gelegt. Hierfür wäre eine Färbung zur besseren Differenzierung chondroider Zellen und deren evtl. Mineralisation vorteilhaft gewesen. So verwendeten Hunt et al. (2006) in ihrer Studie zur VKB Rekonstruktion im Schaf für die Beurteilung der Bandinsertion zusätzlich zur Masson Goldner Trichrom Färbung eine kombinierte Safranin-O / von-Kossa Färbung und eine Alcianblau Färbung. Besonders die Alcianblau Färbung wurde für die Beurteilung der knorpeligen Strukturen genutzt. Mineralisierte Strukturen beurteilten sie in der kombinierten Safranin-O / von-Kossa Färbung (HUNT et al. 2006). Auch Weiler et al. (2002) benutzten für die Beurteilung der Bandinsertion zusätzlich eine Safranin-O / von-Kossa Färbung und eine Alcianblau Färbung. Allerdings lag das Augenmerk dieser Untersuchungen im Gegensatz zu der vorliegenden Studie auf der Implantatfixierung und deren Auswirkung auf die Knochenheilung und die Ausbildung der Bandinsertion.

Die Knochenheilung des Bohrkanals und mineralische Fronten sind stark von der Fixationsart des Implantates abhängig. Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung

eine gängige und gut vergleichbare Fixation mittels *Endobutton* gewählt. Die Fixation bei klinischem Einsatz ist bisher noch offen.

Hunt et al. (2006) und Weiler et al. (2002) benutzten beide zusätzlich noch die Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurden Fluorochrome wie z. B. Xylol orange oder Tetrazykline den lebenden Tieren verabreicht. Bei der späteren histologischen Auswertung repräsentierten sie die Knochenmineralisation zum Zeitpunkt der Verabreichung und erlaubten so die Auswertung des Knochenwachstums bis zum Zeitpunkt der Probengewinnung (HUNT et al. 2006; WEILER et al. 2002). Im Hinblick auf die Beurteilung des Bohrkanals wären so in der vorliegenden Studie noch genauere Aussagen über eine evtl. Tunnelaufweitung oder -verengung möglich gewesen.

Im Gegensatz zu den oben angeführten Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk der vorliegenden Studie auf der Bandheilung, bzw. dem *Remodeling* des Implantates, nicht auf der Heilung in Abhängigkeit der Fixationsart. Für die Beurteilung des *Remodelings* wurden daher spezielle immunhistochemische Färbungen angefertigt.

Durch die in dieser Studie verwendete Movat Pentachrom Färbung waren Osteoidsäume und neugebildeter Geflechtknochen differenzierbar, auch chondroide Zellen waren darstellbar. Für die Beurteilung der Knochen-Band-Heilung war die Movat Pentachrom Färbung daher gut geeignet. Eine sensitivere Färbung zur Beurteilung dieser Strukturen war daher nicht nötig.

5.2.2 Die Gefäßdarstellung

Zur Beurteilung der Revaskularisierung wurde eine immunhistochemische FVIIIrA (Faktor-VIII-related Antigen, Trägerprotein des Von-Willebrandt-Faktors) Färbung benutzt. Hierbei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, mit der bereits kleinste Kapillaren ab einer sehr frühen Phase der Revaskularisierung dargestellt werden können.

In vielen bisherigen Studien, die sich mit der Revaskularisierung von Kreuzbandimplantaten beschäftigten, wurden weniger sensitive Methoden genutzt. Dabei gehören Farbstoff- oder Kontrastmittelinjektionen wohl zu den ältesten Methoden (SEITZ et al. 1997; CLANCY et al. 1981). Die Limitation dieser Methode besteht in der Größe der

Gefäße und einer adäquaten Partikelgröße des Farb- oder Kontrastmittels, um dieses auch in kleinste Kapillaren vordringen zu lassen. Oftmals wird nicht das gesamte Kapillarnetz erfasst (PETERSEN u. TILLMANN 1999). Weiterhin besteht durch zu hohen Injektionsdruck die Gefahr falsch positiver Ergebnisse, da Kontrastmittel paravasal austreten kann (PETERSEN u. TILLMANN 1999).

Deutlich eleganter ist die Laser – Dopplerflowmetrie. Sie ist nicht invasiv und stellt oberflächliche Blutflüsse in Geweben bis zu einer maximalen Messtiefe von 250 µm *in vivo* dar (JAKOBSSON u. NILSSON 1993). Für die vorliegende Studie war diese Methode jedoch nicht anwendbar, da der Blutfluss nur an lebenden Tieren darstellbar ist und die begrenzte Messtiefe nicht für die Darstellung intraligamentärer Kapillaren ausgereicht hätte.

Eine weitere immunhistochemische Variante wäre die Markierung von *alpha-smooth muscle* Aktin gewesen. Mit dieser Methode lassen sich die glatten Muskelzellen der Gefäße darstellen. Früheste Kapillaren haben allerdings keine glatten Muskelzellen, daher wäre die frühe kapilläre Phase der Heilung nicht darstellbar gewesen.

Bei der immunhistochemischen FVIIIrA Färbung wurde das in den Endothelzellen kleinsten Kapillaren vorkommende Trägerprotein des Faktor-VIII, Von-Willebrand-Faktor, mittels Markierung durch polyklonale Antikörper angefärbt. Dafür war das Vorhandensein glatter Muskelzellen nicht nötig. Sie stellt damit besonders zur Darstellung der frühen, auf kapillarer Ebene ablaufenden Revaskularisierung die Methode der Wahl dar (UNTERHAUSER et al. 2003).

5.2.3 Das *Bandremodeling*

Zum Nachweis des *Implantatremodelings* und damit der Einheilung der Implantate wurde eine immunhistochemische Kollagen I Färbung angefertigt. Diese Kollagen I Färbung wurde einmal mit polyklonalen spezifisch gegen Schweinekollagen I gerichteten Antikörpern und einmal mit polyklonalen spezifisch gegen Rattenkollagen I gerichteten Antikörpern durchgeführt. Zusätzlich zu diesen Präparaten wurden Präparate des nativen Implantates mit gefärbt. Mit dieser Färbung sollte noch bestehendes Rattenkollagen I des

Implantates nachgewiesen werden bzw. durch den Nachweis von Schweinekollagen I ein *Remodeling* des Implantates durch das Versuchstier nachgewiesen werden.

Ein zusätzlicher immunhistochemischer Nachweis der Myofibroblastenexpression in den Präparaten der vorliegenden Studie wäre nützlich gewesen. Murray und Spector (1999) identifizierten diese Zellen in intakten und rupturierten humanen VKB und postulierten, dass sie verantwortlich sind für das „*crimping*“ der Kollagenfasern. Weiler et al. (2002) identifizierten Myofibroblasten in heilenden VKB Transplantaten bei Schafen und zeigten, dass diese Zellen signifikant das *Remodelingverhalten* der Transplantate beeinflussen, indem sie kontraktile Kräfte auf die extrazelluläre Matrix ausüben (WEILER et al. 2002; MASUR et al. 1996; HARRIS et al. 1981). Laut Dustmann et al. (2008) können sie daher als möglicher Indikator des Ligamentisierungsprozesses angesehen werden.

In der vorliegenden Studie wurde eine Kollagen I Färbung angefertigt, da aufgrund der Verwendung von Kollagen zweier verschiedener Spezies der spezifische Nachweis von Kollagenen der einen oder der anderen Art möglich war. So kann z. B. der Nachweis von schweinespezifischem Kollagen I in den Implantaten als Beweis für einen Ligamentisierungsprozess bzw. einen *Remodelingprozess* angesehen werden.

5.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde ein freies Kollagenimplantat in einem Knochentunnel befestigt. Der anschließende Heilungsprozess konnte in drei Teilaspekte unterteilt werden: die Revitalisierung des Implantates, die Knochenheilung des Bohrkanals und die Implantat-zu-Knochen-Heilung.

Revaskularisierung und *Bandremodeling* des Implantates

In den Präparaten der Sechswochengruppe wurde in sechs von sieben Präparaten eine dem Implantat aufliegende synoviale Deckschicht gefunden. Diese synoviale Deckschicht war zwei- bis achtagig. Eine reich vaskularisierte und verdickte synoviale Membran in der Umgebung von Implantaten und Transplantaten wurde auch in der Literatur beschrieben

(ARNOCZKY et al. 1982). Auch das native VKB ist intraartikulär von einer synovialen Deckschicht umgeben. Diese ist zwei- bis vierlagig und führt in ihrem subsynovialen Bindegewebe Gefäße mit. Diese subsynovialen Gefäße versorgen sowohl die synoviale Deckschicht als auch die Sehnen bzw. Bänder.

Eine wichtige Aufgabe der synovialen Deckschicht betrifft die Revaskularisierung.

Mehrere Autoren gaben in der Literatur das synoviale Gewebe als Ursprung der Revaskularisation an (ROUGRAFF et al. 1993; ARNOCZKY et al. 1979; SCKELL et al. 1999; BOSCH und KASPERCZYK 1992).

Das konnte auch in den vorliegenden Ergebnissen nachvollzogen werden, da in den Präparaten der Sechswochengruppe peripher und intermediär die größte Gefäßdichte gefunden wurde. Aus den bindegewebigen Bereichen des subsynovialen Raumes zogen nach sechs Wochen erste bindegewebige Stränge nach peripher und intermediär in das Implantat. Sie führten erste Gefäße mit sich als Beginn der Revaskularisation.

Auch Shino et al. (1984) fanden bei ihren mikroangiographischen Untersuchungen eines freien Sehnentransplantates am Hund deutliche Gefäßeinsprossungen, ausgehend vom infrapatellären Fett und der synovialen Deckschicht bei geringer Vaskularität in den zentralen Bereichen (SHINO et al. 1984; SHINO et al. 1991; SHINO u. HORIBE 1991).

Eine synoviale Deckschicht in den vorliegenden Sechswochenpräparaten spricht so für eine beginnende Integration des Implantates.

In einem Präparat der Sechswochengruppe wurde diese synoviale Deckschicht nicht gefunden. Da aber auch in diesem Präparat das Implantat zum Sechswochenzeitpunkt vital war, im Sinne einer beginnenden Revaskularisierung von peripher und intermediär und es keine Anzeichen einer Zellnekrose gab, kann man vermutlich von einem Artefakt ausgehen.

In allen Präparaten der Sechsmontatsgruppe war eine synoviale Deckschicht vorhanden. Nach sechs Monaten war diese aber deutlich geringer ausgeprägt als nach sechs Wochen und lediglich zwei- bis sechslagig.

Arnoczky et al. (1982) fanden in ihrer Studie mit allogenen BPTB Transplantaten am Hund zum Zeitpunkt von acht Wochen avaskuläre, nekrotische Transplantate, die von einer

reich vaskularisierten Hülle umgeben waren. Auch Bosch et al. (1992) beschrieben in ihren Untersuchungen eine Transplantatnekrose. Für sie ist eine nekrotische Phase früher Bestandteil des *Transplantatremodelings* und geht einher mit verminderter Reißfestigkeit des Transplantates (BOSCH et al. 1992).

Häufig wurden Transplantatnekrosen aber auch bei Transplantatverankerungen mit Interferenzschrauben beobachtet (BLICKENSTAFF et al. 1997; CLANCY et al. 1981; GORADIA et al. 1998; GRANA et al. 1994), so dass angenommen wird, dass die direkte Kompression durch eine Interferenzschraube ebenfalls wesentlich zur Nekrose des Transplantates beitragen kann. Weniger häufig wurden Transplantatnekrosen in Versuchsmodellen mit extraartikulärer Verankerung freier Sehnentransplantate beobachtet (BLICKENSTAFF et al. 1997; GORADIA et al. 1998; GRANA et al. 1994; LIU et al. 1997; RODEO et al. 1993). Es konnte nachgewiesen werden, dass die mit dem *Transplantatremodeling* einhergehende partielle Nekrose zu einem Verlust der Steifigkeit der Rekonstruktion führt (BLICKENSTAFF et al. 1997; CLANCY et al. 1981; GORADIA et al. 1998; GRANA et al. 1994). Anzeichen für Nekrosen wurden in den vorliegenden Präparaten nicht gefunden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die von Bosch et al. beschriebene nekrotische Phase zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen bereits vorbei war.

Generell wurde in allen Präparaten beider Gruppen eine Revaskularisierung nachgewiesen. In den Präparaten der Sechswochengruppe ließen sich im Mittel sechs Gefäße pro Gesichtsfeld in der 20er Vergrößerung im gesamten Präparat nachweisen. Allerdings war die Gefäßverteilung nicht homogen. Es gab eine ausgeprägte Vaskularität in den peripheren und z. T. in den intermediären Bereichen der Implantate. Die zentralen Bereiche hingegen waren deutlich geringer vaskularisiert und z. T. auch avaskulär. Das die Implantate umgebende subsynovial gelegene lockere Bindegewebe war stark vaskularisiert. Das entsprach auch den Beobachtungen anderer Studien zu diesem Zeitpunkt (CLANCY et al. 1981; UNTERHAUSER et al. 2003). Im Gegensatz zu den Präparaten der Sechswochengruppe konnten in den Präparaten der nativen VKB im Mittel

nur zwei Gefäße pro Gesichtsfeld in der 20er Vergrößerung nachgewiesen werden. Die Gefäßverteilung hingegen ähnelte der in der Sechswochengruppe mit der höchsten Gefäßdichte im subsynovialen Raum. Aus diesem zogen Gefäße in die peripheren Bereiche und vereinzelt mit den bindegewebigen Septen weiter nach intermediär bzw. zentral.

Drez et al. (1991) fanden nach sechs Wochen bei allogenen Patellarsehnentransplantaten an der Ziege eine dezente Revaskularisierung in der Peripherie bei zentral dominierender Avaskularität und Azellularität (DREZ et al. 1991). Weiler et al. (2001) untersuchten in ihrer Studie mit autologen Achillessehnetransplantaten in Schafen ebenfalls die Revaskularisierung mit Hilfe der FVIIIrA Färbung. Nach sechs Wochen fanden sie eine hypervaskuläre, verdickte synoviale Membran und hypervaskuläres subsynoviales Gewebe. Zentrale Teile des Transplantates waren nur inhomogen und sporadisch vaskularisiert (WEILER et al. 2001).

Nach sechs Monaten hatte sich das Bild der Gefäßverteilung in den Präparaten der vorliegenden Studie deutlich verändert. Die Gefäßverteilung war deutlich homogener und auch die zentralen Bereiche waren vaskularisiert. Lediglich in einem Präparat gab es zentral noch avaskuläre Bereiche.

Die Gesamtanzahl der Gefäße war im Vergleich zum Sechswochenzeitpunkt höher, so fanden sich nach sechs Monaten im Mittel acht Gefäße pro Gesichtsfeld in der 20er Vergrößerung.

Eine höhere Gefäßdichte zu diesem Zeitpunkt wurde auch in diversen anderen Studien beobachtet (SHINO et al. 1984; ARNO CZKY et al. 1986; DREZ et al. 1991; FROMM et al. 1996).

Shino et al. (1984) fanden bereits nach 15 Wochen eine deutlich stärkere Vaskularisierung im Vergleich zu den Präparaten nach sechs Wochen, jedoch waren zu diesem Zeitpunkt zentrale Bereiche immer noch nicht vollständig revaskularisiert (SHINO et al. 1984).

Einige tierexperimentelle Studien mit allogenen Knochen-Sehnentransplantaten zeigten den Abschluss der Revaskularisierung und eine Gefäßverteilung wie in einem nativen

VKB bereits nach sechs Monaten (ARNOCZKY et al. 1986; FROMM et al. 1996). Allerdings erfolgten diese Untersuchungen ausschließlich qualitativ.

Shino und Horibe (1991) beobachteten einen Rückgang der Vaskularität vom 15-Wochenzeitpunkt zum 52-Wochenzeitpunkt. Zum 52-Wochenzeitpunkt beschrieben sie ein dem nativen VKB ähnliches Gefäßverteilungsmuster in einem Hundemodell (SHINO u. HORIBE 1991). In einer humanmedizinischen klinischen Studie untersuchten Shino et al. (1991) allogene Sehnen transplantate. Diese erreichten histologisch erst 18 Monate post operationem einen Zellgehalt und ein Kollagenmuster, das dem nativen VKB entsprach.

Unterhauser et al. (2003) konnten in ihrer Studie bereits 24 Wochen post operationem einen Zell- und Gefäßgehalt entsprechend dem nativen VKB beobachten. Sie verwendeten ebenfalls eine FVIIIrA Färbung (UNTERHAUSER et al. 2003).

In den Präparaten der vorliegenden Studie war der Zell- und Gefäßgehalt zum Sechswochenzeitpunkt im Vergleich zu den nativen VKB signifikant ($p=0,009$) erhöht. Nach sechs Monaten war die Gefäßdichte im Vergleich zu diesen nochmals höher, wenn auch nicht signifikant. Im Vergleich zu den nativen Präparaten jedoch war die Erhöhung signifikant ($p=0,018$). Daraus kann man schlussfolgern, dass die Revaskularisierung der Präparate nach sechs Monaten noch nicht abgeschlossen war, da Zell- und Gefäßgehalt nicht den nativen VKB entsprachen. Hier wäre ein weiterer späterer Untersuchungszeitpunkt aufschlussreich gewesen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf die Revaskularisierung weitestgehend denen der Literatur entsprechen, wenn auch aufgrund der verschiedenen sensitiven Untersuchungsmethoden ein direkter Vergleich schwierig ist. Weiterhin sind Unterschiede in den zeitlichen Abläufen der Revaskularisierung durch unterschiedliche Tiermodelle und die Verwendung unterschiedlicher Transplantate bzw. Implantate erklärbar. Ein direkter Vergleich mit der vorliegenden Studie ist nicht möglich, da das verwendete Implantat eine Neuentwicklung ist und bisher so noch nicht verwendet wurde.

Die Untersuchungszeitpunkte waren mit sechs Wochen und sechs Monaten gut gewählt, da diese Zeitpunkte auch in vielen anderen Studien genutzt wurden. So konnte in der

vorliegenden Studie die Revaskularisierung der Implantate beginnend von ihrer frühen kapillären Phase von peripher nach zentral fortschreitend, wie auch in der Literatur beschrieben, dargestellt werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit des Abschlusses der Revaskularisierung und des *Remodelings* mit anderen Studien wäre eine weitere Untersuchungsgruppe zu einem noch späteren Zeitpunkt, z. B. nach 12 oder 24 Monaten, aufschlussreich gewesen. Zu diesem Zeitpunkt wäre ein Rückgang der Gefäßdichte zu erwarten gewesen und eine Aussage über den Abschluss des *Remodelings* wäre wahrscheinlich möglich gewesen. Die Gefäßversorgung hätte dann vermutlich der eines nativen VKB stark geähnelt.

In Hinblick auf die Einheilung der Implantate sind diese Ergebnisse positiv zu werten, da eine Vaskularisierung Vitalität der Implantate bedeutet und die Voraussetzung für einen *Remodelingprozess* ist (CLAES et al. 2011).

Einen weiteren Hinweis auf ein stattgefundenes *Bandremodeling* geben die Ergebnisse der immunhistochemischen Kollagen I Färbung. Alle Präparate der Sechswochengruppe und der Sechsmontatsgruppe wurden sowohl mit spezifisch gegen Schweinekollagen I gerichteten Antikörpern, als auch mit spezifisch gegen Rattenkollagen I gerichteten Antikörpern markiert.

Das zur Kontrolle mit gefärbte native Implantat stellte sich in der Kollagen I Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Rattenkollagen vollständig positiv dar, in der Kollagen I Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Schweinekollagen ausschließlich negativ. Ein Nachweis von Rattenkollagen war lediglich als diffuse Färbung in wenigen Bandpräparaten der Sechswochengruppe möglich. In allen femoralen Präparaten beider Gruppen konnte kein Rattenkollagen mehr nachgewiesen werden.

Kollagen I vom Schwein konnte in allen Präparaten beider Gruppen nachgewiesen werden. In den Bandpräparaten der Sechswochengruppe konnten in drei Präparaten Areale mit und ohne Schweinkollagen gut differenziert werden. In den anderen vier Präparaten dieser Gruppe war die Färbung sehr homogen über das gesamte Präparat erfolgt. In den Bandpräparaten der Sechsmontatsgruppe waren bis auf ein Präparat alle

Präparate homogen angefärbt. In den femoralen Präparaten ließ sich Kollagen I vom Schwein v. a. an den Bandinsertionsflächen und in den Bereichen des Tunnelausganges nachweisen.

Im nativen Implantat ließ sich kein Kollagen I vom Schwein nachweisen.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass bereits zum Zeitpunkt von sechs Wochen das ursprüngliche Implantatgewebe weitestgehend ab- bzw. umgebaut und durch körpereigenes Gewebe vom Schwein ersetzt worden war. Gerade in den Präparaten der Sechswochengruppe, in denen keine Differenzierung einzelner Areale mehr möglich war, war ein hoher Zellgehalt auffällig. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in der vorliegenden Studie ein hoher Zellgehalt für eine hohe *Remodelingaktivität* spricht. In den drei Sechswochenpräparaten in denen noch Areale ohne Nachweis von Kollagen I vom Schwein vorhanden waren, waren v. a. Bindegewebe, Gefäße und Septen deutlich gefärbt, wohingegen zentrale Bandbereiche ungefärbt waren. In diesen Präparaten waren daher subsynoviales Bindegewebe und mitgeführte Gefäße und eine beginnende Septierung durch das Bindegewebe klar als Ursprung des *Remodeling* erkennbar. Ein *Bandremodeling* von peripher nach zentral war in diesen Präparaten nachvollziehbar. Ein weiterer Ausgangspunkt des *Bandremodeling* innerhalb des Knochentunnels scheint der Bereich der Bandinsertion sowie die FIZ (*fibrous interzone*, fibröse Zwischenschicht) zwischen Geflechtknochen und Implantat gewesen zu sein, da ein Nachweis von Schweinekollagen in allen femoralen Präparaten möglich war. Kleiner et al. (1986) zeigten in ihrer Studie, dass autologe Implantatzellen nach ca. zwei bis vier Wochen komplett durch einwandernde Zellen ersetzt waren. Entsprechend den Ergebnissen von Kleiner et al. (1986) konnte in der vorliegenden Studie nach sechs Wochen kein eindeutiger Nachweis des ursprünglichen Implantatgewebes mehr erbracht werden. Dennoch konnte in der Gegenfärbung mit Kollagen I vom Schwein gezeigt werden, dass zumindest vereinzelte kleine, meist zentral gelegene Bereiche noch nicht vollständig mit Kollagen I vom Schwein durchwachsen waren.

Insgesamt entsprechen die Ergebnisse weitestgehend denen in anderen Studien und lassen den Schluss zu, dass in der vorliegenden Studie ein *Bandremodeling* und damit eine Bandheilung stattgefunden hat.

Sowohl in der Sechswochengruppe als auch in der Sechsmonatsgruppe gab es je ein Präparat, das sich deutlich von den anderen Präparaten der Gruppe unterschieden hat. In der Sechswochengruppe zeigte ein Präparat bereits eine sehr homogene Gefäßverteilung in allen Bereichen. In der Masson Goldner Färbung und der Movat Pentachromfärbung stellte sich dieses Präparat hyperzellulär dar, Implantat und FIZ waren kaum unterscheidbar. Es war eines der wenigen Präparate, in dem Reste des verwendeten Nahtmaterials und in deren unmittelbarer Umgebung eine lokale Entzündungsreaktion mit Fremdkörperriesenzellen und Phagozyten vorhanden waren. Daraus kann man schlussfolgern, dass die lokale Entzündungsreaktion zu einer Hypervaskularisation geführt hat, die die Revaskularisation des Implantates beschleunigt haben könnte.

In der Sechsmonatsgruppe fiel ein Präparat auf, das im Gegensatz zu den anderen Präparaten der Gruppe deutlich weniger Gefäßanschnitte in der FVIIIrA Färbung aufwies. Vor allem zentral stellte sich dieses Präparat hypovaskulär dar. In der Movat Pentachromfärbung und der Masson Goldner Trichrom Färbung wurden auch bei diesem Präparat Fadenreste gefunden. Am Boden des Bohrtunnels waren vereinzelte Zellnester zu erkennen. Der Tunnelausgang stellte sich auffallend schmal dar, da er durch neugebildeten Geflechtknochen und Osteoid stark eingeeengt wurde. Bei diesem Präparat konnte lediglich ein indirekter Bandansatz gefunden werden. Anzeichen zur Ausbildung eines direkten Bandansatzes waren nicht vorhanden.

Die Knochenheilung des Bohrkanals ist eine Grundvoraussetzung für die Transplantateinheilung.

Im Zuge einer desmalen Ossifikation wandeln sich mesenchymale Vorläuferzellen zu Osteoblasten um, diese Vorläuferzellen produzieren Kollagen und Osteoid. Osteoblasten mauern sich darin ein und es erfolgt eine schrittweise Mineralisierung der Knochengrundsubstanz. Schließlich wandeln sich die Osteoblasten zu Osteozyten um. Diese Art der

Ossifikation ist stark abhängig von der Einsprossung von Blutgefäßen, da Blutgefäße zusätzliches mesenchymales Bindegewebe mitführen (LIEBIG 1999).

Es entsteht Geflecht- oder Faserknochen, der im Verlauf jeder Knochenneubildung auftritt. Knochenneubildung entsteht überall dort, wo über längere Zeit Zug- und Druckkräfte wirken. Dieser Geflecht- oder Faserknochen wird im Laufe der Zeit umgewandelt in Lamellenknochen.

In der Movat Pentachromfärbung waren zu allen Zeitpunkten in allen femoralen Präparaten ausgeprägte Osteoidsäume an den Wänden des Bohrkanals darstellbar.

Diese Osteoidsäume waren Zeichen einer aktiven Ossifikation. Sie lagen einer Schicht neu gebildetem Geflechtknochen auf. An den Osteoidrändern waren Osteoblasten zu finden. Osteoklasten waren dort nicht erkennbar. Eine enchondrale Ossifikation mit chondroiden Vorläuferzellen konnte lediglich vereinzelt in unmittelbarer Nähe von Wachstumsfugen beobachtet werden.

Da auch zum Sechsmonatszeitpunkt Osteoid und Osteoblasten erkennbar waren, kann man davon ausgehen, dass die Ossifikation und somit die Knochenheilung zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig abgeschlossen war. Auch hier wäre ein zusätzlicher späterer Untersuchungszeitpunkt aufschlussreich gewesen. Auch Weiler et al. (2002) fanden in ihrer Studie bis zum Ende der Versuchszeit in der 52. Woche eine hohe *Remodelingaktivität* des Bohrtunnelknochens mit einem Maximum in der sechsten Woche (WEILER et al. 2002). Hunt et al. (2006) verwendeten in ihrer Studie Interferenzschrauben zur Transplantatfixierung. Sie beobachtete Osteolysen im Bereich des Schraubenlagers in dem Zeitraum der Schraubendegeneration. Diese temporären Osteolysen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Transplantateinheilung (HUNT et al. 2006).

Anzeichen für Tunnelaufweitungen oder Osteolysen konnten in den Präparaten der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet werden.

Die Implantat-zu-Knochenheilung

Die Implantat-zu-Knochenheilung meint die eigentliche Implantateinheilung in den Bohrkanal. Sie ist Grundvoraussetzung für eine stabile VKB Rekonstruktion. Diese Implantateinheilung ist stark abhängig von der Art der Implantatverankerung.

In der vorliegenden Studie wurde eine gelenkferne Fixierung mittels Endobutton gewählt. Die Bohrkanäle wurden aber ausgehend von den ursprünglichen Ansätzen des Ligamentum cruciate craniale intraartikulär in einem Winkel von ca. 20° zur Längsachse der Tibia bzw. des Femur angelegt, um eine möglichst anatomische Implantatplatzierung zu gewährleisten. Der Durchmesser betrug 4 mm. Die Gesamtlänge des Implantates wurde so bemessen, dass mindestens 1 cm des Implantates im Bohrkanal zum Liegen kam.

Bereits 1963 untersuchten Forward und Cowan (1963) histologisch die Einheilung eines freien Sehnenendes in einen Bohrkanal am Kaninchenmodell. Sie beschrieben über einen Versuchszeitraum von drei Monaten die Ausbildung eines indirekten Knochen-Sehnen-Ansatzes. Sie fixierten das freie Sehnenende durch verschiedene Nahttechniken im Bohrtunnel. Unabhängig von der Nahttechnik beschrieben sie bereits eine Woche post operationem die Ausbildung eines hyperzellulären, gefäßreichen, zunächst unorganisierten Bindegewebes zwischen Lamellenknochen und Sehngewebe und eine erhöhte Osteoblastenaktivität. Diese Bindegewebsschicht reifte und die Zellularität nahm ab. Geflechtknochenbälkchen wuchsen in die bindegewebige Zwischenschicht ein und engten den Raum zwischen Lamellenknochen und Transplantat zunehmend ein. Sharpey'sche Fasern verbanden Geflechtknochen und Transplantat miteinander. Zum Versuchsende hatte sich eine reife indirekte Bandinsertion ausgebildet (FORWARD u. COWAN 1963).

1987 untersuchten Jones et al. (1987) ebenfalls die Knochen-Sehnen-Heilung an einem extraartikulären Kaninchenmodell. Hierfür befestigten sie die Sehne des M. flexor digitorum mit einer Bunnel-Naht an der Gegenkortikalis, nachdem sie sie durch einen Bohrtunnel in der Mittelphalanx gezogen hatten. Histologisch wiesen Jones et al. (1987) nach vier Wochen eine FIZ nach, die einer Reifung unterlag. Über fibroblastenreiches

Bindegewebe war das Sehnenende mit dem Knochen verbunden. Eine direkte Bandinsertion konnte nach 20 Wochen nicht festgestellt werden (JONES et al. 1987).

Liu et al. (1997) untersuchten in einem extraartikulären Kaninchenmodell die Einheilung einer gestielten Musculus Hallucis longus Sehne in einem Bohrtunnel. Die Sehne wurde durch den Os calcaneus eingezogen und nach ein, zwei, vier und sechs Wochen immunhistochemisch untersucht. Auch sie befestigten die Sehne mit einer Naht am Periost. zwei Wochen post operationem konnten sie erstmals eine FIZ nachweisen, die im weiteren Verlauf einer Reifung unterlag. Immunhistochemisch konnten sie nach sechs Wochen Sharpey'sche Fasern vom Kollagen Typ III nachweisen, die den neu gebildeten Geflechtknochen und das Transplantat die FIZ überbrückend überspannten. Chondroide Zellen konnten sie nicht nachweisen (LIU et al. 1997).

Blickenstaff et al. (1997) konnten in ihrer Arbeit über die Einheilung eines freien Sehnen-transplantates nach einer VKB Rekonstruktion am intraartikulären Kaninchenmodell den Nachweis einer FIZ bereits eine Woche post operationem erbringen.

Auch in der vorliegenden Studie bildete sich in den Präparaten der Sechswochengruppe eine FIZ aus. Wie in der Literatur beschrieben, befand sie sich zwischen Knochengewebe und Implantat. Sie bestand aus lockerem, ungerichtetem fibroblastenreichen Bindegewebe. Durchzogen wurde die FIZ von Sharpey'schen Fasern, welche aus dem Knochengewebe kamen und in das Implantat zogen. Diese FIZ war in allen Präparaten je nach Lokalisation unterschiedlich stark im Bereich des Bohrkanals ausgebildet.

In den Präparaten der Sechsmonatsgruppe war keine FIZ mehr erkennbar. Stattdessen konnte man nun im Bereich des Bohrtunnels einen direkten Übergang von Lamellenknochen über neu gebildeten Geflechtknochen zum Implantat finden. Eine hohe Anzahl Sharpey'scher Fasern zog aus dem Geflechtknochen direkt in das Implantat. Ihre Ausrichtung entsprach der Zugrichtung des Implantates.

Weiler et al. (2002) untersuchten die Knochen-Sehnen-Heilung nach einer VKB Rekonstruktion an einem Schafsmodell. Auch sie beobachteten nach sechs Wochen die Ausbildung einer FIZ mit Sharpey'schen Fasern und neugebildetem Geflechtknochen. Sie beobachteten, dass die FIZ v. a. dort ausgebildet war, wo kein vollständiger Kontakt

zwischen Implantat und Knochen bestand. Sie schlussfolgerten daraus, dass bei direktem Implantat-Knochen-Kontakt eine Heilung ohne die Ausbildung einer FIZ möglich wäre (WEILER et al. 2002).

Die Ausbildung einer FIZ im Bereich des Bohrkanals in den Sechswochenpräparaten entspricht somit den Beobachtungen in anderen Studien und ist vermutlich auf den nicht vollständigen Kontakt zwischen Implantat und den Wänden des Bohrkanals zurückzuführen.

Diese FIZ unterliegt einer Reifung, an deren Abschluss eine Matrix aus orientierten Kollagenfasern steht und eine Unterscheidung zwischen Implantat und FIZ nicht mehr möglich ist (RODEO et al. 1993; GRANA et al. 1994). Den Abschluss der Reifung der FIZ gaben Weiler et al. (2002) mit neun bis zwölf Wochen post operationem an.

Das entspricht auch den Beobachtungen in der vorliegenden Studie, da in den Präparaten der Sechsmonatsgruppe keine FIZ mehr erkennbar war.

Sharpey'sche Fasern sind perforierende Fasern, die als Verlängerung aus dem Knochen weiches Gewebe am Knochen fixieren (WEILER et al. 2002). Die Ausbildung von Sharpey'schen Fasern, die Knochen und Implantat verbinden, wird als das früheste Zeichen der knöchernen Integration angesehen (RODEO et al. 1993; GRANA et al. 1994). Rodeo et al. (1993) beobachteten in ihrer Untersuchung die Ausbildung von Sharpey'schen Fasern nach vier Wochen zum ersten Mal. Grana et al. (1994) und Blickenstaff et al. (1997) beobachteten in ihren Untersuchungen die Ausbildung von Sharpey'schen Fasern bereits nach drei Wochen. Goradia et al. (1998) konnten Sharpey'sche Fasern in ihrer Untersuchung am Schafsmodell erst acht Wochen post operationem nachweisen.

Da in der vorliegende Studie der früheste Untersuchungszeitpunkt sechs Wochen war, kann keine Aussage zum ersten Erscheinen der Sharpey'schen Fasern gemacht werden. Zum Zeitpunkt von sechs Wochen waren Sharpey'sche Fasern in allen Präparaten und in allen Bereichen des Bohrkanals sowie in den meisten Bereichen der Bandinsertionsflächen ausgebildet. Nach sechs Monaten waren Sharpey'sche Fasern noch im gesamten

Tunnelbereich aber nur noch vereinzelt an den Bandinsertionsflächen ausgebildet. Das Vorhandensein Sharpey'scher Fasern wird als indirekte Band- oder Sehneninsertion angesehen, wie sie auch bei der periostalen Verankerung von Bändern vorkommt (GRANA et al. 1994; BENJAMIN et al. 1986).

Diese periostale Verankerung beschrieben Weiler et al. (2002) als eine dynamische Verankerung von weichen Geweben an Knochen, die Scherkräfte erlaubt. Sie beobachteten in ihrer Untersuchung ein verstärktes Vorkommen von Sharpey'schen Fasern in Regionen, wo sie eine erhöhte Belastung des Implantates erwarteten, wie z. B. in den Abschnitten des Knochentunnels, wo kein direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat bestand (WEILER et al. 2002).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es in der vorliegenden Untersuchung im Bereich des Bohrkanals zur Ausbildung einer indirekten Bandinsertion kam.

In einem Präparat der Sechsmonatsgruppe war eine Insel von chondroiden Zellen im peripheren Implantatbereich zu finden. Vereinzelt konnte man in den Präparaten der Sechsmonatsgruppe das Vorkommen von chondroiden Zellen im Bohrkanal zwischen den Sharpey'schen Fasern beobachten. Diese befanden sich oftmals in der Nähe der Wachstumsfugen. Mineralisierte chondroide Zellen konnten in diesen Bereichen allerdings nicht gefunden werden.

Auch Shino et al. (1984) und Forward und Cowan (1963) fanden bei ihren Untersuchungen chondroide Zellen zwischen Sharpey'schen Fasern. Weiler et al. (2002) argumentierten, dass chondroide Zellen ohne Anzeichen von Mineralisation nicht gleichbedeutend sind mit der Ausbildung einer direkten Bandinsertion, sondern vielmehr ein Zeichen für das kontinuierliche Vorhandensein von Zug- und Druckkräften in diesen Bereichen. Bosch et al. (1992) gaben ebenfalls spezielle lokale biomechanische und mechanische Umstände für die Entstehung von chondroiden Zellen an diesen Stellen an (BOSCH et al. 1992). Daher ist davon auszugehen, dass es sich auch in den Präparaten der vorliegenden Studie um eine Anpassung an Zug- und Druckkräfte gehandelt hat. Die Ansammlung chondroider Zellen im Bereich der Wachstumsfugen kann vermutlich mit

deren Öffnung bei der Anlegung des Bohrkanals und damit mit dem unmittelbaren Vorhandensein von Chondroblasten und Chondrozyten in diesen Bereichen erklärt werden. Die Ausbildung chondroider Zellen im Bereich der Bandinsertion hingegen kann als Beginn einer direkten Bandinsertion gewertet werden.

Weiler et al. (2002) schlussfolgerten in ihrer Studie, dass es zwei verschiedene Mechanismen der Sehnen-Knochen-Heilung gibt, wenn freie Sehnentransplantate zur VKB Rekonstruktion genutzt werden: eine Heilung im Bohrtunnel und eine Oberflächenheilung. Die Ausbildung von Sharpey'schen Fasern, die Reifung einer FIZ und die Ausbildung einer fibrokartilaginären Insertion im Bohrtunnel sprechen für die Ausbildung einer indirekten Bandinsertion. Die Ausbildung dieser indirekten Bandinsertion im Tunnelbereich erklärten sie mit einer Kräfteverteilung, die parallel zur Knochenoberfläche verläuft. Im Gegensatz dazu arbeiten die Kräfte an der Gelenkoberfläche eher senkrecht, wie es auch bei einer nativen VKB Insertion der Fall ist, so dass hier eine direkte Bandinsertion ausgebildet wird. Als Ursprung dieser direkten Bandinsertion gaben sie den mineralisierten Knorpel des Gelenkknorpels an, welcher sich mit dem Implantatgewebe mischt (WEILER et al. 2002).

Eine direkte Bandinsertion besteht aus vier Zonen: Band, Faserknorpel, mineralisierter Knorpel und Knochen (BENJAMIN et al. 1986; MESSNER 1997). Nach einem Score von Unterhauser et al. (2006) (SCHLICHTING 2008) kann man den Reifegrad einer direkten Bandinsertion an Hand ihres histologischen Erscheinungsbildes in die Grade 0 – 4 einteilen, wobei Grad 0 keine Anzeichen für eine direkte Bandinsertion zeigt. Bei Grad 1 sind unverkalkte chondroide Zellen vorhanden, bei Grad 2 verkalkte chondroide Zellen, bei Grad 3 teilweise ein 4 Zonenaufbau aus Band, Faserknorpel, Kalkknorpel und Knochen und bei Grad 4 ist ein vollständiger 4 Zonenaufbau vorhanden (SCHLICHTING 2008).

In der vorliegenden Studie konnten nach sechs Wochen in allen Präparaten Anzeichen für die Ausbildung einer direkten Bandinsertion nach o. g. Kriterien gefunden werden. Chondroide Zellen waren in vier von sieben Präparaten nachweisbar, bei zwei Präparaten

waren kalzifizierte chondroide Zellen sichtbar und bei einem Präparat vereinzelt ein 4 Zonenaufbau.

Nach sechs Monaten konnten bereits drei der sechs Präparate mit Grad 3 klassifiziert werden. Hier zeigte der Bandansatz einen teilweisen 4 Zonenaufbau. Drei der sechs Präparate verteilten sich auf die Grade 0 – 2.

In den meisten tierexperimentellen Studien, in denen ein freies Sehnen transplantat mittels Endobutton fixiert wurde, konnte auch eine indirekte Bandinsertion nachgewiesen werden (BLICKENSTAFF et al. 1997; FORWARD u. COWAN 1963; GRANA et al. 1994; JONES et al. 1987; LIU et al. 1997). In den Studien in denen eine direkte Bandinsertion nachgewiesen wurde, erfolgte die Fixierung der Transplantate über Interferenzschrauben (WEILER et al. 2002; HUNT et al. 2006). Weiler et al. (2002) vermuteten, dass es in ihrer Untersuchung zur Ausbildung einer direkten Bandinsertion kam, da sie durch die Verwendung einer Interferenzschraube zur Implantatverankerung die Implantatbewegungen im Tunnel weitestgehend neutralisiert hatten.

Viele Autoren beschrieben bei der VKB Rekonstruktion mit freien Sehnen transplantaten das Phänomen der Tunnelaufweitung (HÖHER et al. 1998; L'INSALATA et al. 1997; MÜLLER et al. 2007). Die maximale Erweiterung wurde innerhalb der ersten Monate post operationem beobachtet, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher noch ungeklärt (HÖHER et al. 1998). Höher et al. (1998) vermuteten biomechanische und biologische Faktoren, wie z. B. das Eindringen von Synovia in den Bohrkanaal als zugrunde liegende Ursachen. Auch antigene Reaktionen bei der Verwendung allogener Transplantate mit nachfolgend induzierten zytotoxischen Effekten und durch die Synovia vermittelte Entzündungsreaktionen und zellnekrotische Reaktionen durch den Bohrvorgang wurden vermutet (CLATWORTHY et al. 1999; FAHEY u. INDELICATO 1994).

Die diskutierten mechanischen Faktoren im Zusammenhang mit Bohrtunnelaufweitungen sind neben einer falschen Transplantatplatzierung, die in einer erhöhten Belastung des Transplantates resultiert, eine zu frühzeitige und aggressive Rehabilitation und gehäufte

Mikrobewegungen des Transplantates im Knochentunnel (AGLIETTI et al. 1998; HÖHER et al. 1999; NEBELUNG et al. 1998; SCHULTKE et al. 2002; SEGAWA et al. 2001).

Clatworthy et al. (1999) konnten radiologisch eine Aufweitung des Knochentunnels nach VKB Rekonstruktion sowohl bei Verwendung eines freien Sehnen transplantates und extraartikulärer Transplantatfixierung als auch nach Interferenzschraubenfixierung eines BPTB Transplantates nachweisen. Sie führten eine biologische Komponente der Tunnelaufweitung durch erhöhte Konzentrationen osteolytischer Zytokine in der Synovia und durch Transplantatnekrose an (CLATWORTHY et al. 1999).

Zysk et al. (2004) untersuchten in einer prospektiven klinischen Studie an 13 Patienten den Zusammenhang zwischen radiologisch gemessener Bohrtunnelaufweitung und dem Zytokingehalt der Synovia nach VKB Rekonstruktion. Sie bestimmten prä operationem und sieben Tage post operationem die Synovialkonzentrationen von Tumornekrosefaktor (TNF) alpha, Interleukin (IL) 1 beta, IL-6, *bone morphogenetic proteins* (BMP) und Stickstoffmonoxid (NO). Zusätzlich verglichen sie autologe BPTB Transplantate, die beidseitig mittels biodegradierbarer Interferenzschrauben fixiert wurden, mit autologen *Hamstringsehnen transplantaten*, die tibial mit biodegradierbaren Interferenzschrauben und femoral extraartikulär mit *Crosspins* verankert wurden. Sie konnten in ihrer Studie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Zytokinkonzentration und einer Bohrtunnelaufweitung und keinen signifikanten Unterschied der tibialen Tunnelaufweitung zwischen beiden chirurgischen Techniken nachweisen (ZYSK et al. 2004).

L'Insalata et al. (1997) verglichen in ihrer Studie das Ausmaß der Tunnelaufweitung nach VKB Rekonstruktion mit BPTB Transplantat, mit Interferenzschraubenfixierung und *Hamstringsehnen transplantat* mit *Endobuttonfixierung*. Sie wiesen eine signifikant stärkere Bohrtunnelaufweitung bei den *Hamstringsehnen transplantaten* mit *Endobutton* nach. Bei den BPTB Transplantaten kam es nur zu einer Tunnelaufweitung, wenn der anhängende Knochenblock nicht mit dem Gelenkspalt abschloss (L'INSALATA et al. 1997).

Auch Mikrobewegungen des Transplantates im Bohrkanal werden als ursächlich für Tunnelerweiterungen angesehen (AGLIETTI et al. 1998; HÖHER et al. 1998; L'INSALATA

et al. 1997). Diese Mikrobewegungen und die damit verbundenen Kräfte werden als „*windshield-wiper-effect*“ oder „Scheibenwischer-Effekt“ (Bewegungen des Transplantats transversal zur Tunnellängsachse) und „*Bungee-Effekt*“ (Bewegungen des Transplantats longitudinal der Tunnellängsachse) bezeichnet (HÖHER et al. 1999; JORGENSEN et al. 2000). Höher et al. (1999) konnten in ihrer Arbeit an freien Sehnentransplantaten mit *Endobuttonfixierung* die Zunahme des „*Bungee-Effekt*“ in Abhängigkeit von der Länge der Schlaufe nachweisen, über die das Transplantat mit dem *Endobutton* verbunden war. Sie kamen zu dem Schluss, dass der „Scheibenwischer-Effekt“ und der „*Bungee-Effekt*“ mit wachsender Distanz der Transplantatfixierung zum Gelenkspalt steigt und daraus die Stärke der Tunnelaufweitung resultiert (HÖHER et al. 1999).

Weiler et al. (2002) schlussfolgerten in ihrer Studie, dass eine Tunnelaufweitung eine persistierende FIZ durch eine gestörte oder verlängerte Reifung nach sich ziehen würde.

In der vorliegenden Untersuchung war in keinem der Präparate der Sechsmonatsgruppe eine FIZ erkennbar, aber in allen Präparaten aktive Ossifikation der Knochen der Bohrtunnelwände und eine Verengung des Bohrkanals. Daraus kann man schließen, dass es in dieser Studie nicht zu einer Tunnelaufweitung kam.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Implantate mittels *Endobutton* fixiert, trotzdem kam es nach o. g. Kriterien zu einer beginnenden Ausbildung einer direkten Bandinsertion an der Gelenkoberfläche. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die Ergebnisse deutlich von denen anderer Studien. Mehrere theoretische Ansätze als Erklärungen sind möglich.

Wenn die Ausbildung einer direkten Bandinsertion wie Weiler et al. (2002) vermuteten, bedingt ist durch die Implantatbewegung, die wiederum stark durch die Transplantatverankerung beeinflusst wird, könnte das im Umkehrschluss bedeuten, dass in der vorliegenden Untersuchung trotz Verwendung von *Endobutton* eine ausreichend feste Fixierung des Implantates gelungen war. Ein möglicher Faktor könnte auch der Durchmesser des Bohrkanals sein, der eng genug gewählt wurde, um einen ausreichenden Kontakt zwischen Implantat und Bohrkanalwand zu gewährleisten. Wenn es nach den Ergebnissen von Höher et al. (1999) mit wachsender Distanz der Transplantatfixierung zum

Gelenkspalt zu einer Erhöhung von „Scheibenwischer Effekt“ und „Bungee-Effekt“ kommt, könnte man im Umkehrschluss folgern, dass die in der vorliegenden Studie vorgenommene *Endobuttonfixierung* auf Höhe des Condylus femoralis bzw. tibialis in diesem Mini-pigmodell nah genug am Gelenkspalt war, um diese Effekte zu verhindern.

Ein weiterer möglicher Ansatz wäre die eigentliche Platzierung des Bohrkanals. Dieser wurde anatomisch von dem nativen Ansatz ausgehend, im Winkel von 20° zur jeweiligen Längsachse von Tibia bzw. Femur angelegt. Die Belastung der Implantate durch Zug- und Scherkräfte könnte durch den Winkel des Bohrkanals weitestgehend neutralisiert worden sein.

Eine andere Erklärung könnte sich aus dem größten Unterschied der vorliegenden Untersuchung zu allen anderen Untersuchungen, die für Vergleiche herangezogen wurden, ergeben. Das in dieser Studie verwendete Implantat selbst. Dafür wurden zellfreie Kollagenfasern verwendet, die in einer speziellen Technik mehrfach gewickelt wurden. Durch dieses Wickeln oder Flechten gab es innerhalb der Implantate anfangs keine gleiche Faserausrichtung, vielmehr wechselten sich horizontale und vertikale Lagen ab. Dadurch entstand zum einen der Effekt der Oberflächenvergrößerung, zum anderen könnte man eine erhöhte Widerstandsfähigkeit des Implantats gegen Kräfte aus verschiedenen Richtungen vermuten. Die durch das Wickeln bzw. Flechten der Kollagenfasern erreichte scherengitterartige Struktur erlaubt weiterhin die Mutmaßung auf eine hohe Reißfestigkeit der Implantate. Diese wurde auch durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt, da es bei keinem Tier zu einem Implantatversagen kam. Eine erhöhte Elastizität des Implantates, bedingt durch seine scherengitterartige Struktur mit dadurch bedingter nachfolgender Tunnelaufweitung, konnte histologisch nicht nachvollzogen werden.

Pan et al. (2009) untersuchten in einem Kaninchenmodell die Transplantateinheilung nach VKB Rekonstruktion mit und ohne einen kombinierten Knochenxenograft (RBX) in Form eines soliden, porösen Materials, zur Heilungsunterstützung. Die histologischen Ergebnisse beider Gruppen unterschieden sich deutlich. Bereits zwei Wochen post operationem fanden sie in der RBX-Gruppe große Areale mit chondrozytenartigen Zellen im Band-

bereich. Sechs Wochen post operationem beobachteten sie ausgeprägte knöcherne Areale im Bandbereich und 12 Wochen post operationem eine reife bandansatzartige Struktur. In den biomechanischen Testungen war die Reißfestigkeit in der RBX-Gruppe signifikant höher (PAN et al. 2009).

Zusammenfassend kann man zur Sehnen-Knochenheilung in der vorliegenden Studie sagen, dass sich mit sechs Monaten im Bereich des Bohrkanals eine indirekte Bandinsertion ausgebildet hatte. Im Bereich der Gelenkflächen war die Ausbildung einer direkten Bandinsertion nachvollziehbar, wenn auch zum Zeitpunkt von sechs Monaten noch nicht vollständig in allen Präparaten abgeschlossen.

Man kann vermuten, dass zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt von z. B. 24 Monaten der Bohrkanal vollständig knöchern durchbaut und auf den Gelenkflächen vermutlich ein regulärer direkter Bandansatz vorhanden gewesen wäre.

5.4 Relevanz der Ergebnisse für den klinischen Alltag in der Humanmedizin

In einer histologischen und immunhistologischen Studie beschrieben Petersen et al. (2000) den unterschiedlichen Verlauf der Knochen-Sehnen-Heilung nach VKB Ersatzplastik beim Menschen. Sie verglichen dabei BPTB Transplantate und *Hamstringsehnen*transplantate, die sie durch Biopsien aus Revisionseingriffen nach Reruptur einer VKB Ersatzplastik gewannen. Alle *Hamstringsehnen*transplantate waren mit einem *Endobutton*, alle BPTB Transplantate entweder mit einem *Endobutton* oder mit einer Interferenzschraube fixiert worden. Die *Hamstringsehnen*biopsien wurden in einem Zeitraum von 6 – 33 Monaten nach dem Primäreingriff entnommen, die BPTB Biopsien 9 – 37 Monate. Histologisch konnten sie in allen *Hamstringsehnen*biopsien eine indirekte Knochen-Sehnen-Verbindung mit Lamellen- und Geflechtknochen und Sharpey'schen Fasern nachweisen. Immunhistochemisch wiesen sie Kollagen Typ I in allen Gewebeschichten und Kollagen Typ III im Bereich des Überganges von Knochen zu Transplantat nach. In allen BPTB Biopsien war eine direkte Knochen-Sehnen-Verbindung mit den vier Zonen ausgebildet. Bei diesen Biopsien konnten sie Typ I Kollagen im Knochen und im

Transplantat, Typ II Kollagen in der Faserknorpel- und Kalkfaserknorpelschicht sowie Kollagen Typ III im Transplantat und in geringem Umfang in den Faserknorpelschichten, immunhistochemisch nachweisen (PETERSEN et al. 2000).

Somit wurden die tierexperimentell erhobenen Befunde über den histologischen Verlauf der Knochen-Sehnen-Heilung eines freien Sehnentransplantates in einem Knochentunnel auch für den Menschen bestätigt.

Auch wenn die Abläufe bei Mensch und Tier ähnlich sind, so kann man die tierexperimentell erhobenen Befunde dennoch nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen. Man muss davon ausgehen, dass die Belastungssituation auf eine VKB Rekonstruktion beim Menschen größer ist. Das bedingt zum einen das Körpergewicht des Menschen, zum anderen die veränderte Biomechanik aufgrund des aufrechten Ganges im Gegensatz zum Minipig. Weiterhin können die im Versuchstier ablaufenden biologischen Reaktionen anders als beim Menschen ablaufen, auch wenn das Schwein als Versuchstier der menschlichen Anatomie und Physiologie als sehr ähnlich gilt.

Histologische Studien über VKB Rekonstruktionen am Menschen gibt es nur wenige. Sie stammen hauptsächlich aus Biopsien, die bei Revisionseingriffen entnommen wurden bzw. aus Autopsien. Daraus folgt eine schlechte Vergleichbarkeit dieser Arbeiten untereinander, da der Entnahmezeitpunkt in Abhängigkeit des Revisionseingriffs am Patienten sehr schwankt. Weiterhin wurden die meisten dieser Biopsien nach Transplantatversagen gewonnen.

Pinczewski et al. (1997) und Nebelung et al. (2003) werteten solche Biopsien nach Transplantatversagen aus. Die hier vorgenommenen VKB Rekonstruktionen waren sowohl *Hamstringsehnentransplantate* mit Interferenzschraubenfixierung als auch *Hamstringsehnentransplantate*, die extraartikulär fixiert waren. Die Ergebnisse beider Untersuchungen ähnelten sich stark. Es wurden zentral azelluläre Bereiche im Transplantat gefunden und chondroide Zellen als Ausdruck einer direkten Bandinsertion konnten nicht nachgewiesen werden (PINCZEWSKI et al. 1997; NEBELUNG et al. 2003).

Janssen et al. (2011) entnahmen in ihrer Studie Biopsien nach 6 – 12 Monaten, 13 – 24 Monaten und nach über 24 Monaten von 67 Patienten nach erfolgreicher VKB Rekon-

struktion mit autologen *Hamstringsehnen*transplantaten und verglichen diese mit Biopsien der nativen VKB. Sie kamen zu dem Schluss, dass humane *Hamstring*transplantate die typischen Stufen des *Remodeling* zeigen und das *Remodeling* zwei Jahre nach VKB Rekonstruktion noch nicht abgeschlossen war. Dementsprechend ist der *Remodeling*-prozess im Menschen deutlich verlängert, verglichen mit Studien an Tiermodellen.

Obwohl diese Ergebnisse nicht direkt auf die Humanmedizin übertragen werden können, sind sie doch recht vielversprechend. Mit dem vorgestellten Implantat sollten weitere Untersuchungen am Menschen durchgeführt werden, da positive Ergebnisse die hohe Entnahmemorbidität bei VKB Rekonstruktionen umgehen würden.

5.5 Relevanz für die Tiermedizin

Auch in der Veterinärmedizin hat die Ruptur des VKB eine besondere Relevanz, insbesondere bei der Spezies Hund, bei der sie weltweit zu den am häufigsten auftretenden orthopädischen Problemen in der Tiermedizin gehört (HARASEN 2003). Eine Ruptur des VKB führt, wie auch beim Menschen, zu einer Instabilität des Gelenkes und somit zu allen sekundären Schäden, wie Lahmheit und Arthrose.

Bei den chirurgischen Techniken, die derzeit beim Hund angewendet werden, kann man zwei grundlegende Gruppen unterscheiden: der Bandersatz und die Modifikation der Biomechanik des Kniegelenkes. Bei den Bandersatztechniken wird differenziert zwischen dem intra- und extrakapsulären Bandersatz.

Der intrakapsuläre Bandersatz entspricht dem in der Humanmedizin häufig durchgeführten Bandersatz mit Transplantaten aus dem Ligamentum patellae, M. Semimembranosus oder der Fascia lata. Vor- und Nachteile dieser Methoden entsprechen ebenfalls denen in der Humanmedizin. Conzemius et al. (2005) verglichen in einer Studie die gängigen chirurgischen Methoden bei KBR bei Hunden. In dieser Studie hat der intrakapsuläre Bandersatz die schlechtesten Langzeitergebnisse erbracht.

So werden derzeit vor allem die extrakapsuläre Fadenzügelung sowie Techniken der Modifikation der Biomechanik des Kniegelenkes, wie z. B. die TPLO angewendet. Beide

Techniken erbrachten in der Studie von Conzemius et al. (2005) gute Langzeitergebnisse. Vorteil dieser Techniken gegenüber dem intrakapsulärem Bandersatz ist die fehlende Entnahmemorbidity, die in der Humanmedizin zu Problemen führt. Auch in humanmedizinischen Studien erwies sich das Tiermodell mit Hunden bei Studien zur intraartikulären VKB Rekonstruktion als weniger geeignet. So gab es in der Studie von Arnoczky et al. (1982), wo BPTB Allografts im Hundemodell untersucht wurden, nur avaskuläre, nekrotische Allografts nach acht Wochen, die lediglich von einer gut vaskularisierten Hülle umgeben waren.

Murray et al. (2004) untersuchten das zelluläre und mikrovaskuläre Erscheinungsbild verschiedener Spezies. Das VKB des Hundes kam dem humanen VKB am nächsten (MURRAY et al. 2004). Dennoch stellten Goertzen et al. (1993) bei ihren Untersuchungen am Tiermodell mit Hunden sechs Wochen nach Ersatz des VKB die Ausbildung von Knorpeldefekten im Kniegelenk fest. Sie wirkten sich störend auf den Heilungsverlauf des VKB Ersatzes aus (GOERTZEN et al. 1993).

Im Gegensatz zum Menschen können mit extrakapsulären Techniken oder Änderungen der Biomechanik des Kniegelenkes bei Hunden gute Ergebnisse erzielt werden. Bei beiden Techniken sind autologe oder allogene Sehnen- oder Sehnen-Knochen-Transplantate nicht nötig, dementsprechend entfallen Probleme wie Entnahmemorbidity oder die Übertragung von Infektionen wie bei allogenen Transplantaten. Da es diese Risiken bei den derzeit angewendeten chirurgischen Techniken nicht gibt, ist die Notwendigkeit neuer Techniken gering. Des Weiteren lassen die eher mäßigen Erfolge mit Hundemodellen in Studien zur VKB Rekonstruktion darauf schließen, dass intraartikuläre Bandersatztechniken mit oder ohne Knochen für Hunde eher ungeeignet sind.

In der Humanmedizin hat sich herausgestellt, dass eine intraartikuläre, möglichst anatomisch korrekte Rekonstruktion die besten Langzeitergebnisse bringt. Aber im Gegensatz zum Menschen ist die Lebenserwartung bei Hunden deutlich kürzer, dazu kommt, dass vor allem ältere Hund betroffen sind, so dass die Funktionsdauer der Rekonstruktion entsprechend der Lebensdauer des Hundes, auf wenige Jahre begrenzt ist. Ob die in der

vorliegenden Untersuchung entwickelten Implantate im Hund gute Ergebnisse erzielen würden, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5.6 Zusammenfassung der Diskussion

Anhand der Revaskularisierung konnte die Vitalität aller Präparate nachgewiesen werden. Ähnlich den autologen Transplantaten unterlag es einem regulären *Bandremodeling*, so dass man von einer Bandheilung bzw. Bandeinheilung sprechen kann. Weiterhin spricht der Nachweis von Kollagen I vom Schwein in den Präparaten für eine vollständige Integration des Implantates. Zusammenfassend kann man sagen, dass das in dieser Studie verwendete Implantat vollständig und entzündungsfrei eingewachsen ist und durch eigenes Gewebe des Versuchstieres ersetzt wurde. Ob es eine geeignete Methode zum Ersatz des humanen Kreuzbandes wäre, müssten weitere Untersuchungen klären.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Histologische Untersuchung eines aus Rattenkollagen gefertigten Implantates zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes beim Minipig

Der derzeitige „Goldene Standard“ bei der Rekonstruktion des VKB des Menschen sind autologe Transplantate. Diese autologen Transplantate sind mit einer hohen Entnahmemorbidität verbunden. Um diesen Nachteil zu umgehen wurde von der Arbeitsgruppe von Meike Haddad-Weber an der Universität Würzburg ein xenogenes Kollagenimplantat entwickelt. In der vorliegenden Studie sollte die Bandheilung sowie die knöcherne Bandeinheilung im Minipig-Model systematisch histologisch analysiert werden.

Methoden: Aus rattinem Kollagen wurde ein xenogenes Implantat eingesetzt, welches bei Minipigs als vorderer Kreuzbandersatz genutzt wurde. Das Implantat wurde per *Endobutton* fixiert. Die Tiere wurden sechs Wochen bzw. sechs Monate post operationem getötet. 13 Tiere wurden für die histologische Auswertung verwendet. Es wurden Paraffinschnittpräparate der Implantate sowie Paraffinschnittpräparate und Kunststoffschnittpräparate der Ossa Femura angefertigt und durchlichtmikroskopisch deskriptiv ausgewertet. Zusätzlich wurden die immunhistochemische Färbung Kollagen I und Faktor-VIII-*related* Antigen angefertigt, wobei in der Faktor-VIII-*related* Antigen Färbung zusätzlich eine semiquantitative Auswertung vorgenommen wurde.

Ergebnisse: In der Sechswochengruppe (n=7) waren alle Präparate vaskularisiert, mit einer synovialen Deckschicht versehen und vital. Ein beginnendes *Bandremodeling* konnte nachgewiesen werden. In allen Präparaten waren eine fibröse Zwischenschicht und Sharpey'sche Fasern ausgebildet. Zusätzlich konnten in allen Präparaten erste Anzeichen zur Ausbildung einer direkten Bandinsertion gefunden werden.

In der Sechsmonatsgruppe (n=6) war die Anzahl der Gefäße höher und das ursprüngliche kollagene Implantatgewebe war nicht mehr nachweisbar. Neu gebildeter Geflechtknochen verengte die Bohrkanäle und in keinem Präparat war eine fibröse Zwischenschicht nachweisbar. In der Sechsmonatsgruppe zeigten fünf von sechs Präparate Anzeichen für die Ausbildung einer direkten Bandinsertion. Anzeichen für eine Synovialitis gab es nicht.

Diskussion: Der Ablauf der Revaskularisierung und des *Bandremodeling* sowie die knöcherne Bandheilung entsprachen weitestgehend den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen autologer Transplantate. Weiterhin sprach der Nachweis von Kollagen I vom Schwein in den Präparaten für eine vollständige Integration des Implantates. Zusammenfassend kann man sagen, dass das in dieser Studie verwendete Implantat zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes im Minipigmodell vollständig und entzündungsfrei eingewachsen und durch eigenes Bandgewebe des Versuchstieres ersetzt wurde. Ob es eine geeignete Methode für den Ersatz des humanen Kreuzbandes ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

7 SUMMARY

Histologic analysis of a rat collagen implant for anterior cruciate ligament reconstruction in a minipig model

Monique Uhlig

The current gold standard for the reconstruction of the human anterior cruciate ligament are autografts. Those autografts are associated with high donor-site morbidity. To avoid this disadvantage, a xenogenic collagen implant was developed in the laboratory of Meike Haddad-Weber at the University of Wuerzburg. This study presents a systematic histological analysis of the healing as well as osseous integration of the ligament in the minipig model.

Methods: Xenogenic implants were prepared from rat collagen and used in minipigs as anterior cruciate ligament replacement. Fixation of the implants was achieved via *Endobutton*. The animals were sacrificed at six weeks and six months post operation, respectively. 13 minipigs were used for histological analysis. Paraffin-embedded sections of the implants as well as paraffin- and plastic-embedded sections of the Ossa femura were prepared and evaluated descriptively by transmitted light microscopy. Furthermore, immunohistological staining for collagen I and factor-VIII-related antigen was performed with semi-quantitative assessment of the factor-VIII-related antigen staining.

Results: In the six-week group (n=7) all samples were well vascularized, covered by a synovial layer and vital. Early ligament remodeling was observed. An interface fibrous layer and Sharpey's fibers had formed in all samples. Moreover, in all samples first signs of direct ligament insertion were found.

In the six-month group (n=6) the number of vessels had increased and the original implant tissue could not be detected anymore. Newly formed reticulated bone constricted the drill channel and in none of the samples an interface fibrous layer was detectable. In this group, five out of six samples showed signs of a direct ligament insertion. No signs of synovialitis were found.

Discussion: The course of the revascularization and ligament remodeling as well as ligament healing corresponds to the results obtained with autografts described in the literature. Furthermore, the detection of pig collagen I in the preparations verifies the complete integration of the implants. In summary, it appears that the implant used in this study integrates completely and without inflammation, and is substituted by ligament tissue of the recipient. Further studies have to show if this is a suitable method for cranial cruciate ligament reconstruction in humans.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aglietti, P., Giron, F, Buzzi, R, Biddan, F und Sasso, F (1998):
Anatomic versus non-anatomic tibial fixation in anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone graft.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 6 Suppl 1, 43-8.

Alvarez, A. (2011):
Die Behandlung der vorderen Kreuzbandruptur beim Hund - Ein Überblick.
Veterinary Focus 21, 39-46.

Apelt, D., Kowaleski MP und Boudrieau RJ (2007):
Effect of tibial tuberosity advancement on cranial tibial subluxation in canine cranial cruciate-deficient stifle joints: an in vitro experimental study.
Vet Surg. 36, 170-177.

Arnoczky, S. (1983):
Anatomy of the anterior cruciate ligament.
Clin Orthop Relat Res. 172, 19-25.

Arnoczky, S., Rubin, RM und Marshall, JL (1979):
Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs.
J Bone Joint Surg Am. 61, 1221-9.

Arnoczky, S., Tarvin, GB und Marshall, JL (1982):
Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog.
J Bone Joint Surg Am. 64, 217-24.

Arnoczky, S., Warren, RF und Ashlock, MA (1986):
Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft.
J Bone Joint Surg Am. 68, 376-85.

Arnoczky, S. und Marshall, JL (1977):
The cruciate ligaments of the canine stifle: An anatomical and functional analysis.
Am J Vet Res. 38, 1807-1814.

Ashton, B., Allen, TD, Howlett, CR, Eaglesom, CC, Hattori, A und Owen, M (1980):
Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo.
Clin Orthop Relat Res. 151, 294-307.

Baron, R. (1989):
Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast.
Anat Res. 224, 317-341.

Basset, C. (1962):
Current concepts of bone formation.
J Bone Joint Surg Am. 44, 1217.

Benjamin, M., Evans, E und Copp, D (1986):
The histology of tendon attachments to bone in man.
J Anat. 149, 89-100.

- Bicer, E., Lustig, S, Servien, E, Selmi, T und Neyret, P (2010):
Current knowledge in the anatomy of the human anterior cruciate ligament.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 18, 1075-1084.
- Blauth, W. (1984):
2-strip substitution-plasty of the anterior cruciate ligament with the quadriceps tendon.
Unfallheilkunde 87, 45-51.
- Blickenstaff, K., Grana, W und Egle, D (1997):
Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model.
Am J Sports Med. 25, 554-559.
- Bosch, U. und Kasperczyk, WJ (1992):
Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction - a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model.
Am J Sports Med. 20, 558-66.
- Böttcher, P., Rey, J und Oechtering, G (2011):
Erste in-vivo Darstellung der dreidimensionalen Kniegelenkskinematik bei gesunden Hunden und solchen nach TPLO oder TTA.
Kleintierpraxis 56. 11, 618.
- Cambell, J. (1998):
The evolution and current treatment trends with anterior cruciate, posterior cruciate and medial collateral ligament injuries.
Am J Knee Surg. 11, 128-135.
- Chang, S., Egami, DK, Shaieb, MD, Khan, DM und Richardson, AB (2003):
Anterior cruciate ligament reconstruction: allograft versus autograft.
Arthroscopy 19, 453-462.
- Claes, S., Verdonk, P, Forsyth, R und Bellemans, J (2011):
The "Ligamentization" process in anterior cruciate ligament reconstruction.
Am J Sports Med. 20, 1-8.
- Clancy, W. J., Narechania, RG, Rosenberg, TD, Gmeiner, JG, Wisnefske, DD und Lange, TA (1981):
Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys.
J Bone Joint Surg Am. 63, 1270-84.
- Clark, J. und Sidles, JA (1990):
The interrelation of fiber bundles in the anterior cruciate ligament.
J Orthop Res. 8, 180-188.
- Clatworthy, M., Annear, P, Bulow, JU und Bartlett, RJ (1999):
Tunnel widening in anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective evaluation of hamstring and patella tendon grafts.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 7, 138-45.
- Cole, D., Ginn, TA, Chen, GJ, Smith, BP, Curl, WWV, Martin, DF und Poehling, GG (2005):
Cost comparison of anterior cruciate ligament reconstruction: autograft versus allograft.
Arthroscopy 21, 786-790.
- Comerford, E., Smith, K und Hayashi, K (2011):
Update on the aetiopathogenesis of canine cranial cruciate ligament disease.
Vet Comp Orthop Traumatol. 24, 91-8.

Conzemius, M., Evans, RB, Besancon, MF, Gordon, WJ, Horstman, CL, Hoefle, WD, Nieves, MA und Wagner, SD (2005):
Effect of surgical technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs.
J Am Vet Med Assoc. 226, 232-6.

Creuss, R. und Dumont, J (1975):
Fracture healing.
Can J Surg. 14, 403-13.

Dodds, J. und Arnoczky, SP (1994):
Anatomy of the anterior cruciate ligament: a blueprint for repair and reconstruction.
Arthroscopy 10, 132-139.

Doom, M., de Bruin, T, de Rooster, H, van Bree, H und Cox, E (2008):
Immunopathological mechanisms in dogs with rupture of the cranial cruciate ligament.
Veterinary Immunology and Immunopathology 125, 143-61.

Drez, D. J., DeLee, J, Holden, JP, Arnoczky, S, Noyes, FR und Roberts, TS (1991):
Anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone allografts. A biological and biochemical evaluation in goats.
Am J Sports Med. 19, 256-63.

Dustmann, M., Schmidt, T, Gangey, I, Unterhauser, FN, Weiler, A und Scheffler, SU (2008):
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. 16, 360-9.

Fahey, M. und Indelicato, PA (1994):
Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament replacement.
Am J Sports Med. 5, 95-100.

Fleming, B., Spindler, KP, Palmer, MP, Magarian, EM und Murray MM (2009):
Collagen-platelet composites improve the biomechanical properties of healing anterior cruciate ligament grafts in a porcine model.
Am J Sports Med. 37, 1554-63.

Forward, A.D. und Cowan, R.J. (1963):
Experimental suture of tendon to bone.
Surg Forum. 11, 458-60.

Friedlaender, G., Strong, DM und Sell, KW (1976):
Studies on the antigenicity of bone. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits.
J Bone Joint Surg Am. 58A, 854-857.

Fromm, B., Schafer, B, Parsch, D und Kummer, W (1996):
Reconstruction of the anterior cruciate ligament with a cryopreserved ACL allograft. A microangiographic and immunohistochemical study in rabbits.
Int Orthop. 20, 378-82.

Gabriel, M., Wong, EK, Woo, SL, Yagi, M und Debski, RE (2004):
Distribution of in situ forces in the anterior cruciate ligament in response to rotatory loads.
J Orthop Res. 22, 85-89.

- Goertzen, M., Dellmann, A, Gruber, J, Clasen, H und Burig, KF (1993):
[Homologous cruciate ligament transplantation as intra-articular ligament replacement].
Z Orthop Ihre Grenzgeb. 131, 179-86.
- Goradia, V., Rochat, MC, Grana, WA und Egle, DM (1998):
Strength of ACL reconstructions using semitendinosus tendon grafts.
J Okla State Med Assoc. 91, 275-7.
- Grana, W., Egle, DM, Mahnken, R und Goodhart, CW (1994):
An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model.
Am J Sports Med. 22, 344-351.
- Grood, E., Noyes, FR, Butler, DL und Suntay, WJ (1981):
Ligamentous and capsular restraints preventing straight medial and lateral laxity in intact human cadaver knees.
J Bone Joint Surg Am. 63, 1257-69.
- Guénégo, L., Zahra, A, Madel, A, Gautier, R, Marcellin-Little, DJ und Hulse, D (2007):
Cranial cruciate ligament rupture in large and giant dogs; a retrospective evaluation of a modified lateral extracapsular stabilization.
Vet comp Ortho Trauma. 20, 43-50.
- Hara, K., Sekiya, I, Yamaguchi, K, Akita, K und Muneta, T (2009):
Anatomy of Normal Human Anterior Cruciate Ligament Attachments Evaluated by Divided Small Bundles.
Am J Sports Med. 37, 2386-91.
- Harasen, G. (2003):
Canine cranial cruciate ligament rupture in profile.
Can Vet J. 44, 845-846.
- Harris, A., Stopak, D und Wild, P (1981):
Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis.
Nature 290, 249-251.
- Heffron, L. und Campbell, JR (1978):
Morphology, histology, and functional anatomy of the canine cranial cruciate ligament.
Vet Rec. 102, 280-3.
- Hey-Groves, B. (1920):
The crucial ligaments of the knee joint: their function, rupture and operative treatment of the same.
Br J Surg. 7, 505-515.
- Höher, J., Livesay, GA, Ma, CB, Withrow, JD, Fu, FH und Woo, SL (1999):
Hamstring graft motion in the femoral bone tunnel when using titanium button/polyester tape fixation.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 7, 215-9.
- Höher, J., Möller, H und Fu, F (1998):
Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction: Fact or fiction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 6, 231-240.
- Hunt, P., Scheffler, SU, Unterhauser, FN und Weiler, A (2006):
A model of soft-tissue graft anterior cruciate ligament reconstruction in sheep.
Arch Orthop Trauma Surg. 125, 238-48.

- Ishibashi, Y., Rudy, TW, Livesay, GA, Stone, JD, Foo, FH und Woo, SL (1997):
The effect of anterior cruciate ligament graft fixation site at the tibia on knee stability:
evaluation using a robotic testing system.
Arthroscopy 13, 177-82.
- Jackson, D., Grood, ES, Cohn, BT, Arnoczky, SP, Simon, TM und Cummings, JF (1993):
The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in
goats.
J Bone Joint Surg Am. 73, 201-13.
- Jäger, A. (2005):
Vordere Kreuzbandplastik: Langzeitprognose.
Arthroskopie 18, 53-59.
- Jakobsson, A. und Nilsson, GE (1993):
Prediction of sampling depth and photon pathlength in laser Doppler flowmetry.
Med. Biol Eng Comput. 31, 301-7.
- Janssen, R., van der Wijk, J, Fiedler, A, Schmidt, T, Sala, HAGM und Scheffler, SU
(2011):
Remodelling of human hamstring autografts after anterior cruciate ligament
reconstruction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 19, 1299-1306.
- Jansson, K., Harilainen, A, Sandelin, J, Karjalainen, PT, Aronen, HJ und Tallroth, K
(1999):
Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with the hamstring
autograft and endobutton fixation technique. A clinical, radiographic and magnetic
resonance imaging study with 2 years follow-up.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 7, 290-5.
- Jones, J., Smibert, JG, McCullough, CJ, Price, AB und Hutton, WC (1987):
Tendon implantation into bone: an experimental study.
J Hand Surg Br. 12, 306-12.
- Jones, R. (1916):
Disabilities of the knee joint.
Br Med J. 2, 169-173.
- Jorgensen, U. und Thomson, HS (2000):
Behavior of the graft within the bone tunnels following anterior cruciate ligament
reconstruction, studied by cinematic magnetic resonance imaging.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 8, 32-5.
- Joschi, S., Mastrangelo, AN, Magarian, EM, Fleming, BC und Murray, MM (2009):
Collagen-Platelet Composite Enhances Biomechanical and Histologic Healing of the
Porcine Anterior Cruciate Ligament.
Am J Sports Med. 37, 2401-10.
- Kennedy, J., Weinberg, HW und Wilson, HS (1974):
The anatomy and function of the anterior cruciate ligament. As determined by clinical and
morphological studies.
J Bone Joint Surg Am. 56, 223-35.
- Kleiner, B., Amiel, D, Roux, RD und Akeson, WH (1986):
Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft.
J Orthop Res. 4, 466-74.

- L'Insalata, J., Klatt, B, Fu, F und Harner, C (1997):
Tunnel expansion following anterior cruciate ligament reconstruction: A comparison of hamstring and patellar tendon autografts.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 5, 234-38.
- Lafaver, S., Miller, MA, Stubbs, WP, Taylor, RA und Boudrieau, RJ (2007):
Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complications in 101 dogs.
Vet Surg. 36, 573-86.
- Lane, J., Boskey, AL und Li, WKP (1979):
A temporal study of collagen, proteoglycans, lipids and mineral constituents in a model of endochondral osseous repair.
Metabolic Bone Disease Related Research 1d, 319.
- Liebig, H. (1999):
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. – 3 Binde- und Stützgewebe,
Stuttgart: F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH. - ISBN:3-7945-1899-3.3.3, 52-84.
- Liu, S., Panossian, V, al-Shaikh, R, Tomin, E, Shepherd, E, Finerman, GA und Lane, JM (1997):
Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing.
Clin Orthop Relat Res., 253-60.
- Lobenhoffer, P. und Agneskirchner, JD (2005):
Vorderes Kreuzband - was ist gesichert?
Arthroskopie 18, 11-14.
- Lützner, J. und Bottesi, M (2009):
Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. Für und Wider aktuell gebräuchlicher Techniken.
Trauma Berufskrankh. 11, 136-139.
- Ma, C., Francis, K, Towers, J, Irrgang, J, Fu, FH und Harner, CH (2004):
Hamstring anterior cruciate ligament reconstruction: a comparison of bioabsorbable interference screw and endobutton-post fixation.
Arthroscopy 20, 122-8.
- Machotka, Z., Scarborough, I, Duncan, W, Kumar, S und Perraton, L (2010):
Anterior cruciate ligament repair with LARS (ligament advanced reinforcement system): a systematic review.
Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol. 2, 29.
- Majewski, M., Susanne, H und Klaus, S (2006):
Epidemiology of athletic knee injuries: a 10-year study.
Knee 13, 184-8.
- Markolf, K., Mensch, JS und Amstutz, HC (1976):
Stiffness and laxity of the knee - the contribution of the supporting structures.
J Bone Joint Surg Am. 58, 583-94.
- Marks, S. J. (1983):
The origin of osteoclasts: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra-skeletal source.
J Oral Pathol. 12, 226.

Marks, S. und Popoff, SN (1988):

The regulation of development, structure and function in the skeleton.
Am J Anat. 183,1.

Marrale, J., Morrissey, MC und Haddad, FS (2007):

A literature review of autograft and allograft anterior cruciate ligament reconstruction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 15, 690-704.

Mastrokalos, D., Springer, J, Siebold, R und Paessler, HH (2005):

Donor site morbidity and return to the preinjury activity level after anterior cruciate ligament reconstruction using ipsilateral and contralateral patellar tendon autograft: a retrospective, nonrandomized study.
Am J Sports Med. 33, 85-93.

Masur, S., Dewal, HS, Dinh, TT, Erenburg, I und Petridou, S (1996):

Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density.
Proc Natl Acad Sci USA. 93, 4219-4223.

McMaster, J., Weinert, CR Jr und Scranton, P Jr (1974):

Diagnosis and management of isolated anterior cruciate ligament tears: a preliminary report on reconstruction with the gracilis tendon.
J Trauma. 14, 230-5.

Messner, K. (1997):

Postnatal development of the cruciate ligament insertions in the rat knee- Morphological evaluation and immunohistochemical study of collagens type I and II.
Acta Anat. 160, 261-268.

Mueller, X., Tevæearai, HT, Jegger, D, Tucker, O und von Segesser, LK (2001):

Are standart human coagulation tests suitable in pigs and calves during extracorporeal circulation?
Artif Organs. 25, 579-584.

Muir, P., Schwartz, Z, Malek, S, Kreines, A, Cabrera, SY, Buote, MJ, Bleedorn, JA, Schaefer, SL, Holzman, G und Hao, Z (2011):

Contralateral cruciate survival in dogs with unilateral non-contact cranial cruciate ligament rupture.
PLoS One 6, e25331.

Müller, A., Seide, K, Fuchs, S, Wurm, M und Jürgens, C (2007):

Vordere Kreuzbandersatzplastik.
Trauma Berufskrankh. 9, 122-127.

Müller, B., Rupp, S, Kohn, D und Seil, R (2000):

Entnahmestellenproblematik nach vorderer Kreuzbandplastik mit dem mittleren Drittel der Patellarsehne.
Unfallchirurg 103, 662-7.

Murray, M., Weiler, A und Spindler, KP (2004):

Interspecies variation in the fibroblast distribution of the anterior cruciate ligament.
Am J Sports Med. 32, 1484-91.

Murray, M. und Spector, M (1999):

Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positiv cells.
J Orthop Res. 17, 18-27.

- Nebelung, W., Becker, R, Merkel, M und Ropke, M (1998):
Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with semitendinosus tendon using Endobutton fixation on the femoral side.
Arthroscopy 14, 810-5.
- Nebelung, W., Becker, R, Urbach, D, Ropke, M und Roessner, A (2003):
Histological findings of tendon-bone healing following anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring grafts.
Arch Orhop Trauma Surg. 123, 158-63.
- Nikolaou, P., Seaber, AV, Glisson, RR, Ribbeck, EM und Bassett, FH (1986):
Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique.
Am J Sports Med. 14, 348-60.
- Pan, W., Hu, Y, Wei, Y, Bi, L, Li, D, Wang, J, Lv, R, Li, J und Cao, Z (2009):
Recombined bone xenografts enhance tendon graft osteointegration of anterior cruciate ligament reconstruction.
Int Orthop. 33, 1761-8.
- Pässler, H. (2010):
Die Geschichte des implantatfreien Kreuzbandersatzes.
Unfallchirurg 113, 524-31.
- Petersen, W. und Tillmann B. (1995):
Die Insertionszone des vorderen Kreuzbandes.
Ann Anat. 257, 345.
- Petersen, W. und Tillmann B. (1999):
Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint.
Anat Embryol (Berl). 200, 325-334.
- Petersen, W. und Tillmann B. (2002):
Anatomy and function of the anterior cruciate ligament.
Orthopäde 31, 710.
- Petersen, W., Unterhauser, F, Pufe, T, Zantop, T, Südkamp, NT und Weiler, A (2003):
The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep.
Arch Orhop Trauma Surg. 123, 168-74.
- Petersen, W. und Hansen, U (1997):
Blood and lymph supply of the anterior cruciate ligament: Cadaver study by immunohistochemical and histochemical methods.
J Orthop Sci. 2, 313-318.
- Petersen, W. und Laprell, H (2000):
Insertion of autologous tendon grafts to the bone: a histological and immunohistological study of hamstring and patellar tendon grafts.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 8, 26-31.
- Pinczewski, L., Clingeleffer, AJ, Otto, DD, Bonar, SF und Corry, IS (1997):
Integration of hamstring tendon graft with bone in reconstruction of the anterior cruciate ligament.
Arthroscopy 13, 641-3.

- Pinkowski, J., Reimann, PR und Chen, SL (1989):
Human lymphocyte reaction to freeze-dried allograft and xenograft ligamentous tissue.
Am J Sports Med. 17, 595-600.
- Prokopis, P. und Schepsis, AA (1999):
Allograft use in ACL reconstruction.
Knee 6, 75-85.
- Radford, W., Amis, AA und Stead, AC (1996):
The ovine stifle as a model for human cruciate ligament surgery.
Vet Comp Ortho Trauma. 9, 134-139.
- Reif, U. und Probst, CW (2003):
Comparison of tibial plateau angles in normal and cranial cruciate deficient stifles of
Labrador retrievers.
Vet Surg. 32, 385-9.
- Remidios, A. (1999):
Bone and Bone Healing.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 29, 1029-1044.
- Ristanis, S., Giakas, G, Papageorgiou, CD, Moraiti, T, Stergiou, N und Georgoulis, AD
(2003):
The effects of anterior cruciate ligament reconstruction on tibial rotation during pivoting
after descending stairs.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 11, 360-5.
- Rodeo, S., Arnoczky, S, Torzilli, P, Hidaka, C und Warren, R (1993):
Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog.
J Bone Joint Surg Am. 75, 1795-1803.
- Roe, S., Kue, J und Gemma, J (2008):
Isometry of potential suture attachment sites for the cranial cruciate ligament deficient
canine stifle.
Vet comp Ortho Trauma. 21, 215-20.
- Romeis, B. (1989):
Mikroskopische Technik.
Hrsg. Böck, P., 17. neubearbeitete Auflage,
Urban & Schwarzenberg, München, ISBN 3-541-11227-1.
- Rougraff, B., Shelbourne, KD, Gerth, GK und Warner, J (1993):
Arthroscopic and histologic analysis of human patellar tendon autografts used for anterior
cruciate ligament reconstruction.
Am J Sports Med. 21, 277-84.
- Rushton, N., Adams, SB, Houlton, JB und Allen, MJ (1998):
The surgical anatomy of the stifle joint in sheep.
Vet Surg. 27, 596-605.
- Saccomanni, B. (2011):
Graft fixation alternatives in anterior cruciate ligament reconstruction.
Musculoskelet Surg. 95, 183-91.

- Seitz, H., Hausner, T, Schlenz, I, Lang, S und Eschberger, J (1997):
Vascular anatomy of the ovine anterior cruciate ligament. A microscopic, histological and radiographic study.
Arch Orthop Trauma Surg. 116, 19-21.
- Shearer, P. (2011):
Epidemiologie orthopädischer Erkrankungen.
Veterinary Focus 21, 24-25.
- Shino, K., Inoue, M, Horibe, S, Nakata, K, Maeda, A und Ono, K (1991):
Surface blood flow and histology of human anterior cruciate ligament allografts.
Arthroscopy 7, 171-6.
- Shino, K., Kawasaki, T, Hirose, H, Gotoh, I, Inoue, M und Ono, K (1984):
Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogenic tendon graft. An experimental study in the dog.
J Bone Joint Surg Br. 66, 672-81.
- Shino, K. und Horibe, S. (1991):
Experimental ligament reconstruction by allogenic tendon graft in a canine model.
Acta Orthop Belg. 57, 44-53.
- Slocum, B. und Slocum, T.D. (1993):
Tibial plateau leveling osteotomy for repair of cranial cruciate ligament rupture in the canine.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 23, 777-95.
- Stark, J. (1850):
Two cases of ruptured crucial ligaments of the knee-joint.
Med Surg Edinburgh 5, 267-271.
- Stäubli, H., Schatzmann, L, Brunner, P, Rincón, L und Nolte, LP (1996):
Quadriceps tendon and patellar ligament: cryosectional anatomy and structural properties in young adults.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 4, 100-10.
- Stone, K., Walgenbach, AW, Turek, TJ, Somers, DL, Wicomb, W und Galili, U (2007):
Anterior cruciate ligament reconstruction with a porcine xenograft: a serologic, histologic, and biomechanical study in primates.
Arthroscopy 4, 411-9.
- Tomita, F., Yasuda, K, Mikami, S, Sakai, T, Yamazaki, S und Tohyama, H (2001):
Comparisons of intraosseus graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction.
Arthroscopy 17, 461-76.
- Unterhauser, F.N., Bail, HJ, Höher, J, Haas, NP und Weiler, A (2003):
Endoligamentous revascularization of an anterior cruciate ligament graft.
Clin Orthop. 414, 276-88.
- Unterhauser, F.N., Dahne, M, Schlichting, K, Weiler, A (2006):
Comparison of tendon-to-bone healing using soft tissue autografts and BPTB-autografts in a sheep model of ACL-reconstruction.
In 12th ESSKA 2000 Congress.2006. Innsbruck

Vaes, G. (1988):

Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption: A review of recent developments on the formation, activation and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res.*, 239-71.

Vairo, G., Myer, JB, Sell, TC, Fu, FH, Harner, CD und Lephart, SM (2008):

Neuromuscular and biomechanical landing performance subsequent to ipsilateral semitendinosus and gracilis autograft anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 16, 2-14.

Vasseur, P. (1984):

Clinical results following nonoperative management for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *Vet Surg.* 13, 243-246.

Wallace, C. und Amiel, D (1991):

Vascular assessment of the periarticular ligaments of the rabbit knee. *J Orthop Res.* 9, 787-91.

Weiler, A., Förster, C, Hunt, P, Falk, R, Jung, T, Unterhauser, FN, Bergmann, V, Schmidmaier, G und Haas, NP (2003):

The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction - The use of a biodegradable drug delivery tool in a sheep model. *Am J Sports Med.* 32, 881-91.

Weiler, A., Hoffmann, RFG, Bail, HJ, Rehm, O und Südkamp, NP (2002):

Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 18, 124-135.

Weiler, A., Mäurer, J, Unterhauser, FA und Südkamp, NP (2001):

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.* 29, 751-61.

Weiler, A., Peine, R, Pashmineh-Azar, A, Abel, C, Südkamp, NP, Hoffmann, RF (2002):

Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 18, 113-23.

Weiler, A., Unterhauser, FN, Bail, H-J, Hüning, M und Haas, NP (2002):

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.* 20, 310-317.

Wen CY, Q. L., Lee KM, Wong MWN und Chan KM (2010):

Grafted Tendon Healing in Tibial Tunnel Is Inferior to Healing in Femoral Tunnel After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Histomorphometric Study in Rabbits. *Arthroscopy* 26, 58-66.

Wilke, V., Conzemius, MG, Besancon, MF, Evans, RB und Ritter, M (2002):

Comparison of tibial plateau angle between clinically normal Greyhounds and Labrador Retrievers with and without rupture of the cranial cruciate ligament. *J Am Vet Med Assoc.* 221, 1426-9.

Wittek, A. (1935):

Kreuzbandersatz aus dem Lig. patellae.
Schweiz Med Wochenschau 65, 103-104.

Woo, S., Hollis, JM, Adams, DJ, Lyon, RM und Takai, S (1991):

Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex. The effect of specimen age and orientation.
Am J Sports Med. 19, 217-25.

Woo, S., Kanamori, A, Zeminski, J, Yagi, M, Papageorgiou, C und Fu, FH (2002):

The effectiveness of reconstruction of the anterior cruciate ligament with hamstrings and patellar tendon. A cadaveric study comparing anterior tibial and rotational loads.
J Bone Joint Surg Am. 84-A, 907-14.

Xerogeanes, J., Fox, RJ, Takeda, Y, Kim, HS, Ishibashi, Y, Carlin, GJ und Woo, SL (1998):

A functional comparison of animal anterior cruciate ligament model to the human anterior cruciate ligament.
Ann Biomed Engin. 26, 345-52.

Yastrebov, O. und Lobenhoffer, P. (2009):

Isolierte und kombinierte Kniebandverletzungen.
Orthopäde 38, 563-580.

Yoshiya, S., Nagano, M, Kurosaka, M, Muratsu, H und Mizuno, K (2000):

Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction.
Clin Orthop Relat Res., 278-86.

Zantop, T., Petersen, W, Sekiya, JK, Musahl, V und Fu, FH (2006):

Anterior cruciate ligament anatomy and function relating to anatomical reconstruction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 14, 982-992.

Zantop, T., Weimann, A, Wolle, K, Musahl, V, Langer, M und Petersen, W (2007):

Initial and 6 weeks postoperative structural properties of soft tissue anterior cruciate ligament reconstructions with cross-pin or interference screw fixation: an in vivo study in sheep.
Arthroscopy 23, 14-20.

Zysk SP, F. P., Veihelmann A, Dorger M, Kalteis T, Maier M, Pellengahr C und Refior HJ (2004):

Tunnel enlargement and changes in synovial fluid cytokine profile following anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon and hamstring tendon autografts.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 12, 98-103.

9 ANHANG

9.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	= Abbildung
BDGF	= engl. <i>bone derived growth factor</i>
BG	= Bindegewebe
BPTB	= engl. <i>bone-patellar-tendon-bone</i>
BSP	= engl. <i>Bone Sialoprotein</i>
BTB	= engl. <i>bone-tendon-bone</i>
C	= Fältelung (engl. <i>crimp</i>)
ca.	= circa
CTT	= engl. <i>cranial tibial thrust</i>
dest.	= einfach destilliert (lat. <i>destillata</i>)
EDTA	= Ethyldiamintetraazetat
EGF	= engl. <i>epidermal growth factor</i>
engl.	= englisch
et al.	= und andere (lat. <i>et alii</i>)
Fa.	= Firma
FIZ	= bindegewebige Zwischenschicht (engl. <i>fibrous interzone</i>)
FK	= Faserknorpel
FVIIIrA	= Faktor-VIII-verwandtes Antigen (engl. <i>Faktor-VIII-related Antigen</i>)
G	= Gefäße
ggr.	= geringgradig
GK	= Geflechtknochen
HCL	= Salzsäure
HKB	= hinteres Kreuzband
Imp	= Implantat
IgG	= Immunglobulin Gamma

IgM	= Immunglobulin M
IL	= Interleukin
KBR	= Kreuzbandriss
KF	= Kollagenfasern
KFB	= Kollagenfaserbündelung
KK	= Kalkknorpel
LARS	= engl. <i>ligament advanced reinforcement system</i>
lat.	= lateinisch
M.	= lat. <i>Musculus</i>
MEA	= (2-Methoxyethyl)-acetat
MHC-Proteine	= engl. <i>major histocompatibility proteins</i>
Min.	= Minute
MRZ	= mehrkernige Riesenzellen
N.	= lat. <i>Nervus</i>
NaCl	= Natriumchlorid
NM	= Nahtmaterial
NO	= Stickstoffmonoxid
op.	= lat. <i>operationem</i>
PBS	= Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Phosphate-buffered Saline</i>)
PDGF	= engl. <i>Platelet derived growth factor</i>
pH	= negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration (lat. <i>potentia Hydrogenii</i>)
PMS	= Phosphormolybdänsäure
PWS	= Phosphorwolframsäure
RBX	= engl. <i>combined bone xenograft</i>
ROI	= engl. <i>region of interest</i>
S	= Septierung
SyD	= synoviale Deckschicht

SF	= Sharpey'sche Fasern
SSBG	= subsynoviales Bindegewebe
TNF	= Tumor Nekrose Faktor
TPLO	= engl. <i>Tibial Plateau Leveling Osteotomy</i>
TTA	= engl. <i>Tibial Tuberosity Advancement</i>
TTO	= engl. <i>Triple Tibial Osteotomy</i>
TWO	= engl. <i>Tibial Wedge Osteotomy</i>
VEGF	= engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VKB	= vorderes Kreuzband

9.2 Verzeichnis der verwendeten Entwässerungs- und Färbeprotokolle

Entwässerungsprotokoll Paraffinschnitte:

Wasser	0,5 Stunden
EDTA	48 Stunden
Wasser	0,5 Stunden
Ethylalkohol 70 %	24 Stunden
Ethylalkohol 80 %	24 Stunden
Ethylalkohol 80 %	24 Stunden
Ethylalkohol 96 %	24 Stunden
Ethylalkohol 96 %	4 Tage
Ethylalkohol 100 %	7 Tage
Xylol	24 Stunden

Entwässerungsprotokoll der Paraffinschnitte im Entwässerungsautomaten:

Ethylalkohol 70 %	8 Stunden
Ethylalkohol 80 %	4 Stunden
Ethylalkohol 80 %	4 Stunden
Ethylalkohol 96 %	8 Stunden
Ethylalkohol 96 %	10 Stunden
Ethylalkohol 100 %	10 Stunden
Ethylalkohol 100 %	10 Stunden
Ethylalkohol 100 %	10 Stunden
Xylol	1 Stunde
Xylol	1,5 Stunden
Paraffin	2,5 Stunden
Paraffin	2 Stunden

Entwässerungsschema Kunststoffeinbettung laterale Knochenscheiben:

Ethylalkohol 70 %	für 7 Tage
Ethylalkohol 80 %	für 7 Tage
Ethylalkohol 80 %	für 7 Tage
Ethylalkohol 96 %	für 7 Tage
Ethylalkohol 96 %	für 7 Tage
Ethylalkohol 100 %	für 7 Tage
Ethylalkohol 100 %	für 7 Tage
Ethylalkohol 100 %	für 7 Tage
Xylol 100 %	2x eine halbe Stunde zur Entfettung

Masson Goldner Trichromfärbung

Vorbereitung der Lösungen zum Färben:

- PMS-Orange-G:
3 - 5 g PMS (Phosphormolybdänsäure, Merck 1.00532) und 2 g Orange-G (Orange-G, Merck 1.15925) in 100 ml Aqua dest. Lösen
- Lichtgrün:
1 - 2 g Lichtgrün (Lichtgrün, Chroma 1B211) in 1000 ml Aqua dest. Lösen, dann 2 ml Eisessig zugeben
- Weigert's Eisenhämatoxylin:
Lösung A (Chroma 2E032) und B (Chroma 2E052) zu gleichen Teilen frisch zusammengeben
- Säurefuchsin-Ponceau
Gebrauchsfertige Lösung (Chroma 2C149)

Färbeprotokoll:

- | | |
|--|-------------------|
| 1. Entparaffinieren in Xylol | 3 x 5 Minuten |
| oder entparaffinieren in Xylol | 3 x 5 Minuten |
| 2. absteigende Alkoholreihe (Ethylalkohol 100 %, Ethylalkohol 96 %, Ethylalkohol 80 %) | je 2 Minuten |
| 3. Aqua dest. | 2 Minuten |
| 4. Weigert's Eisenhämatoxylin | 4 Minuten |
| 5. Leitungswasser | 10 Minuten |
| 6. Säurefuchsin-Ponceau | 5 Minuten |
| 7. Essigsäure 1 %ig | abspülen |
| 8. Differenzieren unter Sichtkontrolle in PMS-Orange-G | 15 s – 30 Minuten |
| 9. Essigsäure 1 %ig | abspülen |
| 10. Aqua dest. | spülen |
| 11. Lichtgrün | 5 – 10 Minuten |
| 12. Essigsäure 1 %ig | abspülen |
| 13. Ethylalkohol 100 % | 3 x kurz spülen |
| 14. Xylol | 2 x 5 Minuten |

HE-Färbung

Färbeprotokoll:

- | | |
|---|---------------------|
| 1. entplasten in MEA* | 3 x 30 Minuten |
| oder entparaffinieren in Xylol | 3 x 5 Minuten |
| 2. absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %) | je 2 Minuten |
| 3. Aqua dest. | 2 Minuten |
| 4. Hämatoxylin nach Harris | 7 Minuten |
| 5. Spülen mit Aqua dest. | 3 x |
| 6. HCL Alkohol (0,25 %) | kurz eintauchen |
| 7. Wässern in Leitungswasser | 10 Minuten |
| 8. Eosin* * | 1 Minute eintauchen |

- | | |
|--------------------------------------|---------------|
| 9. Entwässern mit 96 %igen Alkohol | 2 x |
| 10. Entwässern mit 100 %igen Alkohol | 2 x |
| 11. Xylol | 2 x 5 Minuten |

*MEA ([2-Methoxyethyl]-acetat zur Synthese, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland)

**frisches Eosin + 3 – 5 Tropfen 99 %ige Essigsäure

Die Färbung nach Movat Pentachrom

Färbeprotokoll:

- | | |
|---|-----------------|
| 1. Entplasten in MEA | 3 x 30 Minuten |
| oder Entparaffinieren in Xylol | 3 x 5 Minuten |
| 2. absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %) | je 2 Minuten |
| 3. Aqua dest. | 2 Minuten |
| 4. Alcianblau | 10 Minuten |
| 5. Leitungswasser | spülen |
| 6. Alkalischer Ethylalkohol* | 1 Stunde |
| 7. Leitungswasser, fließend | 10 Minuten |
| 8. Aqua dest. | Eintauchen |
| 9. Weigert's Eisenhämatoxylin | 10 Minuten |
| 10. Leitungswasser, fließend | 10 Minuten |
| 11. Aqua dest. | 2 Minuten |
| 12. Brillant Crocein-Säurefuchsin | 10 – 15 Minuten |
| 13. Essigsäure 0,5 %ig | kurz spülen |
| 14. PWS (Phosphorwolframsäure) 5 % | 20 Minuten |
| 15. Essigsäure 0,5 %ig | kurz spülen |
| 16. Ethylalkohol 100 % | 3 x 5 Minuten |
| 17. Saffron du Gatinais | 1 Stunde |

18. Ethylalkohol 100 %	3 x spülen
19. Ethylalkohol 100 %	2 Minuten
20. Xylol	2 x 5 Minuten

* Alkalischer Ethylalkohol – 10 ml NH₃OH + 90 ml 96 % EtOH

Kerngegenfärbung bei der Faktor VIII Färbung und der Kollagen I Färbung

1. Aqua dest.	5 Minuten
2. Hämotoxylin nach Mayer*	3 Minuten
3. Leitungswasser	10 Minuten

*Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Hämalaun RL, Dr. K Hallborn & Söhne, Leipzig, Deutschland) 1:2 verdünnt in Aqua dest.

Alle im Anhang aufgeführten Entwässerungs- und Färbeprotokolle wurden von den Mitarbeitern der Labore der Charité in Anlehnung an Romeis, B. „Mikroskopische Technik“ (1989) etabliert und sind bewährte Hausprotokolle.

9.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. med. vet. Hanna Schell für die Überlassung des interessanten Themas, ihre immerwährende Unterstützung bei der Umsetzung und den Korrekturen.

Ein besonderer Dank geht weiterhin an meinen Doktorvater Prof. Dr. Achim Gruber für die Betreuung, die Korrektur und Anregungen zu meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe MCW Nöth der Universität Würzburg für die Einbindung in ihre Studie und ihr entgegengebrachtes Vertrauen danken, hier insbesondere Meike Haddad-Weber.

Ein großer Dank gebührt Marzena Princ und Gabriela Korus für ihre geduldige Einarbeitung und Betreuung im Labor. Ohne Eure Hilfe wäre ich verzweifelt. Ein großer Dank auch an Mario, der mir geduldig die undurchsichtige Welt der EDV näher gebracht hat.

Auch meinen Kollegen in der Praxis danke ich, sie haben immer problemlos alles möglich gemacht, um mir genügend Zeit für diese Dissertation zu schaffen.

Meiner Familie möchte ich ganz besonders danken, vor allem meinem Mann, für Nachsichtigkeit, Geduld und stetige Motivation für das Projekt „Doktorarbeit“. Ohne Euch wäre es vermutlich nicht mehr zustande gekommen. Insbesondere meine Mutter kämpfte immer wieder erfolgreich mit den Rechtschreibkorrekturen.

9.4 Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel

**Histologische Untersuchung eines aus Rattenkollagen gefertigten Implantates zur
Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes beim Minipig**

selbstständig verfasst habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, März 2013

Monique Uhlig