

Aus dem
Institut für Veterinär- Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und der
Charité Universitätsmedizin Berlin
Zentrum für muskuloskeletale Chirurgie
Campus Virchow Klinikum

**Untersuchung und Vergleich der Sehnen-Knochen-Einheilung
eines freien autogenen und allogenen Sehnentransplantates zum
Ersatz des vorderen Kreuzbandes**
-eine histologische Langzeitstudie am Schafmodell-

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Judith Keil
Tierärztin aus Hattingen

Berlin 2012
Journal-Nr.: 3592

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Roland Rudolph
Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Sven Scheffler
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christoph Lischer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
ligaments, allografts, autografts, knees, sheep

Tag der Promotion: 21.06.2013

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: 978-3-86387-349-3
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012
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 2013 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>VI-VII</u>
<u>1. EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
<u>2. LITERATURTEIL.....</u>	<u>3</u>
2.1 ANATOMIE DES INTAKTEN KREUZBANDES.....	3
2.1.1 MAKROSKOPISCHE ANATOMIE.....	3
2.1.2 FUNKTION DES VKB.....	5
2.1.3 MIKROSKOPISCHE ANATOMIE.....	6
2.2 INSERTION VON BÄNDERN.....	7
2.2.1 DIREKTE BANDINSERTION.....	8
2.2.2 INDIREKTE BANDINSERTION.....	9
2.3 GRUNDSÄTZE SEHNENHEILUNG.....	11
2.3.1 HEILUNGSVORGÄNGE IM TRANSPLANTAT.....	11
2.3.2 KNOCHEN-BAND-HEILUNG.....	13
2.4 REKONSTRUKTION.....	15
2.4.1 TRANSPLANTATAUSWAHL.....	15
2.4.2 FIXATIONSMETHODIK FREIER SEHNENTRANSPLANTATE.....	21
2.5 ZIEL DER UNTERSUCHUNG.....	23
<u>3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....</u>	<u>24</u>
3.1 STUDIENDESIGN.....	24
3.2 AUSWAHL TIERMODEL UND STANDZEITEN.....	24
3.3 AUSWAHL DER TIERE UND TIERHALTUNG.....	26
3.4 OPERATION.....	27
3.4.1 OPERATIONSVORBEREITUNG.....	27
3.4.2 TRANSPLANTATENTNAHME.....	28
3.4.3 KREUZBANDERSATZ.....	30
3.5 RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	32
3.6 POLYCHROME SEQUENZMARKIERUNG.....	32
3.7 TÖTUNG.....	34
3.8 BIOMECHANISCHE TESTUNG.....	34

3.9 HISTOLOGIE	34
3.9.1 PRÄPARATFIXIERUNG UND SÄGEN DER KNOCHEN	34
3.9.2 ENTWÄSSERUNG UND EINBETTUNG.....	36
3.9.3 ANFERTIGEN DER SCHNITTE AM MIKROTOM	37
3.9.4 FÄRBEN DER PRÄPARATE	37
3.9.5 SCHLIFFHERSTELLUNG	38
3.9.6 DESKRIPTIVE AUSWERTUNG DER SCHNITTPRÄPARATE.....	39
3.9.7 AUSWERTUNG DER SCHLIFFE.....	41
<u>4. ERGEBNISSE.....</u>	<u>42</u>
4.1 ALLGEMEINES.....	42
4.1.1 KOMPLIKATIONEN.....	42
4.1.2 GANGANALYSE	42
4.2 MAKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	43
4.3 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	44
4.3.1 ERGEBNISSE DER 6-WOCHEN-GRUPPE	44
4.3.1.1 Knochen-Band-Heilung	44
4.3.1.2 Transplantat.....	47
4.3.1.3 Knochenumbau.....	49
4.3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	51
4.3.2 ERGEBNISSE DER 12-WOCHEN-GRUPPE	53
4.3.2.1 Knochen-Band-Heilung	53
4.3.2.2 Transplantat.....	56
4.3.2.3 Knochenumbau.....	58
4.3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	60
4.3.3 ERGEBNISSE DER 52-WOCHEN-GRUPPE	62
4.3.3.1 Knochen-Band-Heilung	62
4.3.3.2 Transplantat.....	65
4.3.3.3 Knochenumbau.....	66
4.3.3.4 Fluoreszenzauswertung.....	68
4.4 TABELLARISCHE AUSWERTUNG DER DIREKTEN BANDINSERTION	70
4.4.1 TIBIALE TABELLARISCHE AUSWERTUNG	70
4.4.2 FEMORALE TABELLARISCHE AUSWERTUNG.....	71
<u>5. DISKUSSION</u>	<u>72</u>
5.1 DIREKTE VERSUS INDIREKTE HEILUNG.....	72
5.2 AUTOLOGE VERSUS ALLOGENE TRANSPLANTATE	76
5.3 METHODENKRITIK	81
5.4 SCHLUSSFOLGERUNG	82
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>83</u>
<u>7. SUMMARY</u>	<u>85</u>

8. LITERATURVERZEICHNIS	87
9. ANHANG	102
9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
9.2 TABELLENVERZEICHNIS	106
9.3 DANKSAGUNG.....	107
9.4 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	108

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AB	Alcian-Blau-Färbung
Abb.	Abbildung
BPTB	Patellarsehne (bone patellar tendon bone)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
dest.	destillatum
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	und andere
FIZ	fibröse Zwischenschicht (fibrous interzone)
g	Gramm
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HKB	Hinteres Kreuzband
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
M.	Musculus
mAs	MilliAmpèreSekunde
MG	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mrad	Millirad
MRT	Magnetresonanztomografie

N	Newton
nm	Nanometer
pol	Polarisationsfilter
sec	Sekunde
SLF	Sharpey ähnliche Fasern (sharpey like fibers)
SF	Sharpey Fasern
SOK	Safranin-O/ von Kossa-Färbung
Tab.	Tabelle
UV	ultraviolett
V.	Vena
VKB	Vorderes Kreuzband
vs.	im Gegensatz zu (versus)

1. Einleitung

Das Vordere Kreuzband (VKB) ist die häufigste verletzte Bandstruktur des Menschen (Miyasaka et al., 1991, Bradley et al., 2002). Neben verbesserten diagnostischen Möglichkeiten ist die steigende Inzidenz durch die Zunahme der leistungs- und freizeitsportlichen Betätigung der Gesamtbevölkerung auch bis ins hohe Alter zu erklären.

Eine Ruptur des VKB kommt dabei durch direkte Kraffeinleitung wie einen Schlag auf das Kniegelenk oder den Unterschenkel oder aber indirekt infolge extremer Translations- und/oder Rotationsbewegungen wie z.B. einer abrupten Bremsbewegung bei fixiertem Fuß beziehungsweise Unterschenkel zustande. Aufgrund dieses Verletzungsmechanismus kommt ein Schaden am VKB vor allem im Bereich der Kontaktsportarten und des kniebelastenden Sportes wie intensivem Joggen oder alpinem Skisport zustande. Dabei sind neben dem VKB häufig auch andere Weichteilstrukturen (Bänder, Kapsel und Knorpel) verletzt.

Durch die wichtige Funktion des VKB bei der Stabilisierung und Führung des Kniegelenkes ist mit seiner Verletzung eine erhebliche Einschränkung für den Patienten verbunden. Eine konservative Therapie kommt deswegen nur in Frage, wenn klinische Tests keine erhebliche Instabilität des Knies zeigen, der Patient subjektiv keine wesentlichen Einschränkungen hat und von körperlichen Belastungen absehen kann. Dies ist in der Regel nur der Fall, wenn es sich um eine inkomplette Ruptur handelt. Bei einer kompletten Ruptur kommt es dagegen zu einer objektiv messbaren translatorischen und rotatorischen Knieinstabilität, so dass ein operativer Eingriff für das Wohlbefinden des Patienten erforderlich ist. Kombiniert man die Operation mit einer mehrere Monate dauernden frühen und aggressiven Rehabilitation, kommt es zu einer signifikant höheren langfristigen Kniestabilität und einem geringeren Arthroserisiko als nach einer konservativen Therapie (Andersson et al., 1991). Außerdem wird Ausmaß und Zeitpunkt der Entwicklung degenerativer Knorpelveränderungen vermindert bzw. verzögert (Kasperczyk et al., 1991).

Die Kreuzbandersatzplastik ist somit die am häufigsten durchgeführte bandplastische Operation am Bewegungsapparat des Menschen (Weiler et al., 2002c). Mit einer Anzahl von 14000 Operationen in Deutschland pro Jahr hat sie zudem einen großen volkswirtschaftlichen Wert.

Zum Erfolg einer Operation tragen ein geeignetes Transplantat, eine adäquate initiale Verankerung, eine möglichst geringe Invasivität des Eingriffs, die Vermeidung postoperativer Komplikationen, sowie eine gezielte postoperative Rehabilitation bei. Lange Zeit galt das autologe Patellarsehnentransplantat als sogenannter „goldener Standard“ in den meisten

Kliniken. Aufgrund geringerer Entnahmemorbidität und inzwischen verbesserter Verankerungstechnik konnte sich in den letzten Jahren verstärkt das Hamstring-Transplantat durchsetzen und wird heutzutage als primärer Bandersatz verwendet.

Da auch bei diesem Transplantattyp eine gewisse Entnahmemorbidität gegeben ist und autologes Material bei Reverletzungen oder komplexen Knieverletzungen mit multiplen Bandverletzungen oft nicht zur Verfügung steht, musste nach alternativen Möglichkeiten gesucht werden. So wurden vermehrt auch allogene Transplantate verwendet bzw. Studien zu diesen durchgeführt. Neben dem Wegfall der Entnahmemorbidität führen sie zu einer kürzeren Operationsdauer und einem verbesserten kosmetischen Ergebnis. Durch eine kürzere Operations- und Rehabilitationsdauer konnten Kosten reduziert werden (Cole et al., 2005). Limitierende Faktoren der Verwendung von autologen Transplantaten sind die große Nachfrage bei jedoch nur sehr beschränktem Angebot aufgrund begrenztem Spenderaufkommen und hohen rechtlichen Auflagen bezüglich der Organtransplantation in Deutschland.

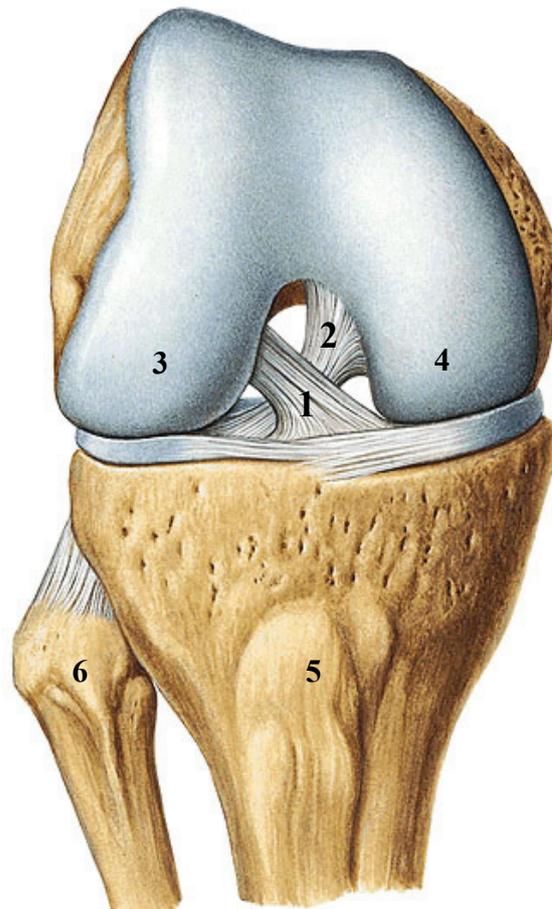
Bisherige Studien zum Vergleich von Auto- und Allografts zum Ersatz des VKB zeigen widersprüchliche Ergebnisse. In den 80er und 90er Jahren zeigten sowohl klinische als auch tierexperimentelle Studien keinen Unterschied zwischen dem klinischen Ausgang und den histologischen Umbauvorgängen bei der Verwendung von allogenen Transplantaten im Vergleich zu autologen (Shino et al., 1984, Arnoczky et al., 1986, Kleipool et al., 1998, Noyes und Barber-Westin, 1996). In den 90er Jahren folgten dann zunehmend Publikationen, die Unterschiede bezüglich der Ligamentisierung, der Revaskularisierung und der Mechanik zeigten (Jackson et al., 1993, Gorschewsky et al., 2002, Shelton et al., 1997, Peterson et al., 2001, Kirkpatrick et al., 1996).

In den genannten Studien wurden fast ausschließlich Patellarsehnen verwendet; diese heilen über die Knochen-Knochen-Heilung schneller als die freien Sehnentransplantate. Außerdem inseriert bei ihnen das Transplantat über die Ausbildung einer direkten Bandinsertion, während freie Sehnentransplantate bei extrakortikaler Verankerung anfänglich über eine indirekte Bandinsertion heilen. Da vergleichende Studien freier Sehnentransplantate fehlen, soll diese Studie die Einheilung eines freien auto- und allogenen Sehnentransplantates mit gelenkferner Endbuttonfixation zum Ersatz des VKB beim Schaf untersuchen.

2. Literaturteil

2.1 Anatomie des intakten Kreuzbandes

2.1.1 Makroskopische Anatomie



Legende

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1 | Vorderes Kreuzband |
| 2 | Hinteres Kreuzband |
| 3 | Lateraler Femurkondylus |
| 4 | Medialer Femurkondylus |
| 5 | Tibia |
| 6 | Fibula |

Abb. 2-1: Schematische Darstellung eines Kniegelenkes vom Menschen (aus Putz, R.; Pabst, R. (1997): Sobotta- Atlas der Anatomie des Menschen)

Das vordere Kreuzband verläuft innerhalb eines fettreichen Bindegewebes zwischen Femur und Tibia. Es entspringt fächerförmig an der posteromedialen Seite des lateralen

Femurkondylus (Odensten und Gillquist, 1985, Peterson et al., 2001, Proffen et al., 2011) und inseriert an der Eminentia intercondylaris der Tibia. Die Insertionsfläche an der Tibia beim Menschen ist längsoval und liegt nahezu im Mittelpunkt des Zentrums des Tibiaplateaus (Odensten und Gillquist, 1985). Beim Schaf wird die tibiale Insertion der anteromedialen und posterolateralen Fasern durch die anteriore Befestigung des lateralen Meniskus geteilt (Proffen et al., 2011). Die Unterscheidung in anteromediale und posterolaterale Fasern kann beim Menschen nur funktionell vorgenommen werden. Dabei entspringen die anteromedialen Fasern im kranialen Abschnitt der femoralen Insertion und werden als Führungsbündel bezeichnet, da sie über einen größeren Bewegungsbereich als die posterolateralen Fasern angespannt sind (Petersen und Tillmann, 2002, Palmer, 1938, Colombet et al., 2006). Die posterolateralen Fasern entspringen femoral kaudal und inserieren im posterolateralen Anteil der tibialen Insertionszone und werden als „Sicherungsfasern“ bezeichnet. Dieses nicht isometrische Verhalten kommt durch eine spiralförmige Rotation umeinander zustande. Das VKB ist also von proximal nach distal in sich nach außen verdreht.

Die Länge des VKB liegt zwischen 31 und 41 mm, der Durchmesser beträgt zwischen 10 und 20 mm (Arnoczky, 1983). Im mittleren Drittel hat das VKB die kleinste Querschnittsfläche (längsoval). Nach femoral und tibial nimmt der Querschnitt zu (Harner et al., 1999). Nach Proffen et al. (2011) unterscheidet sich sowohl die Länge als auch die Dicke des vorderen Kreuzbandes des Schafes nicht signifikant vom Menschen.

Durch die Umhüllung mit einer synovialen Sehnenscheide im vorderen und seitlichen Bereich liegen die Kreuzbänder beim Menschen und beim Schaf trotz ihrer intrakapsulären Lage außerhalb der Gelenkhöhle (Arnoczky, 1983, Dodds und Arnoczky, 1994, Girgis et al., 1975, Seitz et al., 1997).

Blutversorgung

Die Blutgefäßversorgung wurde von Alm und Strömberg (1974) an Hunden und von Seitz et al. (1997) an Schafen untersucht: sie erfolgt proximal über Endäste der A. genus media, die aus der A. poplitea hervorgeht. Distal versorgen die Aa. genus inferiores medialis und lateralis das VKB. Sie bilden proximal und medial ein periligamentäres Netzwerk, welches das VKB umhüllt. Die Gefäße dringen ins Bandinnere ein und richten sich im Bandverlauf aus; ihre Verteilung ist aber nicht homogen. Innerhalb der chondral apophysären Insertionszone und innerhalb der Faserknorpelzone im vorderen Anteil des distalen Banddrittels gibt es avaskuläre Zonen (Petersen und Tillmann, 2002). In diesen Bereichen

erfolgt die Blutversorgung über feinkalibrige Anastomosen mit subkortikalen Gefäßnetzen des Ober- und Unterschenkels. Ferner findet eine Diffusion im Kontaktbereich mit HKB und Hoffaschem Fettkörper statt.

Innervation

Seine sensorischen Eigenschaften erhält das VKB von Nervenfasern aus dem Rete articularis des Nervus tibialis, Nervus perinaeus und Nervus obturatorius (Freiwald et al., 1998).

Wie auch die Gefäße ziehen die Nerven entlang des peri- und endoligamentären Netzwerkes in das Gewebe und verlaufen dort in bindegewebigen Septen. Als Nervenendigungen gibt es Ruffini-Körperchen, Vater-Pacini-Körperchen, Golgi-Sehnenorgane und freie Nervenendigungen (Halata et al., 1999, Schutte et al., 1987).

Das VKB besitzt außerdem Schmerz- und Mechanorezeptoren, wodurch Schmerz- und Propriozeption gesteuert werden (Haus und Halata, 1990, Haus et al., 1992, Wojtys und Huston, 1994). Dabei signalisieren die Mechanorezeptoren, die im Verankerungsbereich an Femur und Tibia und im subsynovialen Bindegewebe liegen, den Spannungszustand und den intrakapsulären Druck und kontrollieren somit die Muskelkontraktion. Aufgrund dieser Tatsache haben Patienten mit VKB-Ruptur deutliche Schwierigkeiten, die Stellung ihres Kniegelenkes wahrzunehmen.

2.1.2 Funktion des VKB

Die Hauptfunktion des VKB ist eine Führung und Stabilisierung der Tibia bei Translationsbewegungen nach anterior bzw. des Femurs nach posterior. Dadurch wird die Tibia gegen eine Verschiebung nach vorne gesichert. Bei Rotationsbewegungen dient es als sekundärer Stabilisator, wobei bei einer Innenrotation eine Wicklung umeinander erfolgt und somit die Verdrehung der Tibia nach innen begrenzt wird. Die primäre Sicherung bei der Rotation erfolgt durch Kollateralbänder und Kapsel (Grüber et al., 1986, Nogalski und Bach, 1993). Da der femorale Ursprung hinter dem Drehzentrum des Kniegelenkes liegt, spannt sich das VKB in Streckung an.

Im Laufe einer Bewegung des Gelenkes ist der Spannungszustand für jedes Bündel ganz individuell. Bei Streckung und Überstreckung sind alle Fasern gespannt. Bei Beugung entspannen sich v.a. die posterolateralen Fasern zunehmend und erreichen ihr Spannungsminimum zwischen 30 und 40°. Bei einem Winkel von 90° spannen sich die anterolateralen Fasern wieder an, während die posterolateralen Fasern völlig entspannt sind.

Somit stabilisiert das anterolaterale Bündel konstant in Beugung und Streckung, während das posterolaterale Bündel nur in Streckung der primäre Stabilisator ist (Sakane et al., 1997, Fuss, 1989).

Weiterhin spielen die Mechanorezeptoren an Femur und Tibia sowie im subsynovialen Bindegewebe eine wichtige Rolle (Fromm und Kummer, 1994, Halata et al., 1999); die Sensoren für die Gelenkstellung steuern den Tonus und die Aktivität der stabilisierenden Muskeln. Somit gibt es eine nervale Rückkopplung zwischen Dehnung des VKB und resultierender Muskelkontraktion, die sowohl Beuger als auch Strecker betrifft (Johansson et al., 1986, Tsuda et al., 2001).

2.1.3 Mikroskopische Anatomie

Mikroskopisch kann das VKB in zelluläre Bestandteile und Extrazellulärmatrix unterteilt werden. Den Hauptteil der Zellen machen Fibroblasten und Fibrozyten aus; sie regulieren den Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix und liegen zwischen den Kollagenfasern. Weitere Zellen sind chondroide Zellen, Gefäßzellen, Leukozyten, Mastzellen, Makrophagen und Plasmazellen (Tackman, 1994, Amiel et al., 1984).

Die Extrazellulärmatrix fungiert als Kittsubstanz und setzt sich aus dem straffen Bindegewebe und der Grundsubstanz zusammen. Das straffe Bindegewebe besteht in seiner Trockensubstanz zu 75% aus kollagenen Fasern; den Rest machen retikuläre und elastische Fasern aus. Dabei besteht der Hauptteil der Kollagenfasern aus Kollagen-Typ-I (ca. 90%), welches vor allem durch seine hohe Zugfestigkeit charakterisiert werden kann. Ca. 10% macht das viskoelastische Typ-III-Kollagen aus; es dient dem Schutz der Blutgefäße und sorgt für die unterschiedliche Rekrutierung der Faserbündel während der Bewegung (Petersen und Tillmann, 1999). An den Insertionszonen ist vermehrt Kollagen II vorhanden. Außerdem enthält hier die Extrazellulärmatrix eine hohe Konzentration an sulfatierten Glycosaminglycanen (Petersen und Tillmann, 2002), die neben den Proteoglycanen die wichtige Eigenschaft haben, viel Wasser binden zu können.

Durch den gewellten Verlauf der Kollagenfasern in Faserrichtung, dem sogenannten „crimp“, wird eine gewisse Dehnung des Gewebes ermöglicht (Clark und Sidles, 1990).

Die Grundsubstanz der Extrazellulärmatrix setzt sich aus Glycosaminglycanen, Proteoglycanen, Glycoproteinen (z.B. Fibronectin) und interstitieller Flüssigkeit zusammen. Sie ermöglichen durch ihre metabolische Funktion den Signalaustausch zwischen der Extrazellulärmatrix und den Zellen über Integrine auf den Zelloberflächen.

Der Gehalt und das Verteilungsmuster der Glycosaminglycane und auch die Zellformen werden von der jeweilige Belastungssituation bestimmt (Gillard et al., 1979, Merrilees und Flint, 1980).

Wegen ihrer räumlichen Anordnung sind die Kreuzbänder sowohl Zug- als auch Druck- und Torsionskräften ausgesetzt (Sidles et al., 1991). So gibt es neben den spindelförmigen Fibrozyten, besonders in den zentralen Bereichen und im distalen Drittel, auch ovale chondroide Zellformen. Sie sind in Reihen angeordnet und von einer ca. 1 µm breiten, perizellulären Matrix umgeben, die Glycosaminglycane beziehungsweise Proteoglycane und nicht-kollagene Glycoproteine enthält (Amiel et al., 1984, Petersen und Tillmann, 1999).

Diese durch mechanische Beanspruchung ausgelöste morphologische Zelltransformation von Fibroblasten in chondroide Zellformen wurde schon 1960 von Pauwels (Pauwels, 1960), einem deutschen Anatom, beschrieben. Sie entsteht, wenn Weichgewebe Druck ausgesetzt ist. Auch Yamakado et al. (2002) kamen in ihrer Studie anhand eines extraartikulären Kaninchenmodells zu der Aussage, dass Druckspannung zur Knorpelzelltransformation führt. Beim VKB liegt die Ursache vermutlich in der mechanischen Beanspruchung auf der Vorderkante der Fossa intercondylaris (Petersen und Tillmann, 1999), so dass eine funktionelle Anpassung an Druck- und Schubbeanspruchung stattfindet. Als weitere Ursache für die chondroide Zelltransformation wird eine verminderte Sauerstoffspannung in den zentralen Bandabschnitten diskutiert (Lyon et al., 1991).

2.2 Insertion von Bändern

Eine sichere und stabile Verbindung von Sehnen beziehungsweise Bändern zu Knochen ist essentiell für die Kraftübertragung von hartem zu weichem Gewebe. Dabei dient die hochdifferenzierte Struktur als Streßabsorber während einer mechanischen Belastung.

Schon Clopton Havers beschrieb 1691 zwei verschiedenen Arten von Bandinsertionen (Weiler et al., 2005). Er erkannte, dass die Sehnen von vielen Muskeln direkt aus dem Periost entspringen und einige von ihnen, die großer Belastung ausgesetzt sind, das Periost durchdringen und direkt im Knochen inserieren.

So kann man grundsätzlich auch heute noch zwei verschiedene Arten der Insertionen von Sehnen und Bändern zu Knochen unterscheiden.

2.2.1 Direkte Bandinsertion

Die direkte Bandinsertion mit dem charakteristischen 4-Zonen-Aufbau wurde zuerst von dem russischen Anatom Dolgo-Saburoff 1929 beschrieben. Er unterschied den „fleischigen“ Ansatz vom „sehnigen“. Der sehnige ist charakterisiert durch eine Veränderung der Sehnenstruktur in Richtung Knochen mit auftretenden Knorpelzellen und dem allmählichen Übergang zur Faserknorpelstruktur, die verkalkt und dann mit dem Knochen verbunden ist (Abb. 2-2).

Zwischen dem Faserknorpel und dem mineralisiertem Knorpel liegt die „blue line“, die der Grenzfläche zwischen hyalinem Gelenkknorpel und subchondralem Knochen ähnelt und als Schockabsorber zwischen Gelenkknorpel und Knochen fungiert (Dolgo-Saburoff, 1929). Durch sie wird der Steifheitsgradient reduziert und damit die Wahrscheinlichkeit von Knorpelverletzungen vermindert. Auch die Schicht aus Knorpelzellen, in die die Kollagenfasern eingebettet sind, reduziert zusätzlich den Steifheitsgradienten und schützt damit vor einwirkenden Scherkräften. Dabei ist die Menge des Knorpels an der Insertion nicht nur mit ihrer Stärke assoziiert, sondern auch mit der Menge des Weichgewebes, das sich während der Bewegung spannt. Eine weitere Erhöhung der Widerstandsfähigkeit vor allem gegenüber Schubkräften kommt durch die Anpassung des lamellären Knochens an die unregelmäßigen Strukturen des Kalkknorpels mit papillenartigen Fortsätzen: sie vergrößern die Kontaktfläche und verzahnen diese beiden Strukturen miteinander (Schneider, 1956).

Das VKB inseriert mit einer direkten Bandinsertion; es ist durch seine komplexe Insertionsstruktur somit besonders widerstandsfähig gegen Zug- und Scherkräfte, die zusammen mit den Schubkräften während einer Kniegelenksbewegung aus unterschiedlichen Winkeln auf den Bandansatz einwirken (Benjamin et al., 1986, Höher et al., 2000, Schneider, 1956).

Dabei durchlaufen die parallel ausgerichteten Kollagenfasern der freien Bandstruktur die Schichten unverkalkten und verkalkten Knorpels und inserieren dann im lamellären Knochen (Becker, 1971, Dolgo-Saburoff, 1929, Kusswetter und Refior, 1985, Raspanti et al., 1996, Schneider, 1956, Senst, 1974).

Somit beginnt das abgestufte Federungssystem am unverkalkten Knorpel, der elastisch den Stoßdruck auffängt und ihn dann gedämpft an die verkalkte Knorpelschicht weitergibt, die als zweiter „schwächerer“ Stoßdämpfer fungiert.

Durch diese graduelle Versteifung werden die einwirkenden Kräfte abgefangen und vermindert (Arnoczky, 1983, Dodds und Arnoczky, 1994, Schneider, 1956). Eine zusätzliche

Funktion haben dabei die Knorpelzellen. Sie arbeiten als „Umlenkrollen“, so dass durch sie die am Bandansatz angreifenden Kräfte auf die gesamte Insertionsfläche verteilt werden (Becker, 1971, Kusswetter und Refior, 1985).

Die Zugfestigkeit wird dabei durch die „Einmauerung“ der Sehnenfasern in die vergrößerte knorpelige Matrise mit langen Einfügungskanälen in den lamellären Knochen erreicht.

Diese Art der direkten Bandinsertion findet man überall dort, wo große Kräfte auf kleine Insertionsflächen übertragen werden und/ oder rechtwinklig einwirkende Zugkräfte sicher auf Knochen übertragen werden müssen (Dolgo-Saburoff, 1929, Schneider, 1956). Beispiele hierfür sind neben dem VKB das HKB, die Patellarsehne an der Tuberositas tibiae und die Supraspinatussehne am Humerus.

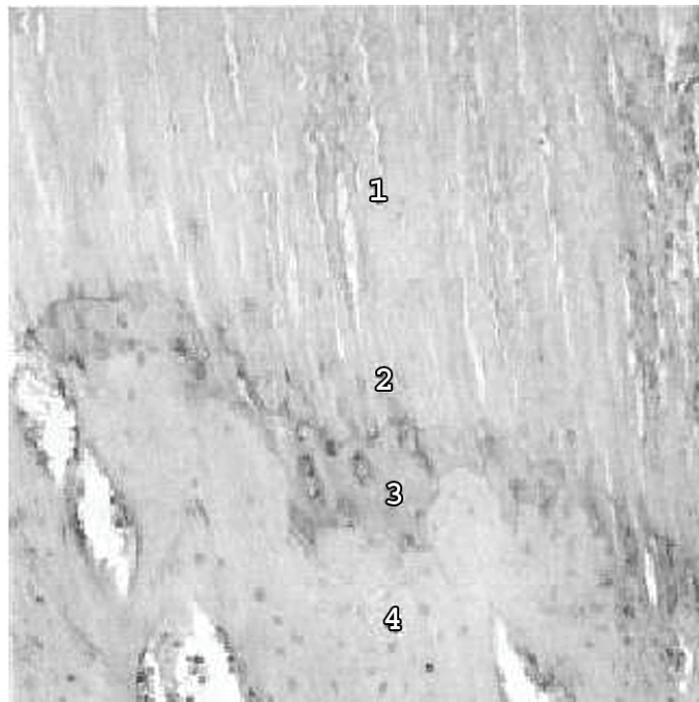


Abb. 2-2: Histologie einer direkten Insertion, Patellarsehne Mensch. 1 – Sehne, 2 – nicht mineralisierter Faserknorpel, 3 – mineralisierter Faserknorpel, 4 – Knochen (Bach et al., 1998)

2.2.2 Indirekte Bandinsertion

Im Gegensatz zur direkten Insertion gibt es eine indirekte Bandinsertion überall dort, wo in eine Richtung wirkende Zugkräfte über große Insertionsflächen auf Knochen übertragen werden. Durch die parallele Kraftübertragung kommt es zu einer gewissen Scherinstabilität und die mechanische Belastbarkeit ist minderwertig (Sheh, 1985, Weiler et al., 2002a,

Martinek und Imhoff, 2002), aber abhängig von der Verankerung. Hierbei setzen die Kollagenfasern der freien Bandstruktur mittelbar über eine bindegewebige Zwischenschicht am Knochen an. Diese Zwischenschicht besteht unter anderem aus bindegewebigen Fasern, den sogenannten Sharpey Fasern (Abb. 2-3), die den Knochen senkrecht zur Längsachse durchdringen (Sharpey, 1856). Sie ist meistens bei kurzen Bändern mit breiter Ansatzfläche zu finden. Beispiel hierfür sind periostale Ansätze flächenhaft am Knochen ansetzender Muskeln (Benjamin et al., 1986), z.B. das distale Innenband des Knies und die tibiale Insertion des medialen Seitenbandes am Knie.

Während bei der direkten Insertion das Periost nicht kontinuierlich ist, durchdringen bei der indirekten die kollagenen Fasern das Periost und strahlen dann in den Knochen ein. Sie fixieren somit das Periost am Knochen und durchdringen den Knochen senkrecht zur Längsachse und reichen oft bis an den Markraum. Aufgrund dieser Eigenschaft wird die indirekte Bandinsertion auch als periostale Insertion bezeichnet (Sharpey, 1856, Cooper und Misol, 1970).

Wenn die indirekte Bandinsertion solide sein soll, ist eine hohe Dichte an Sharpey ähnlichen Fasern essentiell (Rodeo et al., 1993, Rodeo und Izawa, 1999, Goradia et al., 2000, Grana et al., 1994).

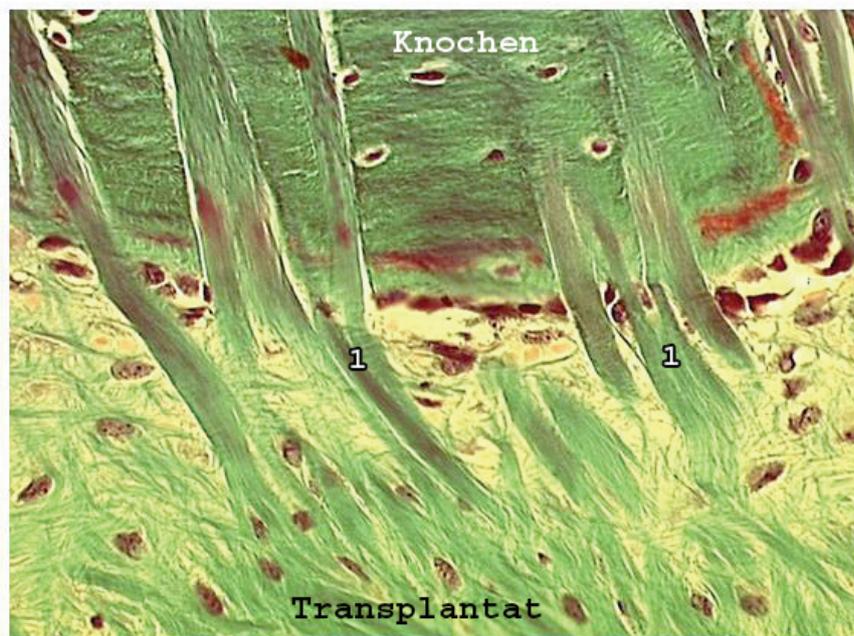


Abb. 2-3: Sharpey Fasern (1) als Hauptmerkmal einer indirekten Bandinsertion reichen vom Bandgewebe bis in den Knochen, MG, 400x (Weiler et al., 2005)

2.3 Grundsätze Sehnenheilung

Für eine normale Bandfunktion nach der Transplantation ist die Schaffung eines Neoligamentes mit normaler Gewebemorphologie und mechanischen Eigenschaften und die Schaffung einer stabilen Knochen-Band-Verbindung essentiell. Man kann somit die Heilungsvorgänge im Transplantat von der Knochen-Band-Heilung unterscheiden.

2.3.1 Heilungsvorgänge im Transplantat

Die Heilungsvorgänge nach Transplantation einer Sehne mit Knochenblock wurden von Bosch und Kasperczyk (1993) anhand des HKB beim Schaf genau beschrieben. Sie unterschieden den Prozeß in 3 Phasen, die fließend ineinander übergehen.

In der ca. 2 Wochen dauernden Nekrose- bzw. Degenerationsphase kommt es unmittelbar postoperativ zur partiellen ischämischen Nekrose und Degeneration des freien transplantierten Gewebes, das funktionell avaskulär ist. Während sich peripher bereits 2 Wochen nach der Operation teils vitales Fasergewebe mit ersten reparativen Prozessen und Einsprossung eines zell- und gefäßreichen Granulationsgewebes bildet, herrscht zentral ein Zell- und Strukturverlust des Gewebes vor.

Auch ultrastrukturelle Zellveränderungen wie Mitochondrienschwellung, Dilatation und Degranulation des endoplasmatischen Retikulums, intrazytoplasmatische Lipideinschlüsse und Desintegration der Kollagenfibrillen weisen auf eine partielle Nekrose und Degeneration hin.

In dieser ersten Phase sind somit die mechanischen Eigenschaften sukzessiv vermindert und die Festigkeit der Plastik hängt unmittelbar postoperativ von der chirurgischen Fixation ab. Die folgende reparativ-proliferative Phase ist durch das Einwachsen von Gefäßen und Zellen charakterisiert, so dass es zu einer nach zentral fortschreitenden Revaskularisation und Repopulation des Transplantates mit Zellen kommt. Der Zell- und Gefäßreichtum geht einher mit dem vermehrten Nachweis von Kollagen-Typ-III und Fibronektin, einer Zunahme des Glycosaminglycangehaltes und der dünnen Kollagenfibrillen und ist verbunden mit der Abnahme des mittleren Kollagenfibrillendurchmessers. Durch den Organisationsverlust der extrazellulären Matrix kommt es zu einer signifikanten Abnahme der mechanischen Eigenschaften. Nach 6 Wochen ist der Knochenblock eingeeilt, so dass die Schwachstelle jetzt im Transplantat selbst liegt.

Bis zur 16. Woche postoperativ schreitet die Revitalisierung bis nach zentral fort. Peripher normalisiert sich die Zellzahl und die neugebildeten Kollagenfasern orientieren sich in Längsrichtung. Zentral ist die Faserstruktur noch wenig geordnet und es kommt weiterhin zu einer Proliferation der Zellen perikapillär, so dass hier noch reparative Prozesse ablaufen. Der mittlere Kollagenfibrillendurchmesser nimmt bis zur 16. Woche um 50 % ab. Bei gleich bleibender Elastizität verbessert sich signifikant die Zugfestigkeit (Bosch und Kasperczyk, 1993).

Die letzte Phase, das sogenannte Remodeling, führt bis zum 6. Monat postoperativ zu einer zunehmend besseren Organisation der extrazellulären Matrix mit weiter zunehmender Längsorientierung der Kollagenfaserbündel; dabei kommt es nur zu einem Angleichen der Sehne an eine bandähnliche Struktur, nicht zur „Ligamentisierung“. Vor allem peripher normalisiert sich der Zellgehalt. Der Nachweis von Kollagen-Typ-III und Fibronectin ist vermindert und es liegt eine Dominanz von dünnen Fibrillen vor.

Während die relative Zugfestigkeit bis 6 Monate nach der Transplantation signifikant zunimmt, ändert sich das Elastizitätsmodul nur unwesentlich.

Obwohl sich die Materialeigenschaften bis 2 Jahre postoperativ weiter verbessern, erreichen die biomechanischen Werte nicht die des normalen HKB, so dass nach Bosch und Kasperczyk (1993) nur von der Bildung eines narbenartiges Ersatzgewebe gesprochen werden kann. Es ist charakterisiert durch den Verlust des faszikulären Aufbaus der Kollagenfasern, den hauptsächlich zentral gelegenen degenerativen Veränderungen mit Desorganisation der Extrazellulärmatrix mit hypo- und azellulären und hypovaskulären Arealen, der Persistenz von dünnen Kollagenfibrillen und dem vermehrten, nicht nur zellassozierten Nachweis von Fibronectin und Kollagen-Typ-III. Dennoch kommt es unter anderem durch den Anstieg des Glycosaminglycangehaltes zu einer gewissen funktionellen Adaptation (Bosch und Kasperczyk, 1993).

Während die peripher dicht zusammenliegenden Kollagenfibrillen mit uniformer Verlaufsrichtung dem Schutz vor Zugkräften dienen, können die zentral liegenden ovalen und chondroiden Zellen mit Hofbildung Druck- und Torsionsbewegungen abfangen.

Eine experimentelle Studie zur Untersuchung der Heilungsvorgänge nach einer VKB-Ruptur nahmen Murray et al. (2000) am Menschen vor. Neben der Einteilung des Heilungsverlaufes in vier Phasen (Revaskularisation, Reparation, Proliferation und Remodeling/ Reifung) stellten sie drei Unterschiede bei der Heilung des Kreuzbandes im Vergleich zu anderen verbindenden Geweben fest: die reparative Phase dauert beim VKB 8-12 Wochen, es wird kein Gewebe gebildet, das die Ruptur überbrücken könnte und an den rupturierten Enden

bildet sich eine synoviale Zellschicht, die α -smooth-muscle-Actin bildet. Durch die fehlende Selbstheilung lässt sich auch erklären, warum eine Ruptur des VKBs bei bestehender Instabilität operativ mit einem Transplantat versorgt werden sollte.

Neben dieser experimentellen Studie von Murray et al. (2000) gibt es auch verschiedene tierexperimentelle Studien, die das Einheilverhalten eines VKB-Transplantates untersucht haben.

So befassten sich Arnoczky et al. (1982) mit der Revaskularisierung in einem Hundemodell. Nach 6 Wochen war das Transplantat bereits komplett von einer Gefäßsynovialschicht umgeben und nach 20 Wochen war die interne Gefäßversorgung abgeschlossen. Ausgang der Revaskularisierung war das infrapatelläre Fettpolster und das posteriore Synovialgewebe.

Untersuchungen zum Remodelingprozeß nahmen Jackson et al. (1996) vor: sie charakterisierten diesen Prozeß durch den Ersatz der dicken Kollagenfibrillen des intraartikulären Teils des Bandgewebes durch dünne. Amiel et al. (1986b) bezeichneten diesen histologischen Umbauprozeß als Ligamentisierung; sie wird ausgelöst durch die veränderte mechanische Belastungssituation und das neue synoviale Milieu. In ihrer Studie übernahm das Patellarsehnentransplantat histologisch und biochemisch die Gestalt des VKB selbst.

Andere Studien zum VKB-Ersatz zeigen, dass das Transplantat nicht zur originalen Stärke zurückkommt; seine Eigenschaften verbessern sich aber bis zu 1 Jahr postoperativ (Jackson et al., 1993, Nikolaou et al., 1986, Rodeo et al., 1993, Shino et al., 1984).

Während eine Transplantatnekrose im knöchernen Teil bei Knochenblock-Sehnentransplantaten häufig beschrieben wurde (Amiel et al., 1986a, Arnoczky et al., 1982, Panni et al., 1997), scheint der intraartikuläre Teil zu überleben und einen Revaskularisierungsprozeß zu durchlaufen. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Verwendung von freien Sehnentransplantaten zwar zu einer langsameren Inkorporation (Papageorgiou et al., 2001, Park et al., 2001, Rodeo et al., 1993, Tomita et al., 2001), es scheint bei ihnen aber keine Nekrose zu geben (Rodeo et al., 1993, Goradia et al., 2000).

2.3.2 Knochen-Band-Heilung

Die Knochen-Band-Heilung wird in verschiedenen Studien beschrieben; aufgrund der unterschiedlichen Variablen wie Tierart, Transplantatwahl, Operationstechnik, Verankerungstechnik und Standzeiten ist ihre Vergleichbarkeit schwierig.

Übereinstimmend beginnt die Einheilung eines Sehnen-Transplantates in den umgebenden Knochen mit der Bildung einer anfangs ungeordneten, zell- und gefäßreichen Bindegewebsschicht zwischen Transplantat und Knochen (Rodeo et al., 1993). Diese sogenannte fibröse Zwischenschicht (FIZ) passt sich dem Durchmesser des stark im Umbau befindlichen Knochens an, so dass ihre Dicke sehr variabel ist (Weiler et al., 2002a). Sie hängt weiterhin ab von der Passform der Sehne in den Knochen, dem Ausmaß der Tunnelaufweitung und der Stärke des Knochenwachstums. Dabei wird bereits nach 4 Tagen eine Entzündungsreaktion mit dem Auftreten von Neutrophilen und Makrophagen im Interface beschrieben. Nach 10 Tagen treten residente Makrophagen auf. Diese Zellen repopulieren das Band und bilden Zytokine, unter anderem TGF- β , die vermutlich zur Bildung von fibrösem Narbengewebe im Interface beitragen (Kawamura et al., 2005).

In dieser ersten Phase kann auch ein intensives Knochenremodeling mit der Bildung von Geflechtknochen bei gleichzeitiger Knochenresorption beobachtet werden. Nach 4 Wochen hat sich entlang des Knochentunnels neuer Knochen gebildet (Rodeo et al., 1993, Goradia et al., 2000). Im Knochen-Band-Zwischenraum kommt es zur erhöhten Produktion von Extrazellulärmatrix und Gefäßen und die Kollagenfasern stellen sich kontinuierlich dar (Rodeo et al., 1993).

Acht Wochen postoperativ hat das Gewebe im Knochen-Band-Zwischenraum einen weiteren Reifungsprozeß durchlaufen. Die spindelförmigen Fibrozyten produzieren dichte Kollagenmatrix und es kommt zum Auftreten von Fasern, die Knochen und Band verbinden (Sharpey like fibers) (Goradia et al., 2000). Diese Sharpey ähnlichen Fasern wurden von Grana et al. (1994) bereits nach 3 Wochen festgestellt und können als erstes Zeichen ossärer Integration gesehen werden, wobei ihre Anzahl im Verlauf der Integration des Transplantates zunimmt. Whiston und Walmsley (1960) erkannten die ersten Sharpey Fasern nach 8 Wochen; sie stellten aber erst nach 12 Wochen eine Verbindung von der Sehne zum Knochen her.

Auch der Knochen durchläuft weiter einen Remodelingprozeß; er wächst bis alle offenen intratrabekulären Zwischenräume geschlossen sind (Rodeo et al., 1993).

Zwölf Wochen nach der Operation kommt es zur weiteren Reifung und Organisation des Knochen-Band-Zwischenraumes: die neugebildeten Kollagenfasern richten sich in Zugrichtung aus und sind kaum mehr vom umgebenden Sehnengewebe abzugrenzen (Rodeo und Izawa, 1999). Während die FIZ schmaler wird, sind die SLF dichter und im gesamten Tunnelverlauf zu beobachten. Ihre Anwesenheit korreliert mit der mechanischen Belastbarkeit der FIZ (Rodeo et al., 1993, Goradia et al., 2000). Der neugebildete Knochen bildet eine

kontinuierliche Linie entlang des gesamten Tunnelverlaufs (Weiler et al., 2005) und ist gut vom Geflechtknochen zu unterscheiden (Goradia et al., 2000).

Bis zur 24. Woche entwickelt sich der Knochentunnel weiter und sklerosiert und die SLF durchdringen den Knochen senkrecht (Weiler et al., 2005).

2.4 Rekonstruktion

2.4.1 Transplantatauswahl

Autologe Transplantate

Als autologe Transplantate werden körpereigene Gewebe bezeichnet, die dem Patienten direkt vor der Operation entnommen werden. Dabei kann zwischen Knochenblock-tragenden und freien Sehnentransplantaten unterschieden werden.

Als Sehne mit 2 Knochenblöcken steht die Patellarsehne zur Verfügung und die Quadrizepssehne kann mit einem Knochenblock transplantiert werden. Die Verwendung von Knochenblöcken hat den Vorteil, dass es zu einer direkten Knochen-Knochen-Heilung kommt und dieser Vorgang wie die Frakturheilung nach 4-6 Wochen abgeschlossen ist (Tomita et al., 2001). Es kommt somit zu einer höheren Steifigkeit und Belastbarkeit direkt nach der Operation als bei der Verwendung von freien Sehnentransplantaten.

Als freie Sehnentransplantate werden die Hamstring-, Tibialis anterior- und posterior-Sehnen verwendet; ihr Vorteil liegt hauptsächlich in der Möglichkeit der guten Anpassung an die anatomischen Gegebenheiten des jeweiligen Patienten und die geringere Entnahmemorbidität. Standardmethode in den meisten Kliniken war bislang die Verwendung des mittleren Drittels der Patellarsehne mit 2 Knochenblöcken und die Verankerung mittels Interferenzschrauben.

Neben den typischen Komplikationen wie der frühen oder späten Patellarfraktur oder der Patellarsehnen-Ruptur (Bonamo et al., 1984, Bonatus und Alexander, 1991, Christen und Jakob, 1992) kann es zusätzlich Störungen des Streckapparates (Rosenberg et al., 1992) geben. Ein weiteres Risiko liegt in einer Fraktur des tibialen Knochenblockes, wobei das Risiko wesentlich von der Knochendichte abhängt.

Weitere mögliche Probleme sind Schmerzen beim Knien, das Patellaspitzensyndrom, Patellatendinitis, patellofemorale Krepitation, die frühzeitige Entwicklung einer patellofemorale Arthrose oder infrapatelläre Kontrakturen (Aglietti et al., 1993, Rosenberg et al., 1992).

Mittlerweile wird in Europa bevorzugt das Hamstringtransplantat als primärer Ersatz des VKBs verwendet; dabei steht sowohl der *M. semitendinosus* als auch der *M. gracilis* zur Verfügung. Hierbei können entweder nur isoliert die Semitendinosussehne, oder, bei entsprechend schmalen Sehnen, auch beide Hamstringsehnen für die Rekonstruktion des VKBs verwendet werden. Nachteile durch die Transplantatentnahme stellen patellofemorale Schmerzen (Corry et al., 1999, Feller et al., 2001), eine reduzierte Beugekraft und eine längerfristige Störung der Innenrotation dar. Während die reduzierte Beugekraft nach 3-4 Monaten wiederkehrt (Feller et al., 2001), tritt eine Störung der Innenrotation nur auf, wenn sowohl die Semitendinosus- als auch die Gracilissehne entnommen werden. Vorteile bei der Verwendung der Hamstringsehnen sind eine geringere Morbidität mit einer besseren Kosmetik und Verankerung und die Möglichkeit der beliebigen Dimensionierung (drei- oder viersträngig).

Vor allem in der Revisionschirurgie wird die Quadricepssehne mit einem Knochenblock als Ersatz gewählt. Hierbei kann es zu patellofemorale Schmerzen durch die gestörte patellofemorale Kinematik kommen und die Quadrizepsmuskulatur kann sich postoperativ verkürzen. Neben Schmerzen an der Entnahmestelle, die eher selten und von kurzer Dauer sind, kann es auch hier zu einer reduzierten Beugekraft kommen.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der Entnahmemorbidität und auch für die Revisionschirurgie wurden alternative Transplantatmöglichkeiten gesucht.

Allogene Transplantate

Als allogene Gewebe werden körperfremde, aber artgleiche Gewebe bezeichnet. Bei ihnen unterscheidet man ebenfalls Knochenblock-tragende von freien Sehnentransplantaten. Weiterhin kann man sterilisierte von nicht-sterilisierten Präparaten unterscheiden. Als sogenannter „Gold-Standard“ werden die nicht-sterilisierten Transplantate bezeichnet, da sie im Vergleich zu den autologen am wenigsten Nachteile aufweisen.

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten, die nicht-sterilisierten Allografts aufzubewahren:

Die „fresh-frozen“ Allografts sind aus Sicht der biomechanischen Stabilität und biologischen Eigenschaften der „Goldene Standard“ der Allografts. Diese werden sofort nach der Entnahme unbehandelt bei -80°C tiefgefroren; so werden antigenwirksame Oberflächenstrukturen der Zellen zerstört (Arnoczky et al., 1986) ohne die mechanischen Eigenschaften negativ zu beeinflussen (Jackson et al., 1991, Nikolaou et al., 1986). Diese Präparate können bis zu 6 Monate aufbewahrt werden.

Die kryokonservierten Transplantate werden in ein kryobeschützendes Medium (Dimethylsulfoxid, Glycerol) verbracht und dann bei kontrollierter Kühlgeschwindigkeit tiefgefroren. Diese Methode zerstört auch die antigenträgenden Zellen und hat keinen Effekt auf die Transplantatstärke, wenn sie langsam über 24 Stunden aufgetaut werden. Auf diesem Weg tiefgefrorene Transplantate können 2 Jahre lang aufbewahrt werden.

Als letztes besteht die Möglichkeit der Gefriertrocknung; die Transplantate werden hierbei während des Einfrierens dehydriert und in ein Vakuum verbracht, so dass sie bei Raumtemperatur aufbewahrt werden können. Nachteil dieser Methode ist der höhere finanzielle Aufwand.

Alle erwähnten Allografttypen haben jedoch den Nachteil, dass eine Kontamination der Sehnen vor Implantation nicht ausgeschlossen werden kann. Daher ist in Deutschland die Sterilisation allogener Transplantate Voraussetzung für eine Transplantation. Sie kann auf chemischem oder physikalischem Weg erfolgen. Versuche durch eine chemische Behandlung mit Ethylenoxid führten zu karzinogenen und mutagenen Folgen; im Transplantat führte sie zu Entzündungs- und Immunreaktionen (Jackson et al., 1990, Roberts et al., 1991). Als physikalisches Verfahren kann eine Behandlung mit γ -Strahlen in verschiedenen Dosen vorgenommen werden. Um aber z.B. HIV sicher abtöten zu können, wird eine Dosis von über 3 Mrad benötigt; diese führte zu schlechten klinischen Ergebnissen durch Synovialdiffusion und Veränderung der Kollagenstruktur, so dass maximal mit 1,5-2,5 Mrad bestrahlt werden darf, um noch vertretbare klinische Ergebnisse zu erzielen (Fideler et al., 1995, Kerboull et al., 1991).

Der Hauptvorteil bei der Verwendung von allogenen Transplantaten ist der Wegfall der Entnahmemorbidität mit seinen möglichen klinischen Folgen. Es ist ein minimal-invasives Vorgehen mit verbessertem kosmetischem Ergebnis möglich und gleichzeitig auch eine Verkürzung der Operationszeit. Eine Reduktion der postoperativen Schmerzen führt zu einer schnelleren Mobilisation des Patienten.

Allgemeine Nachteile von allogem Gewebe sind ein potentiell Infektionsrisiko (z.B. HIV 1: 1.600.000) und eine schlechte Verfügbarkeit (Buck et al., 1989). Sowohl der nationale Gesetzgeber in Deutschland als auch die europäische Richtlinie für den Umgang mit Spendersehnen von Menschen setzen eine Sterilisation voraus oder verlangen, dass entnehmende und implantierende Person identisch sind, welches allein aus zeitlichen und logistischen Gründen meist nicht realisierbar ist. Somit ist der Einsatz allogener Transplantate in Deutschland noch relativ begrenzt.

Existierende Studien kommen beim Vergleich von autologen mit allogenen Transplantaten bezüglich Transplantatremodeling, Inkorporation und strukturellen Transplantateigenschaften zu unterschiedlichen Ergebnissen, wobei nur ältere tierexperimentelle Arbeiten keinen Unterschied zwischen autologen und allogenen Transplantaten feststellen konnten. So ergab eine Studie von Nikolaou et al. (1986) an Hunden bei der Verwendung von cryokonservierten (-80°C) Allografts keinen Unterschied bezüglich der Revaskularisation und der strukturellen und biomechanischen Eigenschaften. Auch Arnoczky et al. (1986) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie verwendeten frisch tiefgefrorene BPTB-Allografts und stellten nach einem Jahr einen normalen Bandeinbau (Entzündung, Revaskularisation, Zellproliferation) fest.

Neuere tierexperimentelle Studien zeigen dagegen vermehrt schlechtere Ergebnisse bei der Verwendung von Allografts im Vergleich zu Autografts.

Jackson et al. (1987) verwendeten gefriergetrocknete (-85°C) BPTB-Allografts bei Ziegen. Neben einer signifikant größeren Laxizität zeigten die allogenen Transplantate eine langsamere Einheilung, schlechtere strukturelle Eigenschaften, eine langsamere Inkorporation und eine verlängerte Entzündungsphase. Es traten allerdings keine mononukleären Zellinfiltrationen auf, die auf eine Immunantwort schließen lassen könnten. Außerdem gab es keine Anzeichen von Infektionen.

Thorson et al. (1989) untersuchten gefrorene Knochen-Band-Allografts an Hunden. Während sie klinisch und radiologisch keinen Unterschied feststellten, kam es auch hier zu vermehrten Entzündungsreaktionen und schlechteren mechanischen Eigenschaften. Auch sie konnten keine Immunreaktionen feststellen.

Eine weitere tierexperimentelle Studie mit Hunden wurde von Shino et al. (1984) durchgeführt. Sie verwendeten frisch-gefrorene (-20°C) allogene Patellarsehnentransplantate, die zwar revaskularisiert wurden, aber die Inkorporation und das Remodeling verliefen langsamer als bei den autologen Transplantaten.

Ähnliches lieferte auch die Studie von Kirkpatrick et al. (1996): sie verwendeten cryokonservierte Allografts an Hunden und stellten fest, dass diese weniger vaskularisiert und repopuliert wurden und schlechtere biomechanische Eigenschaften aufwiesen als die autologen Transplantate.

Zhang et al. (2003) beschrieben den Bereich der Insertion genauer. Sie konnten eine direkte Bandinsertion mit dem klassischen 4-Zonen-Aufbau nur bei den autologen Transplantaten nach 6 Monaten beobachten. Bei den allogenen war die Insertion weniger organisiert.

Um eine schnellere bzw. organisiertere Einheilung von allogenen Transplantaten zu erreichen, wurden von Soon et al. (2007) in einem Kaninchenmodell eine Umhüllung des freien

allogenen Achillessehnen-Transplantates mit mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Sie nahmen am rechten und linken Knie einen Ersatz des VKBs vor und verwendeten im direkten Vergleich ein behandeltes und unbehandeltes Transplantat: dabei zeigten die mit Stammzellen behandelten Transplantate in der histologischen Auswertung bereits nach 8 Wochen eine Knorpel-ähnliche Insertion am Knochen, während die unbehandelten Transplantate über Sharpey Fasern inserierten.

Auch der Vergleich von klinischen Studien unterstreicht die kontroverse Datenlage.

Während Noyes und Barber-Westin (1996) und Kleipool et al. (1998) keinen Unterschied feststellten und allogene Transplantate als gute Alternative darstellten, zeigten die Studien von Petersen et al. (2001), Shelton et al. (1997) und Gorschewsky et al. (2002) eine erhöhte Laxizität im Langzeitverlauf und damit schlechtere mechanische Eigenschaften. Gorschewsky et al. (2002) untersuchten die Transplantate auch histologisch: neben einer verlängerten Phase der Hyperzellularität und -vaskularität mit daraus resultierendem verlängertem Umbau und einer verzögerten Inkorporation kam es zu einer erhöhten Rupturrate. Auch sie verwendeten sterilisierte Transplantate.

Aufgrund der Unterschiede in der Uniformität der Studien bezüglich der Allograft-Behandlung und -Sterilisation, der verschiedenen Transplantatmodelle und verschiedener Standzeiten ist die Vergleichbarkeit schwierig.

Xenogene Transplantate

Der Ersatz des VKB mit xenogenem Material wurde erstmals 1985 durchgeführt (Zichner, 1985). Die frühen Ergebnisse waren sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien (van Steensel et al., 1987) enttäuschend. Neben einer begrenzten Revaskularisation und dem fehlenden Einwachsen von Binde- oder Knorpelgewebe kam es zu einer hohen Rate von Synovitiden.

Neuere Untersuchungen zeigen eine erhebliche Reduktion der Immunogenität durch spezielle Behandlungen (Goldstein, 2000, O'Brien, 1999), so dass mit Zuversicht in die Zukunft gesehen werden kann.

Synthetische Transplantate

Eine weitere Möglichkeit von körperfremden Transplantaten sind synthetische Materialien. Der erste Versuch mit Seidenfäden als Transplantatersatz wurde 1918 von Smith (1918) durchgeführt. Es kam zu einem Transplantatversagen innerhalb der ersten 3 Monate. Weitere Möglichkeiten des synthetischen Bandersatzes sind Gore-Tex, Dacron, Kohlefaser und das Leeds-Keio-Band. Trotz Wegfall der Entnahmemorbidität und einer schnellen hohen Aktivität zeigt sich auch hier frühzeitig eine hohe Versagerquote (Dandy und Gray, 1994, Gillquist und Odensten, 1993, Glousman et al., 1988).

Durch Abrieb dieser Bänder mit folgender Ruptur und außerdem Fremdkörperreaktionen wird diese Art der Transplantate nicht mehr verwendet (Claes et al., 1995, Durselen et al., 1996).

2.4.2 Fixationsmethodik freier Sehnen-Transplantate

Freie Sehnen-Transplantate können grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten fixiert werden. Die gelenknahe oder anatomische Fixation (Abb. 2-4) wird mittels metallener oder biodegradierbarer Interferenzschrauben erreicht. Durch die gelenknahe Verankerung wird die intraartikuläre Transplantatlänge, welche mechanischer Last ausgesetzt wird, verkürzt, wodurch die Konstruktsteifigkeit und Fixationsfestigkeit verbessert werden kann. Es kommt zu einem intensiven Remodeling, welches eine bessere Übertragbarkeit auf die Klinik zuläßt (Rodeo et al., 1993). Bewegungen werden neutralisiert und es kommt zu einer Einheilung auf Gelenkniveau (Höher et al., 1999, Morgan et al., 1995, Weiler et al., 2000).

Vorteil dieser Verankerung ist die beschleunigte Entwicklung einer direkten Neoinsertion auf Gelenkniveau bei initialer Ausbildung einer partiellen FIZ in der Tunneltiefe, welche eine indirekte Verankerung des Transplantates darstellt (Weiler et al., 2002d, Weiler et al., 2000). Außerdem wird ein möglicher synovialer Einstrom verhindert und somit deren möglicher Einfluß auf die Tunnelaufweitung (Rodeo et al., 1993). Nachteile dieses Verankerungsverfahrens sind der verringerte Kontakt des Transplantates mit der umgebenden Tunnelwand aufgrund des Implantates und eine initial begrenzte Neoinsertion sowohl am Tunneleingang als auch in der Tunneltiefe durch die mehrere Jahre andauernde Auflösung des Implantates.

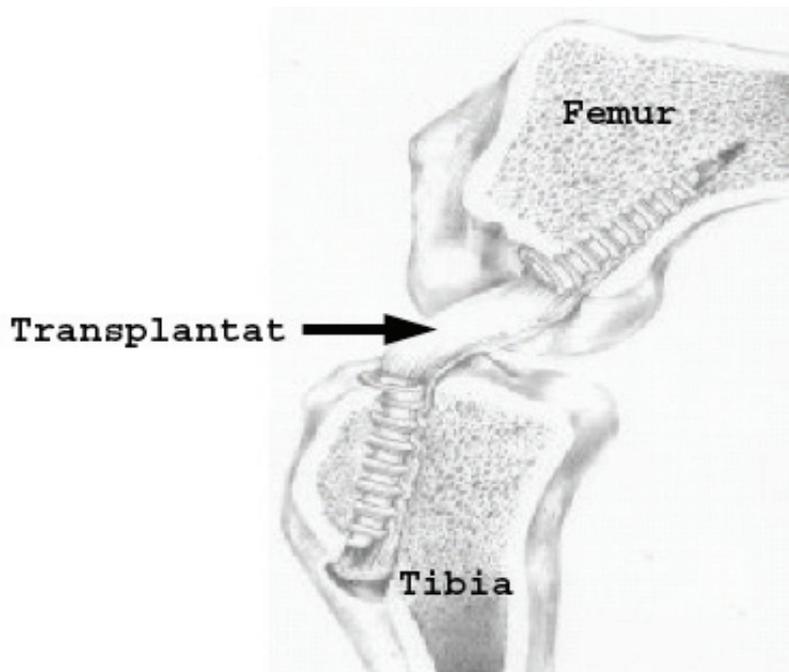


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der anatomischen Fixation eines freien Sehnen-Transplantates mit Interferenzschrauben im Schafsmodell (Weiler et al., 2002b)

Möglichkeiten der gelenkfernen oder extrakortikalen Fixation bestehen in der Verwendung von Endobuttons, Staples oder Fixationsknöpfen. Dabei wird das Transplantat über Verbindungsmaterialien wie z.B. Nahtmaterial am Fixationsmittel befestigt. Durch diese indirekte Art der Fixierung kann es zu Bewegungen des Transplantates innerhalb des Knochentunnels kommen (Höher et al., 1999, Nebelung et al., 1998). Das Transplantat kann sich so über die gesamte Länge des Knochentunnels strecken („bungee-cord-effect“)

(Abb. 2-5) und die hierdurch auftretenden Scherkräfte zwischen Transplantat und Knochen verzögern die Einheilung des Transplantates vor allem am Tunneleingang (Weiler et al., 2000, Weiler et al., 2002a). Außerdem konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass Transplantatbewegungen in anterioposteriorer Richtung, die während einer Kniegelenksbewegung zustande kommen, zu einer trichterförmigen Aufweitung des Knochentunnels am Tunneleingang führen können („windshield-whiper-effect“) (Abb. 2-6) (Höher et al., 1999, Nebelung et al., 1998). Vorteil dieser Verankerungstechnik ist jedoch der völlig ungestörte Kontakt der Sehne mit der gesamten Zirkumferenz des Knochentunnels. Hierdurch wird eine komplette Einheilung, wenn auch zeitlich verzögert, möglich.

Zusammenfassend muss heute festgestellt werden, dass, obwohl Unterschiede im zeitlichen Verlauf der biologischen Einheilung in Abhängigkeit des Verankerungsverfahrens existieren, in klinischen Studien keinerlei Unterschiede bezüglich langfristiger Stabilität, Rerupturen und subjektivem Wohlbefinden zwischen den verschiedenen Verankerungstechniken festgestellt werden konnte.

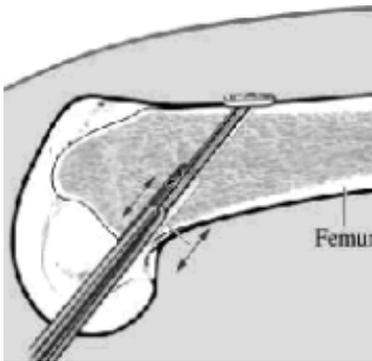


Abb. 2-5: „Bungee-cord-effect“ bei indirekter extrakortikaler Fixation: das Transplantat bewegt sich longitudinal zum Bohrkanal (Weiler et al., 2000)

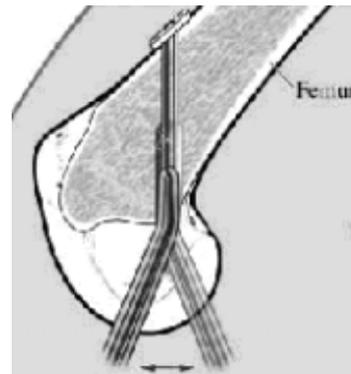


Abb. 2-6: „Windshield-wiper-effect“ bei indirekter extrakortikaler Fixation: es kommt zur trichterförmigen Aufweitung des Tunneleingangs durch transversale Transplantatbewegungen (Weiler et al., 2000)

2.5 Ziel der Untersuchung

Im Fall von komplexen Knieverletzungen, den immer häufiger auftretenden Reverletzungen und Revisionseingriffen und dem Anspruch in kürzestem Zeitraum eine hohe körperliche Belastbarkeit zu erreichen, wird die Verwendung eines allogenen Transplantates zum Ersatz des VKBs immer häufiger in Betracht gezogen. In den Vereinigten Staaten wird zum heutigen Zeitpunkt in 40-60% des primären vorderen Kreuzbandersatzes eine Spendersehne verwendet. In den 80er und 90er Jahren gab es verschiedene klinische und tierexperimentelle Arbeiten, die keinen Unterschied zwischen Allo- und Autograft zeigten. In den 90er Jahren kamen aber zunehmend Publikationen heraus, die Unterschiede bezüglich der verzögerten Ligamentisierung und der Revaskularisierung des Allografts und außerdem eine fragliche Wiederherstellung der mechanischen Eigenschaften beschrieben.

Existierende Studien beschreiben ausnahmslos Untersuchungen am allogenen Knochen-Patellarsehnen-Knochen-Transplantat und es fehlen Studien bezüglich der Sehnen-Knochen-Einheilung eines freien allogenen Sehnen-Transplantates. Untersuchungen an Autotransplantaten haben gezeigt, dass die Einheilung eines freien Sehnen-Transplantates über die Knochen-Band-Heilung langsamer verläuft als die Knochen-Knochen-Einheilung eines Knochen-Sehnen-Transplantates. Untersuchungen für allogene Sehnen-Transplantate am Modell des vorderen Kreuzbandersatzes existieren bis heute nicht.

Zielsetzung dieser Studie ist daher die vergleichende Untersuchung der Sehnen-Knochen-Einheilung eines freien autologen und allogenen Sehnen-Transplantates zum Ersatz des VKBs in einer Langzeitstudie am Schafsmodell. Hierbei werden frisch-gefrorene, nicht sterilisierte, Spendersehnen verwendet, um die biologische Einheilung ohne Einfluss von möglichen chemischen oder physikalischen Faktoren der Sterilisation, beurteilen zu können.

Dabei sollen folgende Hypothesen geprüft werden:

- 1: Die Knochen-Band-Heilung der allogenen Transplantate läuft im Vergleich zu den autologen verzögert ab.
- 2: Auch freie Sehnen-Transplantate können bei extrakortikaler Verankerung über eine direkte Bandinsertion einheilen.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Studiendesign

In die Studie gingen 54 ausgewachsene, d.h. 2-3 Jahre alte, weibliche Merino-Mix-Schafe mit einem mittleren Gewicht von 65,5 kg ein. Im Rahmen einer offenen Arthrotomie wurde ein VKB-Ersatz am linken Knie durchgeführt. Die Tiere wurden in 2 Gruppen (autolog, allogene) mit jeweils 3 Standzeiten (6, 12, 52 Wochen) eingeteilt. 7 Tiere aus jeder Gruppe wurden biomechanisch und danach histologisch ausgewertet; 2 Tiere aus jeder Gruppe wurden nur histologisch ausgewertet, um mögliche Einflüsse der biomechanischen Testung auszuschließen.

Als Transplantat diente die Flexorsehne; sie wurde femoral mittels Fixationsbutton und tibial über eine Knochenbrücke fixiert.

Postoperativ wurden nach standardisierten Protokollen Röntgenaufnahmen angefertigt und in-vivo-Fluoreszenzmarkierungen vorgenommen.

Nach der Tötung folgte die biomechanische Testung für eine weitere Studie und danach die histologische Auswertung.

3.2 Auswahl Tiermodell und Standzeiten

Da die Umbauprozesse bezüglich der Einheilung des VKB durch verschiedene Variablen wie Geschlecht und Alter des Patienten, Transplantatauswahl, Operationstechnik, Rehabilitation und Ausmaß anderer Schäden des Kniegelenks beeinflusst werden, ist ein Tierversuch mit standardisierten Variablen unumgänglich.

Somit wurde die Studie durch die staatliche Tierversuchskommission unter der Tierversuchnummer 60073-02 genehmigt.

Als Tierart wurde das Schaf gewählt. Durch die anatomische Ähnlichkeit seines Kniegelenks zum Kniegelenk des Menschen (Osterhoff et al., 2011) kommt es zu realistischen Belastungssituationen (Radford et al., 1996, Allen et al., 1998). Schafe sind nach einer Kreuzbandoperation nur minimal in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, so dass sie früh belasten. Dies hat einen positiven Effekt auf die Umbauprozesse.

Aufgrund ihrer Größe sind sie dennoch gut handhabbar. Bei kleineren Tieren würde es aufgrund deren Kniedimensionen zu Schwierigkeiten bei der korrekten Tunnelplatzierung kommen.

Somit ist das Schaf besonders in der experimentellen Kreuzbandchirurgie bewährt und es liegen umfassende biomechanische und histologische Daten anderer Arbeitsgruppen vor, auf die zurückgegriffen werden kann (Hunt et al., 2004, Scranton et al., 1998).

Um möglichst keine offenen Wachstumsfugen zu haben, die zu einem Ausbrechen des Tunnels führen könnten, wurden ausgewachsene Schafe mit einem Alter von 2-3 Jahren gewählt.

Bei der Auswahl des Transplantates greift man auf den M. flexor digitalis superficialis zurück, da er chirurgisch leicht zugänglich ist, eine gute Biomechanik zeigt und die Entnahme gut toleriert wird. Der M. semitendinosus und der M. gracilis dagegen sind beim Schaf sehr kurz und eignen sich damit nicht. Auch die Hamstring-Sehnen sind ungeeignet, da sie flächig und faszienähnlich sind.

Die Wahl der Standzeiten von 6, 12 und 52 Wochen dienen der guten Dokumentation der wichtigsten Phasen der Heilungsvorgänge: nach 6 Wochen besitzen die Transplantate durch erhebliche Umbauprozesse ein Minimum an biomechanischen Eigenschaften, so dass es hier die höchsten Versagenszahlen gibt. Während nach 8-12 Wochen die Einheilung bei der Endobutton-Verankerung abgeschlossen ist, kann die Zeit von 52 Wochen herangezogen werden, um mögliche Umbauprozesse einschätzen zu können, die im Bereich des intraartikulären Anteils und im Knochentunnel-Bereich vor allem bei den allogenen Transplantaten -mit längerem Remodelingprozeß- zu beobachten sind (Weiler et al., 2002a, Tomita et al., 2001).

<i>Standzeiten</i>	<i>Autologe Gruppen</i>		<i>Allogene Gruppen</i>		<i>Summe</i>
	<i>Biomechanik und Histologie</i>	<i>Nur Histologie</i>	<i>Biomechanik und Histologie</i>	<i>Nur Histologie</i>	
<i>6 Wochen</i>	<i>n=7</i>	<i>n=2</i>	<i>n=7</i>	<i>n=2</i>	<i>n=18</i>
<i>12 Wochen</i>	<i>n=7</i>	<i>n=2</i>	<i>n=7</i>	<i>n=2</i>	<i>n=18</i>
<i>52 Wochen</i>	<i>n=7</i>	<i>n=2</i>	<i>n=7</i>	<i>n=2</i>	<i>n=18</i>
<i>Summe</i>	<i>n=27</i>		<i>n=27</i>		<i>n=54</i>

Tab. 3-1: Tabellarische Darstellung der Einteilung der in den Versuch aufgenommenen Tiere, postoperativen Standzeiten, Einteilung der Gruppen und Anzahl der Tiere pro Gruppe

3.3 Auswahl der Tiere und Tierhaltung

Alle Tiere wurden bei einem Züchter in Brandenburg gekauft, um gleiche Aufwuchsbedingungen zu haben. Sie wurden in der Quarantäne sorgfältig tierärztlich untersucht; dabei wurde ihr Zahnalter geschätzt (Tiere jünger als 2 und älter als 3 Jahre wurden vom Versuch ausgeschlossen), der Allgemeinzustand beurteilt (nur klinisch unauffällige Tiere wurden in den Versuch aufgenommen) und sie wurden mit Ivermectin (Ivomec®, Merial D, Halbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 1 ml/ 50 kg entwurmt, um einen Parasitenbefall als möglichen Einflußfaktor zu minimieren. Um eine evtl. durch Ultraschall nicht diagnostizierbare Frühträchtigkeit abubrechen, bekamen die Tiere ein Prostaglandin- Analogon (Pronilen, Intervet D GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) injiziert. Weiterhin erhielten sie einen Immunmodulator (Baypamun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), da bei der Einnistung, der Neuzusammenstellung einer Gruppe und der Operation eine erhöhte Infektanfälligkeit möglich ist.

Eine Woche vor der Operation kamen sie in den Stalltrakt des Forschungshauses der Charite im Virchow-Klinikum, um sich dort an die Umgebung zu gewöhnen.

Nach der Operation wurden sie täglich klinisch untersucht und nach ca. 10 Tagen wurden die Fäden gezogen. Ca. 3 Wochen nach der Operation wurden sie in die Lentzeallee (Institut für Grundlagen der Nutztierwissenschaften, Humboldt-Universität Berlin) gebracht, da dort eine Offenstallhaltung mit Weidegang möglich war.



Abb. 3-1: Schafe beim Züchter

3.4 Operation

3.4.1 Operationsvorbereitung

Am Tag der Operation wurde den Tieren eine Braunüle in die V. cephalica antebrachii gelegt. Zur Einleitung erhielten sie 1500 mg Thiopental-Natrium (Trapanal®, Byk Gulden Lomborg Chemische Fabrik GmbH, 78467 Konstanz, Deutschland) intravenös. Nach der Intubation mit Hilfe eines Laryngoskopes nach Foregger wurde ein Tubus (Hi-Lo Lanz, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) von 7,5-8,5 mm Durchmesser (je nach Größe des Tieres) gelegt, nach Überprüfen des richtigen Sitzes mit einem Cuff geblockt und mit Hilfe von Klebeband am Maul fixiert. Es erfolgte die Narkose-Erhaltung mit Hilfe eines Inhalators (Ventilator 711, Siemens- Elema Ab, Solna, Schweden) mit 1,5% Isofluran (Forene®, Abott GmbH, 65011 Wiesbaden, Deutschland), circa 66 % Sauerstoff und circa 33% Lachgas. Während der gesamten Operationsdauer wurde nach Standardbedingungen ein Narkosemonitoring (Anästhesie Sulla 800 V- Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) durchgeführt. Es wurde ein EKG angelegt, der Sauerstoffpartialdruck über ein Pulsoximeter und der CO₂-Partialdruck mittels eines Kapnographen überwacht. Beatmet wurde mit einer Atemfrequenz von 12 Zügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 600-700 ml.

Es folgte das Scheren, Waschen und Desinfizieren mit Desderman (Desdermen N, Schülke & Meyr GmbH, Norderstedt, Deutschland) im Vorbereitungsraum. Zusätzlich wurden die Klauen verbunden, um Kontaminationen im Operationssaal vorzubeugen. Zum Schutz vor Austrocknung der Augen erhielten sie Bepanthen Augensalbe (Bayer Vital, Leverkusen, D).

Ca. 20 Minuten vor dem ersten Eingriff am Knochen erhielten sie als Analgetikum 0,5 mg Fentanyl-dihydrogencitrat (Fentanyl-Janssen®, Janssen GmbH, Neuss, Deutschland). Dabei handelt es sich um einen vollsynthetischen Morphinabkömmling, der eine höhere Potenz und eine kürzere Wirkungsdauer als andere Morphine hat.

Zur Infektionsprophylaxe bekamen die Tiere eine perioperative antibiotische Behandlung mit Amoxicillin-Clavulansäure (Augmentan® 2,2 g, SmithKline Beecham Pharma GmbH, 80804 München, Deutschland) als intravenöse Kurzinfusion (Wirkdauer 8-12h).

Weiterhin erhielten die Tiere 1000 ml einer plasmatisotonen Vollelektrolytlösung (Thomajoenin® Infusionslösung, Delta Select, Pfullingen, Deutschland) zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes

Vorkommende Blutungen wurden mittels monopolarer Elektrokoagulation gestillt.

3.4.2 Transplantatentnahme

Die Operation erfolgte unter sterilen Kautelen. Dazu wurde das Schaf in Rückenlage fixiert und nach Desinfizieren mit Polyvidon-Jod (Braunoderm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Abdecken der linken Hintergliedmaße wurde eine posteromediale Hautinzision über dem linken Sprunggelenk vorgenommen. Die Sehne des M. gastrocnemius wurde stumpf gespalten und die Endsehne des M. flexor digitalis superficialis proximal am Beginn des Muskelbauches und distal kurz über dem Ansatz am Sprunggelenkshöcker entnommen.

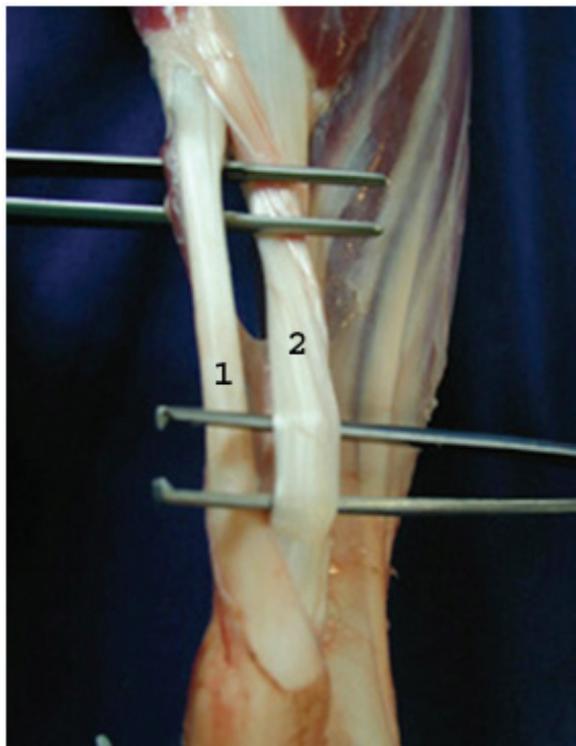


Abb. 3-2: Darstellung der Sehne des M. flexor digitalis superficialis (2), die von der Sehne des M. gastrocnemius (1) umhüllt ist

Diese Sehne wurde entweder für die Verwendung als Autograft in der gleichen Operation vorbereitet oder steril in ein Gefäß gegeben und mindestens 1 Woche bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Nach der Naht der Sehnenscheide mit resorbierbarem Nahtmaterial (1/0 Vicryl®, Ethicon GmbH, Norderstedt) erfolgte die Hautnaht mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (2/0 Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt).

Um den Durchmesser für die Bohrkanäle festzustellen, wurde das entnommene Transplantat vermessen. Die Vorbereitung des Transplantates erfolgte mit eingeflochtenen synthetischen, nicht resorbierbaren Haltefäden (2 Ethibond-Excel® Ethicon GmbH & Co, KG, D-22851 Norderstedt, Deutschland) in Baseball-stitch-Technik (Abb. 3-3 links); die Fäden wurden an beiden Seiten des Transplantates so eingeflochten, dass je 2 gleichlange Fadenenden an den beiden Transplantatseiten hervortraten (Abb. 3-3 rechts). So entstand ein Transplantat von 6-8 cm Länge und einem Durchmesser von ca. 7 mm.

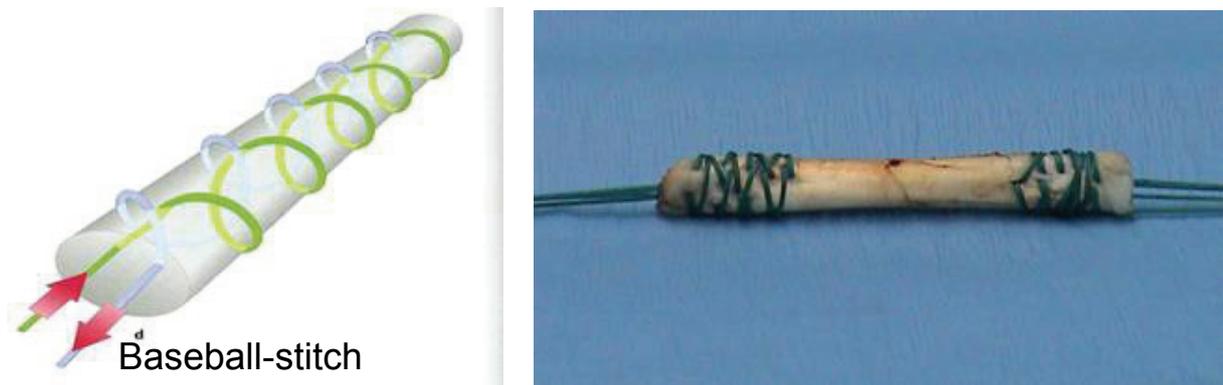


Abb. 3-3: Links: Darstellung der Präparationstechnik (aus Strobel, *Arthroskopische Chirurgie*, Springer Verlag)
Rechts: Transplantat in Baseball-stitch-Technik präpariert

Nach der Prüfung der Ausreißfestigkeit der Fäden wurde das Transplantat in einer mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Mullkompressen feucht gehalten.

Die Allograft-Transplantate wurden am Tag der Implantation bei Raum-Temperatur aufgetaut und dann in gleicher Weise vorbereitet.

3.4.3 Kreuzbandersatz

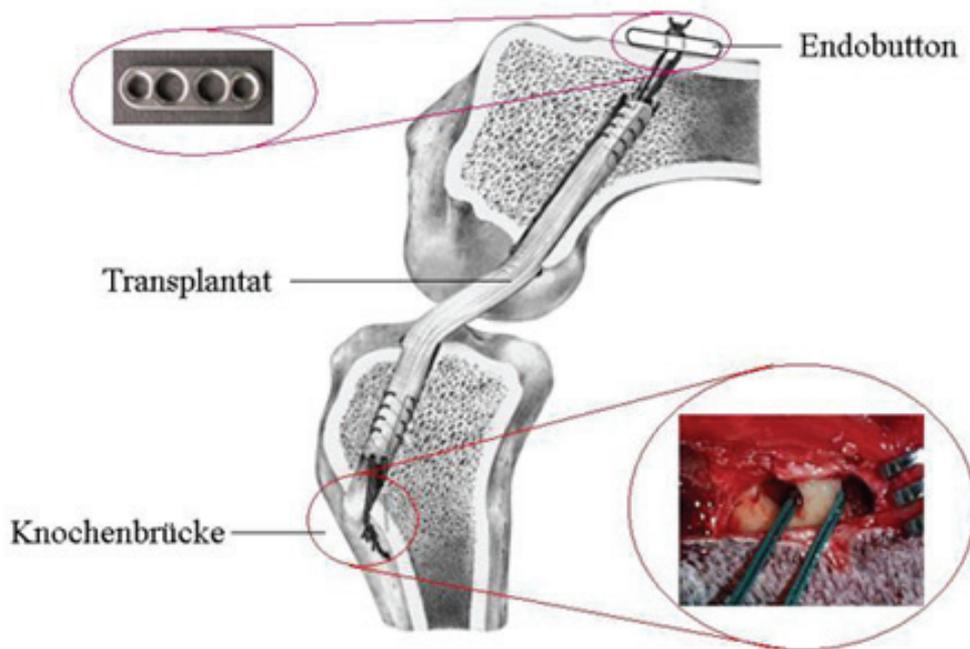


Abb. 3-4: Darstellung der extraartikulären Transplantatfixierung femoral über einen Endobutton und tibial über eine Knochenbrücke (Weiler et al., 2005)

Der eigentliche Eingriff bestand in einer offenen Arthrotomie des linken Kniegelenkes. Nach einem anteromedialen Hautschnitt wurde das Retinaculum patellae durchtrennt, die Patella nach lateral luxiert und der Hoffasche Fettkörper unter Schonung des Ligamentum transversum genus scharf durchtrennt und nach lateral geschlagen.

Als nächstes wurde das VKB mit der Plica synovialis unter Erhalt des Ligamentum transversus genus entfernt und mit einem scharfen Löffel die Insertionsstellen von Bindegewebsresten befreit.

Unter maximaler Beugung wurde femoral an der Fossa intercondylaris in Richtung auf den lateralen Femurkondylus ein Tunnel mit einem Durchmesser von 6-7 mm gebohrt (inside-out-Technik).

Somit verlief der femorale Tunnel vom ehemaligen Ursprung des VKB in der Fossa intercondylaris in Richtung Epicondylus lateralis.

Auch tibial wurde in gebeugter Stellung -ausgehend von der ursprünglichen Ansatzstelle medial der Eminentia intercondylaris- bis durch die Gegenkortikalis medial der Tuberositas tibiae ein Tunnel mit einem Durchmesser zwischen 6 und 8 mm (je nach Transplantatdicke) gebohrt. Nach Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgte tibial das Anlegen der

Knochenbrücke. Dazu wurde 5 mm medial des tibialen Tunnelausgangs ein 4,5 mm großes Loch durch die Kortikalis gebohrt.

Über die Haltefäden und einen Ösendraht wurde das Transplantat von innen nach außen eingezogen, so dass in jedem Knochentunnel mindestens 2 cm Transplantatgewebe vorhanden waren. Femoral erfolgte die Fixation über einen Fixationsbutton (Acuflex®, Smith & Nephew Endoscopy Inc., MA, USA). Unter kräftiger Zugspannung wurde das Gelenk mehrmals durchbewegt. Nach Festziehen Richtung Tibia wurde das Transplantat hier über die Knochenbrücke fixiert. Es folgte erneut mehrmaliges vollständiges Durchbewegen des Gelenkes, um einen sicheren Sitz des Transplantates zu gewährleisten. Nach erneuter gründlicher Spülung erfolgte die Adaptation des Hoffa Körpers und des Retinaculums mit Reposition der Patella.

Das patellofemorale Band wurde zur Vermeidung von postoperativer Patellaluxation mit resorbierbarem Nahtmaterial (1/0 Vicryl®, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) refixiert.

Abschließend folgte das schrittweise Zunähen der Gelenkkapsel und der Muskulatur mit resorbierbarem Nahtmaterial (1/0 Vicryl, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) und anschließend die Hautnaht mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (2/0 Prolene, Ethicon GmbH, Deutschland).

Nach Abdecken der Wunde mit sterilen Kompressen und Anlegen eines Verbandes wurden Röntgenaufnahmen angefertigt, die Tiere in den Stall gebracht und bei selbständig erfolgreicher Atmung extubiert. Einen Tag wurden sie in einer mobilen Einzelbox untergebracht, um eine übermäßige Bewegung und eine Störung durch andere Schafe zu vermeiden. Sie wurden 3 Tage lang mit Flunixin (Finadyne® Injektionslösung 1 %, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) in einer Dosierung von 2,2 mg pro kg KGW als Schmerzmedikation behandelt.

Bis zur Entfernung der Fäden nach 10-14 Tagen erfolgte eine tägliche Visite mit Kontrolle der Körpertemperatur, einer Beurteilung des Lahmheitsgrades sowie ein Verbandswechsel im 2-Tagesabstand. Bei gutem Heilungsverlauf wurde der Verband nach 4-6 Tagen entfernt und die Befunde der Wundheilung und der Ganganalyse in Visitenprotokollen dokumentiert.

Bei guter Belastung und verheilter Wunde wurden die Tiere in die Außenstelle gebracht. Dort wurden aufgrund der fehlenden Abnutzung auf weichem Boden alle 6 Wochen die Klauen geschnitten. Weitere klinische Untersuchungen erfolgten bei den Markierungen mit den Fluoreszenzmarkern und bei den 52-Wochen-Tieren zusätzlich bei den Röntgenverlaufsuntersuchungen.

3.5 Radiologische Untersuchungen

Um die korrekte Positionierung der Bohrkanäle für das Feststellen der richtigen Sägebene beurteilen zu können, wurden postoperativ und post mortem Röntgenaufnahmen angefertigt. Die Tiere der 52-Wochentiere wurden zusätzlich nach 3, 6 und 9 Monaten geröntgt.

Das linke Kniegelenk wurde dabei in 2 Ebenen geröntgt. Die anteroposteriore Aufnahme erfolgte mit 73 kV und einer Belichtungszeit von 5.0 mAs und die laterolaterale Aufnahme mit 63 kV und 3.2 mAs.

3.6 Polychrome Sequenzmarkierung

Um ein Bild über den zeitlichen Verlauf des Knochenbaus zu erhalten, wurde den Tieren nach bestimmten Zeiten verschiedene Fluorochrome injiziert.

Es wurden Calcein-Grün (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Grünwalderweg 30, 82041 Deisenhofen), Xylenol-Orange (Sigma Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen) und Tetrazyklin verwendet.

Calcein-Grün wurde in einer Dosierung von 15 mg/kg verwendet; es wurde 1,5 g Pulver mit 80 ml Aqua dest. vermischt, der pH-Wert gemessen und durch Zugabe von 1 molarem Natriumhydroxid ein physiologischer pH-Wert von 7,2-7,4 erreicht. Aufgefüllt wurde auf 100 ml mit destilliertem Wasser.

Xylenol-Orange benötigt man in einer Dosierung von 90 mg/kg. Dazu wurden 9 g Pulver mit 80 ml Aqua dest. vermischt und durch Zugabe von 1 molarem Natriumhydroxid oder Salzsäure ein pH-Wert von 7,2-7,4 hergestellt. Auch diese Lösung wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Tetrazyklin wird in einer Konzentration von 25 mg/kg verwendet. Hierfür wurden 2,5 g Tetrazyklin-Pulver in 100 ml Aqua ad injectabile aufgelöst.

Da Calcein und Xylenol hitzelabil sind, wurden sie bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Alle Lösungen wurden vor ihrer Verwendung durch einen Sterifilter filtriert; außerdem wurde vor jeder Applikation zur exakten Dosierung das genaue Gewicht des jeweiligen Tieres bestimmt.

Calcein und Xylenol wurden subkutan im Inguinalbereich appliziert. Tetrazyklin musste langsam intravenös injiziert werden.

Zur kontinuierlichen Darstellung des Knochenumbaus mußten die Injektionen zu festgesetzten Zeitpunkten erfolgen.

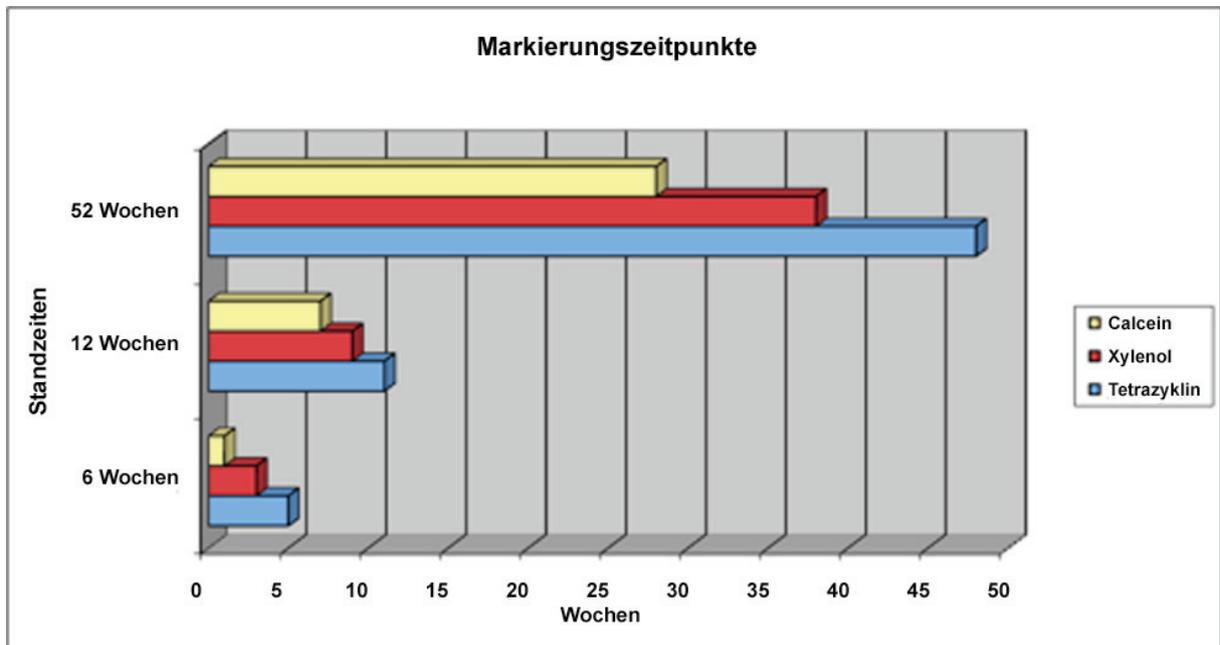


Abb. 3-5: Markierungszeitpunkte der polychromen Sequenzmarkierung

Standzeiten	Markierungszeitpunkte der verschiedenen Fluoreszenzstoffe in Wochen		
	Calcein	Xylenol	Tetrazyklin
52 Wochen	28	38	48
12 Wochen	7	9	11
6 Wochen	1	3	5

Tab. 3-2: Tabellarische Darstellung der Markierungszeitpunkte

3.7 Tötung

Nach der jeweiligen Standzeit von 6, 12 oder 52 Wochen wurden die Tiere mit 1500 mg Thiopental-Natrium (Trapanal®, Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, 78467 Konstanz, Deutschland) in Narkose gelegt und dann mit einer Überdosis (50 ml) Kaliumchlorid (Kaliumchlorid 7,45% Braun®, Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland) getötet. Der Herzstillstand wurde durch Auskultation festgestellt.

Nach Überprüfung der Beweglichkeit und der evtl. vorhandenen pathologisch-anatomischen Veränderungen wurde das linke Kniegelenk im Ganzen entnommen. Außerdem wurde die rechte Flexorsehne und die rechten und linken Leisten-Lymphknoten entnommen. Nach grober Entfernung des Weichteilmantels wurden die postmortalen Röntgenaufnahmen angefertigt und es folgte die biomechanische Testung.

3.8 Biomechanische Testung

Die biomechanische Testung erfolgte durch Frau Insa Gangey für eine weitere Studie. Sie präparierte die entnommenen Kniegelenke zuerst bis auf den Kapsel-Band-Apparat frei. Mit einer sterilen Kanüle entnahm sie Synovialflüssigkeit und fertigte einen Ausstrich an. Dann testete sie die neutrale Rotation und die 90°-Beugung an der Testmaschine (Zwick 1455, Zwick GmbH, Ulm). Es folgten 3 vordere und 3 hintere Schubladentests und zwar zuerst am Gesamtapparat, danach am kombinierten VKB und HKB und zuletzt am isolierten VKB. Nach Bestimmung der cross sectional area führte sie einen Versagenstest durch. Die hier beschriebenen Testungen hatten einen Einfluß auf die histologische Auswertung der vorliegenden Studie.

3.9 Histologie

3.9.1 Präparatfixierung und Sägen der Knochen

Nach der biomechanischen Testung wurde das Transplantat knochennah entfernt und gesondert histologischen Untersuchungen unterzogen

Femur und Tibia wurden ca. 14 Tage in einer gepufferten Fixierlösung aufbewahrt; dies verhinderte Autolyseprozesse und führte durch die Gewebeaushärtung zu einer besseren Eigenschaft beim Sägen.

Fixierlösung

Formol	124 ml
Methylalkohol	540 ml
Barbital-Na-Puffer	130 ml
Glukose	6 g

Am Tag des Sägens wurden die Knochen zuerst ca. 20 Minuten unter fließendem Wasser formalinfrei gewaschen.

Zur Lokalisation der Bohrkanäle wurden die postoperativen Röntgenbilder verwendet und mit ihnen auch der Verlauf bestimmt. Der Fixationsbutton wurde entfernt und danach wurden die Gelenkköpfe so in das Exakt®-Trennschleifensystem Makro (Exakt-Apparatebau GmbH, Norderstedt) eingespannt, dass das Transplantat und der Bohrkanal möglichst im gesamten Verlauf axial getroffen wurden.

In 3 mm Scheiben wurde sich vorsichtig bis zum Sichtbarwerden des Bohrkanals vorangetastet und bei nicht korrekt getroffener Ebene noch einmal korrigiert. Dann wurden 2 mm Knochenscheiben herausgesägt, so dass pro Knochen und Tier 3-4 verwertbare Scheiben entstanden sind. Die Scheiben wurden nach dem Sägen eindeutig markiert. Zum Anfertigen von immunhistologischen Präparaten wurde je 1 Knochenscheibe von Femur und Tibia in EDTA aufbewahrt.

Während des gesamten Sägevorgangs wurde eine Wasserkühlung vorgenommen, um thermischen Schäden vorzubeugen.

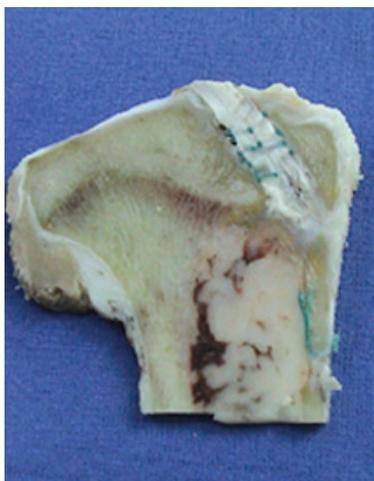


Abb. 3-6: Beispiel einer gesägten Knochenscheibe einer Tibia mit komplettem Transplantat, 6 Wochen allogenen, Schaf 1AL6B, Tibia



Abb. 3-7: Beispiel einer femoralen Knochenscheibe mit teilweise herausgerissenem Transplantat, 6 Wochen allogenen, Schaf 2AL6B, Femur

3.9.2 Entwässerung und Einbettung

Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema:

Ethylalkohol 70%: 3 Tage
Ethylalkohol 80%: 2 x 7 Tage
Ethylalkohol 96%: 2 x 7 Tage
Ethylalkohol 100%: 3 x 7 Tage

Die Verdünnungsstufen wurden aus hundertprozentigem Ethanol durch Zufügen von destilliertem Wasser hergestellt. Um eine gute Durchmischung zu erreichen, wurden die Knochenscheiben in lichtundurchlässigen, luftdicht schließenden Gläsern mit reichlich Alkohollösung bedeckt und auf einen Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gestellt.

Es erfolgte keine Entkalkung der Knochen, damit die Fluorchrome nicht herausgelöst und damit eine bessere Beurteilbarkeit der mineralisierten Strukturen möglich ist.

Nach der Entwässerung erfolgte an diesen unentkalkten Scheiben eine Entfettung in Xylol, eine Präinfiltration und eine zweimalige Infiltration mit Polymethylacrylat (Technovit ® 9100, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim). Die Herstellung und der Gebrauch der Präinfiltration, Infiltration und der Gebrauchslösungen erfolgte nach Herstellerangaben aus den Grundsubstanzen Basislösung, Weichmacher und Aktivator.

Schema der Einbettung

Xylol:	2 x 0,5 h	(4 h)
Präinfiltration:	4 h	(24 h)
Infiltration I:	5 Tage	(7 Tage)
Infiltration II:	5 Tage	(7 Tage)

Die Präinfiltration erfolgte bei Raumtemperatur; die 1. und 2. Infiltration erfolgte jeweils 5 Tage bei 8°C im Kühlschrank (der Kunststoff härtet bei Raumtemperatur aus). Für die eigentliche Einbettung wurden die Präparate mit der anzuschneidenden Seite auf den Boden spezieller Kunststoffförmchen gelegt und möglichst blasenfrei mit der viskösen Infiltration (9 Teile Stammlösung A und 1 Teil Stammlösung B) bedeckt. Zur Auspolymerisation ist eine

Temperatur von 0°C optimal, so dass die Förmchen 24 Stunden in eine Styroporbox mit Eis gelegt wurden.

Durch die Einbettung mit dem Kunststoffpolymer aus Polymethylacrylat ist eine Schnittherstellung ab 2 µm mit einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich.

3.9.3 Anfertigen der Schnitte am Mikrotom

Zur Herstellung der Schnitte wurden die Kunststoffblöcke an der Tischschleifmaschine (Phönix 3000, Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf, Deutschland) rechteckig geschliffen und anschließend mit gelbem Technovit aufgeblockt. Jetzt konnten aus ihnen am Leica® SM 2500 S Hartschnittmikrotom (Leica GmbH, 6140 Bensheim) 6 µm Seriendünnschnitte hergestellt werden. Während des Schneidevorgangs wurden die Blöcke ständig mit Schneideflüssigkeit benetzt. Die einzelnen Schnitte wurden mit einer Pinzette auf Glasobjektträger gebracht und mit einer Streckflüssigkeit bedeckt. Sie bestand aus 7 Teilen 70%igem Alkohol und 3 Teilen Butoxyethyl-Acetat und führt zur Streckung und Entfaltung des Gewebes. Nach Bedeckung mit Klarsichtfolie (Kisol-Folie, Kettenbach, Eschenburg/Eibelshausen) und saugstarkem Filterpapier als Trennung wurden die Schnitte auf einem Stapel mittels Schraubzwingendruck gepresst und für 2 Tage bei 60°C im Brutschrank getrocknet.

3.9.4 Färben der Präparate

Um die Schnitte für Farbstoffe zugänglich zu machen wurde zuerst eine Entplastung in 2-Methoxymethylacetat (MEA, Merck 806061, Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden sie dreimal für eine halbe Stunde in Tauchbäder gestellt.

Für die Rehydrierung wurden die Präparate in eine absteigende Alkoholreihe kurz aber gründlich getaucht und geschwenkt. Nach Abtropfung kamen sie in die nächste Konzentrationsstufe und es konnten die Färbungen durchgeführt werden.

Zur Darstellung der ligamentären, chondroiden und mineralisierten Strukturen im Sehnen-Knochen-Bereich wurden 3 Färbungen durchgeführt: Masson-Goldner-Trichrom, Alcian-Blau und eine kombinierte Safranin-O/ von Kossa-Färbung.

Nach dem Färben wurden die Präparate in Xylol aufbewahrt. Zum Konservieren mußten die Präparate luftdicht verschlossen werden. Dazu wurden sie mittels des Klebstoffes Vitroclud (Einschlußmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland)

möglichst luftblasenfrei mit Deckgläsern versehen und über Nacht in waagerechter Position getrocknet.

Die Masson-Goldner-Trichromfärbung (MG) ist die Standardfärbung für Knochenmorphometrie. Sie führt zu einer guten Anfärbbarkeit der Zellen. Zellkerne stellen sich bräunlich-schwarz gegenüber dem ziegelroten Zytoplasma dar. Erythrozyten färben sich orange-gelb an. Während sich mineralisiertes Knochengewebe leuchtend grün darstellt, ist unverkalktes Knochengewebe hellgrün. Osteoid als nichtverkalkte Knochengrundsubstanz stellt sich rot dar.

Die Alcian-Blau-Färbung (AB) führt zu einer selektiven Färbung von Mukosubstanzen; dabei kann man die leuchtend blauen sauren Mukopolysachharide von den violetten Mukopolysachhariden abgrenzen; somit ist eine gute Darstellung der Kalkknorpelgrenze möglich. Zellkerne werden in dieser Färbung nicht mitangefärbt.

Die Safranin-O/von Kossa-Färbung (SOK) macht eine Unterscheidung zwischen schwarzem mineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe und rotem hyalinen Knorpel und Bindegewebe möglich. Die Mineralisationsfronten stellen sich schwarz granuliert dar.

3.9.5 Schliffherstellung

Die Schriffe wurden nach der von Donath (1988) beschriebenen Technik hergestellt.

Dazu wurden die auspolymerisierten Kunststoffblöcke einseitig so angeschliffen, dass auf einer Seite das gesamte Präparat an der Oberfläche lag. Die andere Seite wurde mit Technovit 4000 bestrichen und mit der Vakuum-Klebevorrichtung (Exakt-Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf einem Kunststoffobjektträger fixiert. Das Vakuum gewährleistete eine planparallele Verbindung zwischen Präparat und Objektträger. Der Kunststoffblock wurde nun an dem Mikroschleifsystem (Exakt-Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) so angeschliffen, dass das gesamte Präparat an der Oberfläche lag. Das aufgeblockte angeschliffene Präparat wurde mit Petrolbenzin gereinigt und nach Auftragen des Präzisionsklebers wurde der zweite Objektträger angeklebt. Die Aushärtung des Klebstoffes erfolgte unter einer Lampe mit ultraviolettem Licht und Vakuum. Dieser sogenannte Sandwich wurde nun an der Exakt-Trennschleifmaschine zersägt. Man erhielt so einen Objektträger mit einem lichtdurchlässig aufgetragenen Präparat.

Abschließend wurden die Präparate mit dem Mikroschleifsystem bis auf eine Dicke von 80-100 µm geschliffen und zuletzt poliert.

3.9.6 Deskriptive Auswertung der Schnittpräparate

Die Auswertung erfolgte über das Digitale Bildanalysesystem Axio Vision; dabei wurden die gefärbten Schnitte mittels Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie und die Schliffe mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Alle Auswertungen wurden mit Hilfe eines Leica DMRB-Mikroskopes (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, 35530 Wetzlar, Deutschland) durchgeführt.

Für die Durchlichtmikroskopie wurden die Dünnschnittpräparate durch 1.6-, 2.5-, 5-, 10- und 20-facher Vergrößerung betrachtet. Die Übersichtsvergrößerung (1.6-fach) wurde für einen Quervergleich herangezogen. Mit den höheren Auflösungen konnten Zellularität und Strukturierung des Gewebes beurteilt werden.

Für die Polarisationsmikroskopie wurden zwei zusätzliche Polarisationsfilter in den Lichtgang geschaltet. Durch diese optische Methode konnten die Sharpey Fasern dargestellt werden.

Die Auswertung erfolgte rein deskriptiv, da das komplexe Geschehen der Knochen-Sehnen-Heilung und des Transplantatumbaues quantitativ nicht darstellbar sind und die Beurteilung der direkten reifen Bandinsertion nicht von der Quantität sondern der Qualität abhängig ist. Für die Beurteilung der Bandinsertion wurde der semiquantitative Score verwendet, der von der Arbeitsgruppe um Unterhauser et al. (2006) entwickelt wurde. Dabei beschreibt der Grad I das erste Auftreten von chondroiden Zellen zwischen Transplantat und Knochen (Abb. 3-8), der Grad II das Entstehen von Mineralisationsfronten um chondroide Zellen (Abb. 3-9) und verläuft über den Grad III mit dem ersten Auftreten einer vierzonigen Verbindung zwischen Transplantat und Knochen (Abb. 3-10) und endet im Grad IV als reife direkte Bandinsertion (Abb. 3-11).

<i>Klassifikation</i>	<i>Beschreibung</i>
<i>Grad 0</i>	<i>keine Anzeichen einer direkten Bandinsertion</i>
<i>Grad I</i>	<i>frühe direkte Bandinsertion, vereinzelt unverkalkte chondroide Zellen</i>
<i>Grad II</i>	<i>frühe direkte Bandinsertion, chondroide Zellen zum Teil mit Mineralisationssaum</i>
<i>Grad III</i>	<i>reifende direkte Bandinsertion mit teilweise Vierzonenaufbau aus Knochen, Kalkknorpel, Faserknorpel und Band</i>
<i>Grad IV</i>	<i>reife direkte Bandinsertion mit Vierzonenaufbau</i>

Tab. 3-3: Modifizierter Score zur Beurteilung einer entstehenden direkten Bandinsertion (Unterhauser et al., 2006)

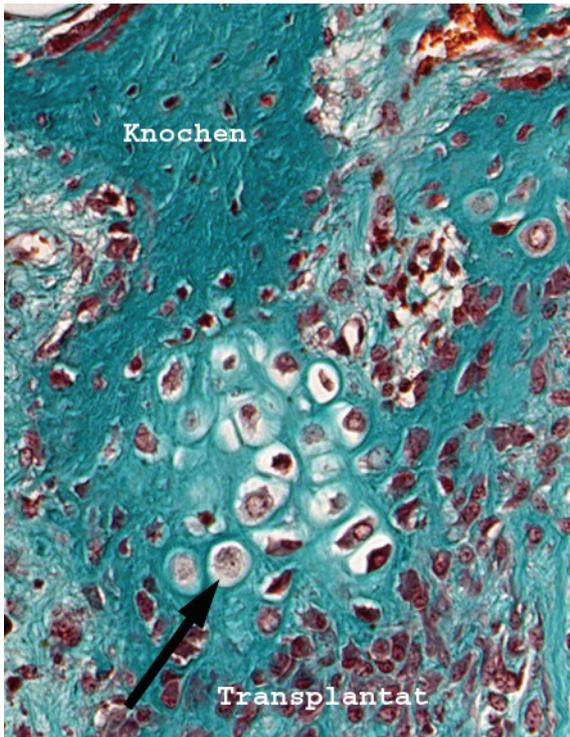


Abb. 3-8: Beispiel für den Grad I der direkten Bandinsertion mit vereinzelt unverkalkten Knorpelzellen (Pfeil), 6 Wochen autolog, Schaf 6AU6B, Femur, MG, 200x

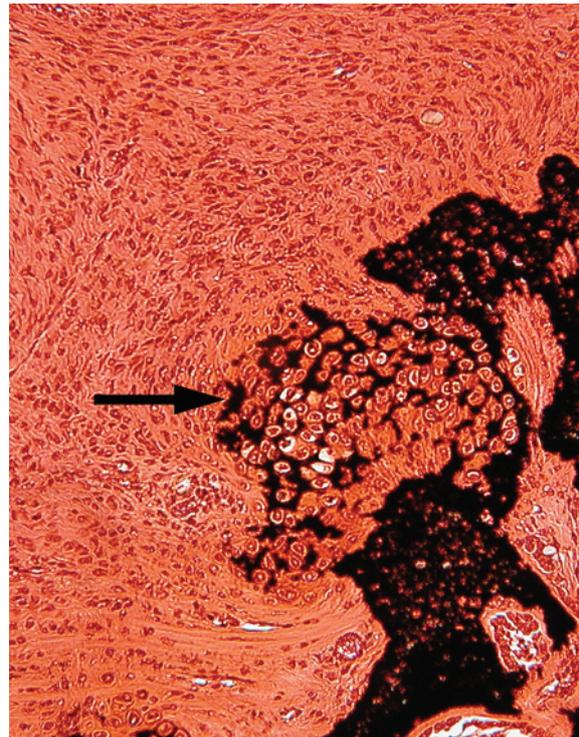


Abb. 3-9: Beispiel für den Grad II der direkten Bandinsertion und dem Auftreten von Knorpelzellen mit deutlichem Mineralisationsaum (Pfeil), 6 Wochen autolog, Schaf 8AU6H, Tibia, SOK, 100x

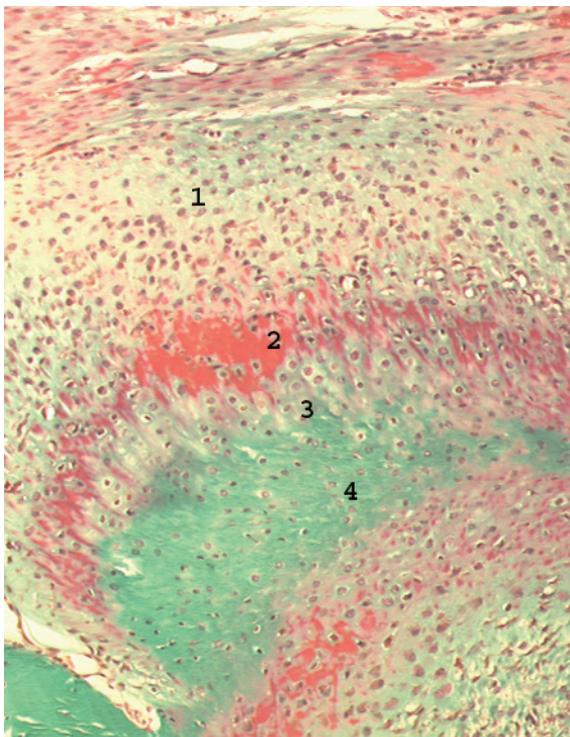


Abb. 3-10: Grad III einer direkten Bandinsertion (1-Band, 2-Faserknorpel, 3- Kalkknorpel, 4-Knochen), 12 Wochen allogene, Schaf 3AL12B, Tibia, MG, 100x

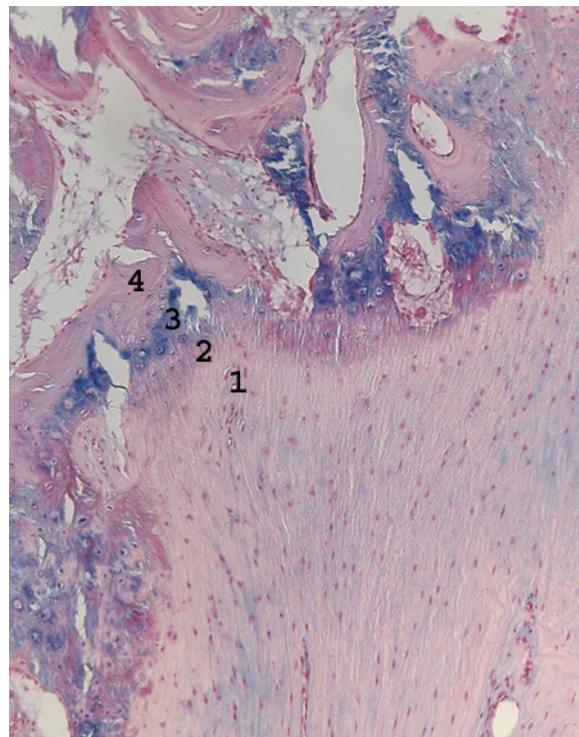


Abb. 3-11: Eine reife direkte Bandinsertion Grad IV im Bereich des Tunnelbodens in der Alcian-Blau-Färbung, 52 Wochen allogene, Schaf 6AL52B, Femur, AB, 100x

3.9.7 Auswertung der Schliffe

Fluoreszenz ist die Eigenschaft von Stoffen zu leuchten, wenn sie durch kurzwelliges Licht angeregt werden. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und setzen beim Zurückfallen Energie in Form von sichtbarem langwelligem Licht frei.

Neben der Eigenfluoreszenz einiger Gewebe z.B. Knochen, können von außen Substanzen ins Gewebe eingebracht werden, sogenannte Fluorochrome. Diese können durch spezifische Wellenlängen zum Leuchten angeregt werden und geben dann ein Licht ebenso charakteristischer Wellenlänge ab. Durch entsprechende Filter werden Strahlen aus dem Lichtgang gefiltert; diese regen die verwendeten Fluorochrome zur Emeritierung eines charakteristischen farbigen Lichtes an. Folgende Fluorochrome führen zu folgenden sichtbar werdenden Farben.

Calcein-Grün	grün
Xylenol-Orange	rot
Tetrazyklin	gelb

Die Auswahl der Fluorochrome folgt nach mehreren Kriterien. Zuerst müssen sie eine besondere Affinität zum mineralisierten Knochen haben, so dass Momentaufnahmen möglich sind, ohne dass sie einen Einfluß auf den Knochenmetabolismus haben. Außerdem müssen sie die gleichen Stadien der Knochenneubildung markieren. Klinisch wichtig ist, dass sie gut verträglich sind und die verabreichte Dosis darf nicht toxisch sein.

Die Befundung und Dokumentation erfolgte mittels des digitalen Bildanalyse systems (KS 400 Imaging System Release 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland).

Die Einspeisung der 16-fach vergrößerten Einzelbilder ins digitale Bildanalyse system erfolgte über eine Videokamera. Mittels eines gekoppelten motorisierten XY-Tisches (MCX-2eco, TK Dr. Kassen GmbH, Lahnau) konnten für jedes Fluorchrom nicht-überlappende digitalisierte Übersichtsaufnahmen der Knochenschliffpräparate erstellt werden. Ein Programm verrechnete die Einzeldarstellungen zu Kombinationsbildern. So kam es zu einer gleichzeitigen Befundung des Anlagerungsverhaltens aller drei verwendeten Fluoreszenzmarker.

Es wurden Lokalisation, Struktur und Intensität der Fluoreszenzsignale beschrieben und bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeines

4.1.1 Komplikationen

Insgesamt wurden 59 Tiere für diesen Versuch operiert; davon gingen 54 Tiere in den Versuch ein. Ein Tier verstarb postoperativ durch Kreislaufversagen infolge eines Lungenödems. Ein weiteres verstarb bei guter Belastung in der 8. Woche nach der Operation ohne äußerlich erkennbare Anzeichen. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wurde ein massiver Leberegelbefall und eine Salmonellose festgestellt. Ein Tier aus der autologen Gruppe bekam eine Wundinfektion mit prallem Erguß. Das Ziehen der Fäden nach 14 Tagen führte zur Eröffnung der Wunde. Trotz perioperativer prophylaktischer Antibiose und intensiver Therapieversuche war es zu einer Gelenkinfektion gekommen, die die Euthanasie zur Folge hatte. Ein weiteres Tier musste eingeschläfert werden, weil es ohne äußerlich erkennbare Anzeichen das operierte Bein immer schlechter belastete. Die pathologisch-anatomische Untersuchung war unauffällig. Bei den Schafen mit allogenen Präparat musste ein Schaf wegen einer ausgeprägten Arthrofibrose euthanasiert werden. In der Obduktion zeigte sich, dass kein Transplantat mehr vorhanden war, so dass es vermutlich zu einer Abstoßungsreaktion gekommen war.

In allen 6 Gruppen wurden je 2 Tiere aufgrund von unterschiedlichen Fehlern in der Probenaufbereitung (Sägeebene nicht exakt getroffen, Tunnelein- bzw. -ausgang nicht differenzierbar,...) bzw. verursachten Schäden durch die vorangegangene biomechanische Testung ausgeschlossen, so dass 7 Tiere pro Gruppe in die Auswertung eingingen.

4.1.2 Ganganalyse

Die Beurteilung des Lahmheitsgrades erfolgte bis zum Fädenziehen täglich, danach bei den Röntgenterminen, zu den jeweiligen Markierungszeitpunkten und unmittelbar vor der Tötung. Unmittelbar nach der Operation zeigten 46 Tiere eine leichte Belastung des operierten Beines. Im Durchschnitt zeigten die Schafe 7 Tage nach der Operation eine gute Belastung des Beines. Zum Zeitpunkt der Tötung belasteten alle 54 Tiere komplett das operierte Bein.

4.2 Makroskopische Auswertung

Bei fast allen Tieren war das Operationsgebiet gut verheilt, trocken und reizfrei. Nur bei 2 Tieren der autologen 6-Wochen-Gruppe waren Fistelgänge darstellbar, die unter der Haut begannen und kurz vor der Gelenkkapsel endeten.

Die Beweglichkeit war bei leichter Einschränkung der Flexion bei allen normal, obwohl bei einem Tier der autologen 12-Wochen-Gruppe eine Arthrofibrose vorlag, die sich aber klinisch nicht äußerte.

Bei einem weiteren Tier dieser Gruppe lag ein Erguß vor; hier war die Synovia blutig und in erhöhter Menge vorhanden. Auch bei je einem Tier der autologen und allogenen 6-Wochen-Gruppe war die Synovia blutig. Bei allen anderen Tieren war sie klar bis bernsteinfarben. Eine erhöhte Synoviamenge kam bei den 6- und 12-Wochen-Tieren mit autologem Bandersatz vor.

Das Transplantat war bei allen Tieren von einem synovialen Überzug umgeben; bei allen 6-Wochen-Tieren war sowohl die Synovialis als auch das Transplantat mit deutlicher Gefäßinjektion gezeichnet. Auch bei den allogenen 12-Wochen-Tieren waren Gefäße deutlich sichtbar, während sie bei den autologen 12-Wochen-Tieren nur noch in geringem Maß vorhanden waren. Bei den 52-Wochen-Tieren waren keine Zeichen von Entzündungsreaktionen mehr zu sehen.

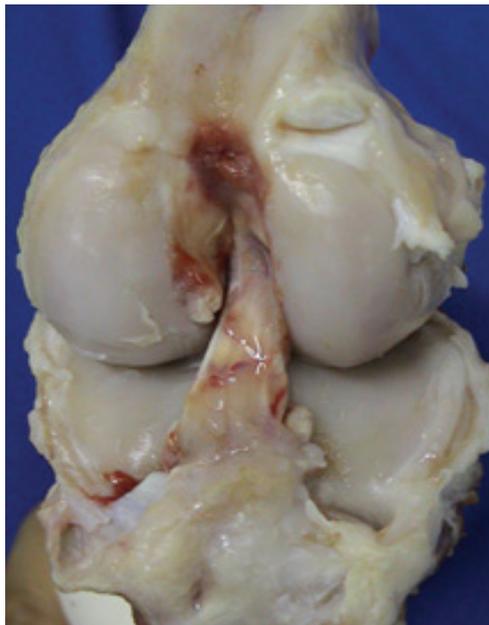


Abb. 4-1: Ein mit Gefäßen durchzogener Synovialschlauch umgibt das Transplantat, 6 Wochen allogene, Schaf 3AL6B



Abb. 4-2: Deutlich weniger Entzündungsreaktionen bei einem autologen 12-Wochen-Tier, Schaf 2AU12B

4.3 Histologische Auswertung

4.3.1 Ergebnisse der 6-Wochen-Gruppe

4.3.1.1 Knochen-Band-Heilung

Aufgrund des Versagensmechanismus nach 6 Wochen in beiden Studiengruppen durch zentrales Herausziehen des Transplantates aus den ossären Tunneln konnte eine deskriptive Auswertung lediglich anhand der Tiere erfolgen, die nicht einer biomechanischen Testung unterzogen wurden bzw. zum Teil an den biomechanisch getesteten Tieren, bei denen ein Großteil des Transplantates im Tunnel verblieben war.

Autologe Präparate

Bei den autologen 6-Wochen-Tieren lag das Transplantat tibial in großen Teilen direkt der Tunnelwand an. Femoral waren die Transplantate, die biomechanisch getestet wurden, zum großen Teil (3/4) ausgerissen, so dass nur Reste oder gar kein Transplantatgewebe mehr vorhanden waren. Zur Überbrückung des Zwischenraumes zwischen Transplantat und Knochen zeigte sich die bindegewebige, fibröse Zwischenschicht (FIZ) sowohl tibial als auch femoral breit und ungeordnet. Erste Anzeichen einer indirekten Bandinsertion gab es tibial vor allem im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens mit vielen gerichteten Sharpey Fasern. Im Bereich des Tunneleingangs kamen sie nur vereinzelt und ungerichtet vor. Auch femoral waren sie nur vereinzelt am Tunnelein- und -ausgang zu sehen.

Während an der anterioren Zugseite der Tibia teilweise (5/7) schon chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) vorkamen, gab es an der posterioren Druckseite nur vereinzelt (2/7) chondroide Zellen ohne Verkalkung (Grad I). In der Tunnelmitte und am Tunnelboden gab es tibial keine weiteren Anzeichen einer direkten Bandinsertion.

Dementsprechend hatten sich Mineralisationsfronten -vom Tunneleingang beginnend- um die chondroiden Zellen herum gebildet. In Richtung Tunnelmitte und Tunnelboden nahm ihr Vorkommen ab. Vereinzelt gab es sie auch an vom Geflechtknochen ins Transplantat hineinreichenden Vorsprüngen.

Bei den femoralen Präparaten gab es nur in einem Präparat im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens chondroide Zellen mit schmalen Mineralisationssaum (Grad I-II) als erstes Anzeichen einer direkten Bandinsertion; vom Knochen ausgehende Mineralisationsfronten gab es femoral nur am Tunnelboden.

Zu einem degloving, d.h. einem Herausgleiten des Transplantates durch ungenügenden Einbau in den Knochentunnel, kam es in je zwei Präparaten der femoralen und tibialen Seite.

Allogene Transplanate

In den beiden Tieren, die keiner biomechanischen Testung unterzogen wurden, konnte auch das Transplantat im Tunnel histologisch untersucht werden. Bei den ausstehenden 5 Tieren der biomechanischen Testung kam es zu einem Versagen des Transplantates durch das zentrale Herausziehen der zentralen Transplantatanteile (degloving). Hierbei verblieb jedoch die periphere Transplantatschicht am umgebenden Knochentunnel, so dass eine entsprechende Beurteilung der Knochen-Band-Heilung möglich war.

Sowohl tibial als auch femoral fand sich eine breite hyperzelluläre FIZ. Sharpey Fasern traten tibial nur vereinzelt auf und waren nur an der Zugseite gerichtet; femoral lagen nur vereinzelt Sharpey Fasern am Tunnelboden vor. Eine direkte Bandinsertion gab es bei den tibialen Präparaten an der Zugseite des Tunneleingangs in Form von chondroiden Zellen mit Mineralisationssaum (3/7) oder nur chondroiden Zellen (3/7). Die Druckseite zeigte in nur einem Präparat chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II); in 3 Präparaten gab es vereinzelt chondroide Zellen und in den anderen beiden Präparaten gab es keinerlei Anzeichen einer direkten Bandinsertion. In nur einem Präparat zeigten sich im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens chondroide Zellen (Grad I) als mögliches Anzeichen einer direkten Bandinsertion; in einem Präparat zeigten sich chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) am Tunnelboden. Bei den femoralen Präparaten konnte nur in einem Fall eine direkte Bandinsertion in Form von chondroiden Zellen mit Mineralisationssaum (Grad I-II) gesehen werden und zwar im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens.

Dementsprechend gab es sowohl tibial als auch femoral nur beginnende Mineralisationsfronten im Bereich des Tunnelbodens.

Vergleich autologe vs. allogene Knochen-Band-Heilung

Sowohl bezüglich der indirekten Bandinsertion in Form von einer großen Anzahl an gerichteten Sharpey Fasern als auch den ersten Anzeichen der direkten Bandinsertion in Form von chondroiden Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) sind die autologen den allogenen Transplantaten in ihrer Entwicklung voraus. Auch hinsichtlich der Ausbildung der Mineralisationsfronten zeigen die autologen Transplantate ein fortgeschritteneres Stadium.

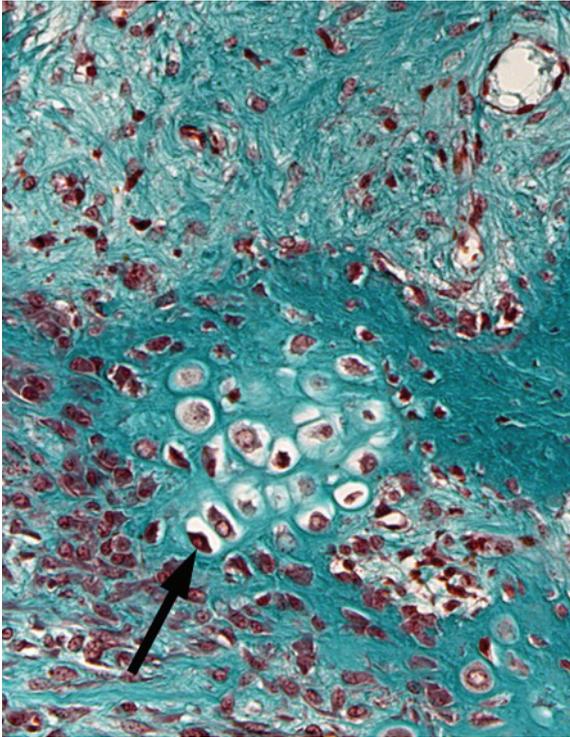


Abb. 4-3: Vereinzelte chondroide Zellen (Pfeil) im Bereich des Tunnelbodens zeigen den Grad I der direkten Bandinsertion, 6 Wochen autolog, Schaf 6AU6B, Femur, MG, 200x

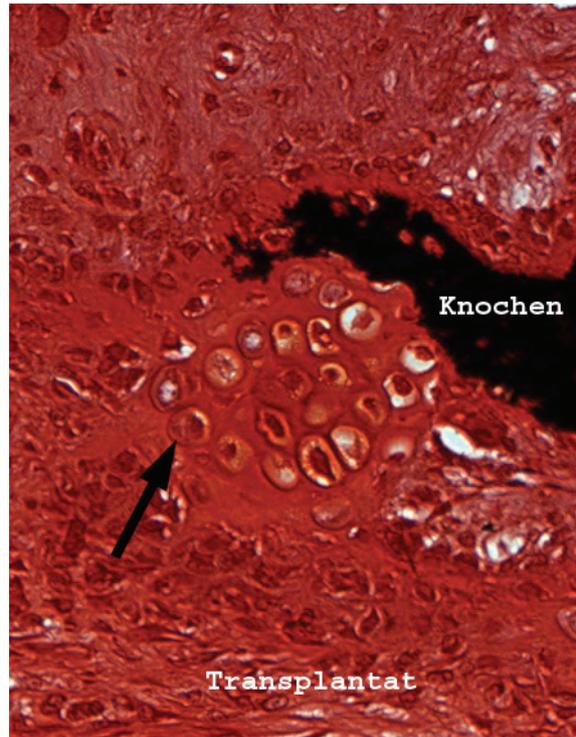


Abb. 4-4: Korrespondierender Bildausschnitt in der Safranin-O-von-Kossa-Färbung bestätigt das Vorkommen von unverkalkten Knorpelzellen (Pfeil), 6 Wochen autolog, Schaf 6AU6B, Femur, SOK, 200x

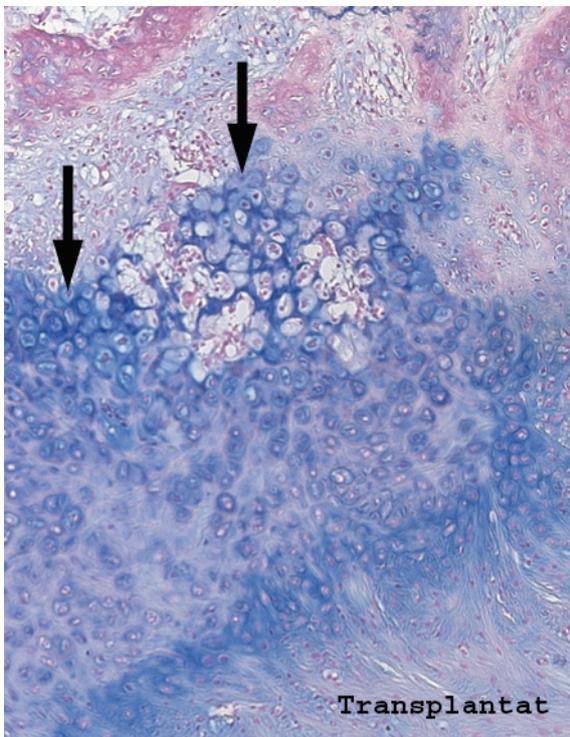


Abb. 4-5: Darstellung des Grad II der direkten Bandinsertion in der Alcian-Blau-Färbung mit von Kalksäumen umgebenden Knorpelzellen (Pfeile) im Tunneleingangsbereich, 6 Wochen allogene, Schaf 7AL6B, Tibia, AB, 100x

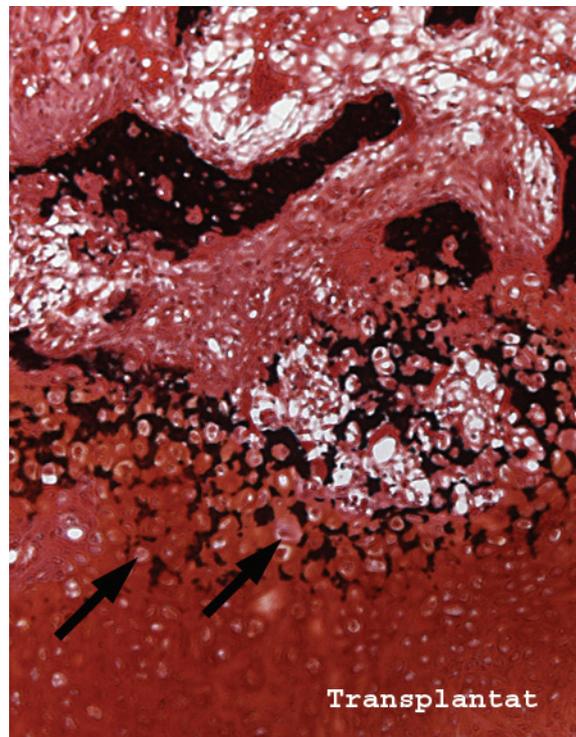


Abb. 4-6: Auch in der Safranin-O-von-Kossa-Färbung zeigt das Vorkommen von Knorpelzellen mit Mineralisationssaum (Pfeile) den Grad II einer direkten Bandinsertion, 6 Wochen allogene, Schaf 7AL6B, Tibia, SOK, 100x

4.3.1.2 Transplantat

Autologe Transplantate

In der Gruppe der 6-Wochen-Autografts entsprach das Transplantatgewebe tibial histologisch zum großen Teil noch dem alten Bandgewebe der Flexor digitalis superficialis-Sehne. Vom Tunneleingang und von der Mitte beginnend herrschte Nekrose vor, nur Rundzellen phagozytierten avitales Sehngewebe. Neben diesen Rundzellen herrschten lymphozytäre Zellen und Fibroblasten vor und das Gewebe zeigte eine Vielzahl an von der Peripherie her einsprossenden Gefäßen. Die gesamte Struktur schien in der Orientierung der Zellen in Zugrichtung deutlich aufgelockert im Vergleich zu einer nativen Flexorsehne.

Analoge Beobachtungen konnten femoral bezüglich Zell- und Gefäßeinsprossung beobachtet werden, wobei das Ausmaß der Umbauprozesse deutlich geringer erschien.

Allogene Transplantate

In der Gruppe der Allografts gab es tibial in 3 Präparaten nur noch Transplantatreste, so dass das Gewebe nicht ausreichend beurteilt werden konnte. In den übrigen Präparaten gab es im Eingangsbereich als erste Anzeichen von möglichen Umbauprozessen eine Hyperzellularität von Fibroblasten, während in den peripheren Bereichen Rundzellinfiltrate vorherrschten. In den femoralen Präparaten, die vorher biomechanisch getestet wurden, lag kein Transplantat mehr vor. Bei den Tieren, die nur für die histologische Auswertung operiert wurden, lag im zentralen Bereich noch altes Bandgewebe mit Nekrose vor.

Vergleich autologe vs. allogene Transplantate

Vergleichend zeigte sich deskriptiv eine deutliche vermehrte zelluläre Aktivität mit einer ausgeprägteren Gefäßeinsprossung in den autologen Rekonstruktionen. Zusätzlich war das Ausmaß der zentralen Bandanteile, die noch ursprüngliches Transplantatgewebe darstellten und somit nicht am Remodelingprozess beteiligt waren, in der Gruppe der Allografts deutlich größer.

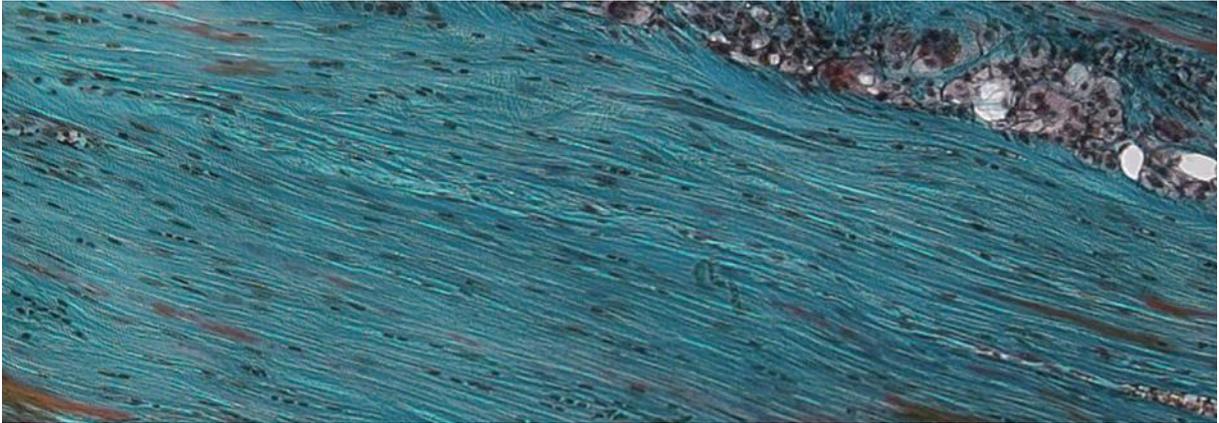


Abb. 4-7: Das Transplantat stellt sich als altes Bandgewebe dar, 6 Wochen allogene, Schaf 9AL6H, Tibia, MG, 100x

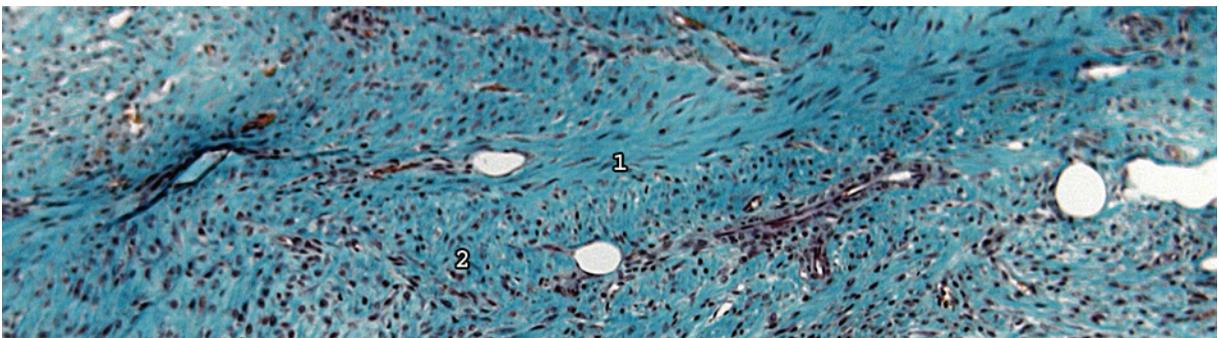


Abb. 4-8: Bei den autologen 6-Wochen-Tieren ist die Bandstruktur (1) schon deutlich aufgelockert und es gibt eine Vielzahl von Rundzellen (2), die von der Peripherie einwandern, 6 Wochen autolog, Schaf 4AU6B, Femur, MG, 100x

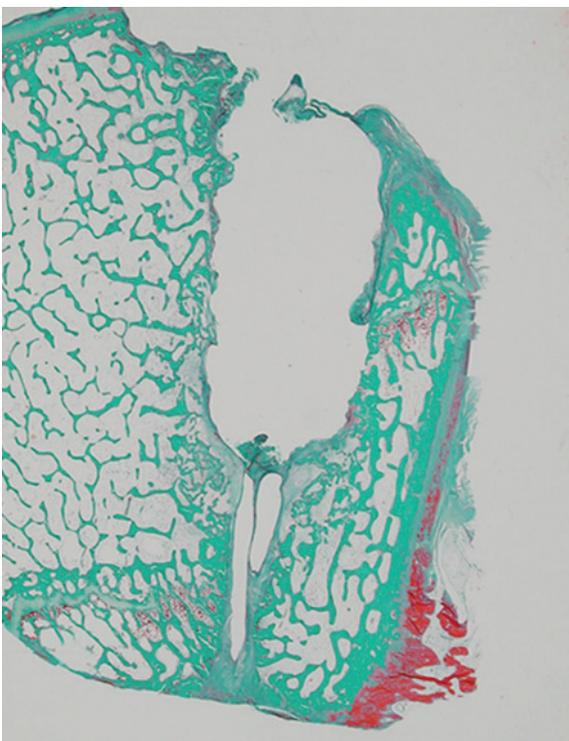


Abb. 4-9: Übersicht eines allogenen 6-Wochen-Präparates mit herausgerissenem Transplantat und deutlicher Tunnelaufweitung, Schaf 7AL6B, Femur, MG, Übersicht

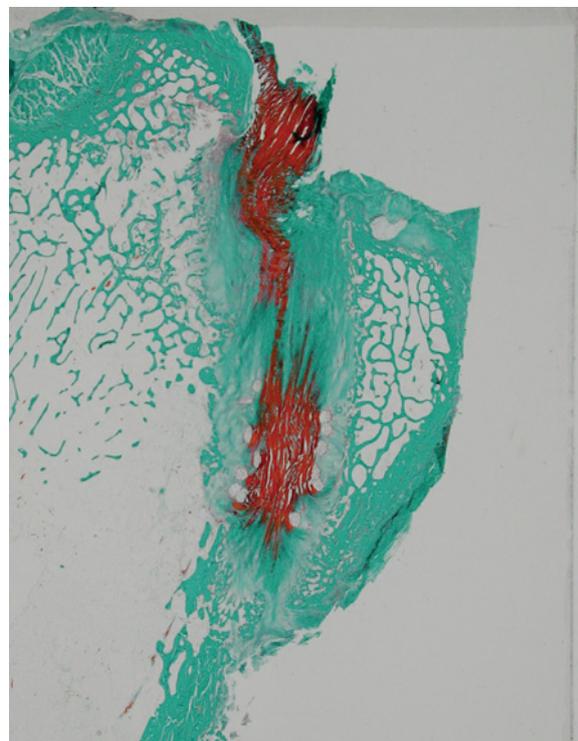


Abb. 4-10: Komplettes Transplantat eines allogenen 6-Wochen-Tieres, Schaf 9AL6H, Tibia, MG, Übersicht

4.3.1.3 Knochenumbau

Autologe Transplantate

Bei den Tieren der 6-Wochen-Autograft-Gruppe waren Osteoklasten die vorherrschenden Zellen im Knochenstoffwechsel; sie waren über den gesamten Tunnelverlauf verteilt und wiesen keinen Unterschied zwischen Femur und Tibia auf. Sie sorgten für eine rege Phagozytose; im Gegensatz dazu gab es aktive Osteoblasten nur vereinzelt und hauptsächlich in den Knochenlakunen. Von ihnen gebildetes Osteoid war nur am Boden als schmaler Saum vorhanden.

Neben vakuoliger Auflockerung war in fast allen (tibial: 5/7; femoral: 5/6) Präparaten eine deutliche Tunnelaufweitung zu sehen, die ausgeprägter am Tunneleingang zu beobachten war.

Allogene Transplantate

In dieser Gruppe waren nur am Tunneleingang viele Osteoklasten zu beobachten, im restlichen Tunnelverlauf tauchten sie nur vereinzelt auf. Im Gegensatz dazu war die Neubildung von Geflechtknochen durch aktive Osteoblasten vor allem in der Tiefe zu beobachten und auch das neugebildete Osteoid zeigte sich vor allem in der Tunnelmitte und am Tunnelboden.

Eine vakuolige Auflockerung und auch eine deutliche Tunnelaufweitung war in allen Präparaten zu sehen.

Vergleich autologer vs. allogener Knochenumbau

Zusammenfassend fiel eine deutliche höhere und homogener verteilte Osteoklastenexpression in den autologen Rekonstruktionen auf. Zusätzlich zeigte sich eine ausgeprägtere Tunnelaufweitung der Allografts, während in beiden Gruppen die femorale Tunnelaufweitung, vor allem gelenknah, stärker zu beobachten war.

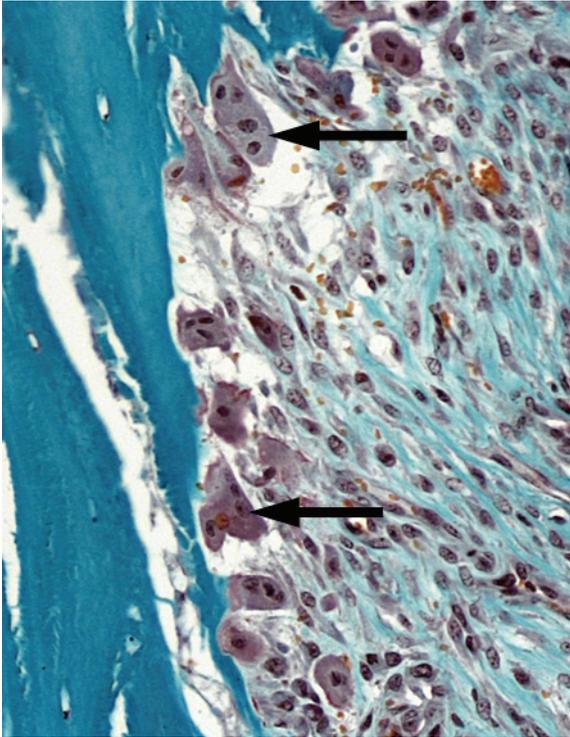


Abb. 4-11: Osteoklasten (Pfeile) am Tunnelleingang sind der abbauende Faktor im aktiven Knochenstoffwechsel, 6 Wochen autolog, Schaf 4AU6B, Femur, MG, 200x

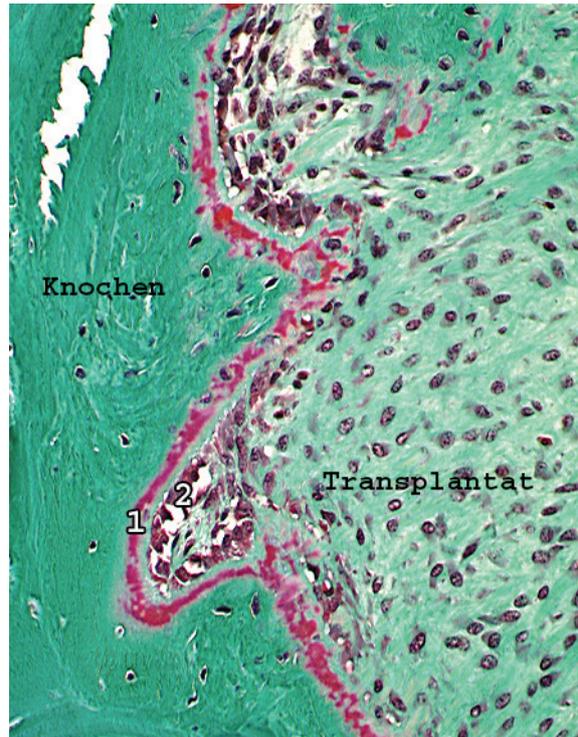


Abb. 4-12: Dagegen stehen Osteoidsäume (1) mit aktiven Osteoblasten (2) für die Knochenneubildung, 6 Wochen autolog, Schaf 8AU6H, Tibia, MG, 200x

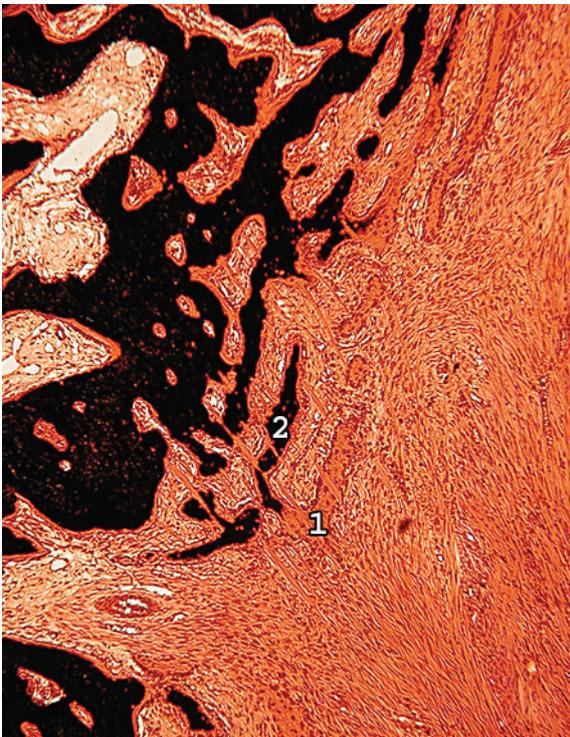


Abb. 4-13: Neu gebildeter unmineralisierter (1) und mineralisierter (2) Geflechtknochen im Bereich des Tunnelbodens, 6 Wochen allogene, Schaf 9AL6H, Tibia, SOK, 50x



Abb. 4-14: Übersichtsbild mit deutlicher Tunnelaufweitung (Pfeil) im Eingangsbereich, 6 Wochen autolog, Schaf 8AU6H, Femur, SOK, Übersicht

4.3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Autologe Transplantate

Bei den autologen 6-Wochen-Tieren war eine Anlagerung der Fluorchrome entlang des gesamten Knochentunnels zu erkennen. Eine bevorzugte Anreicherung konnte man tibial am Tunneleingang und femoral am Tunnelboden sehen.

Dabei reicherte sich das zuerst applizierte Calcein-grün vor allem an dem durch den Bohrvorgang angegriffenen Lamellenknochen an.

Das nach 3 Wochen verabreichte Xylenol stellte sich schwächer als das Calcein dar; seine Verteilung war aber ähnlich, so dass in den zusammengestellten Bildern überlagerte Banden zu sehen waren.

Am schwächsten stellte sich Tetrazyklin dar; es reicherte sich punktuell im angrenzenden Geflechtknochen an.

Allogene Transplantate

Im Gegensatz zu den autologen Transplantaten lag bei den allogenen 6-Wochen-Tieren keine durchgehende Fluoreszenz vor, es kam nur zu einer punktuellen Anreicherung vor allem am Tunneleingang und Tunnelboden.

Dabei war das nach 1 Woche applizierte Calcein in geringerer Menge als bei den autologen Tieren vorhanden; es stellte sich nur punktuell in schmalen Banden dar.

Das 2 Wochen später injizierte Xylenol zeigte eine stärkere Anlagerung als Calcein; es lag in schmalen Banden entlang des gesamten Tunnels vor.

Auch in dieser Gruppe war das zuletzt verabreichte Tetrazyklin nur wenig im angrenzenden Geflechtknochen eingelagert.

Vergleich autologe vs. allogene Transplantate

Bei den allogenen Tieren zeigte sich bei dominierender Xylenol-Expression eine deutlich geringere Calcein-grün-Expression als bei den autologen Tieren; somit setzt bei den allogenen Tieren die Knochenneubildung später ein. Tetrazyklin war in beiden Studiengruppen nur schwach nachweisbar.

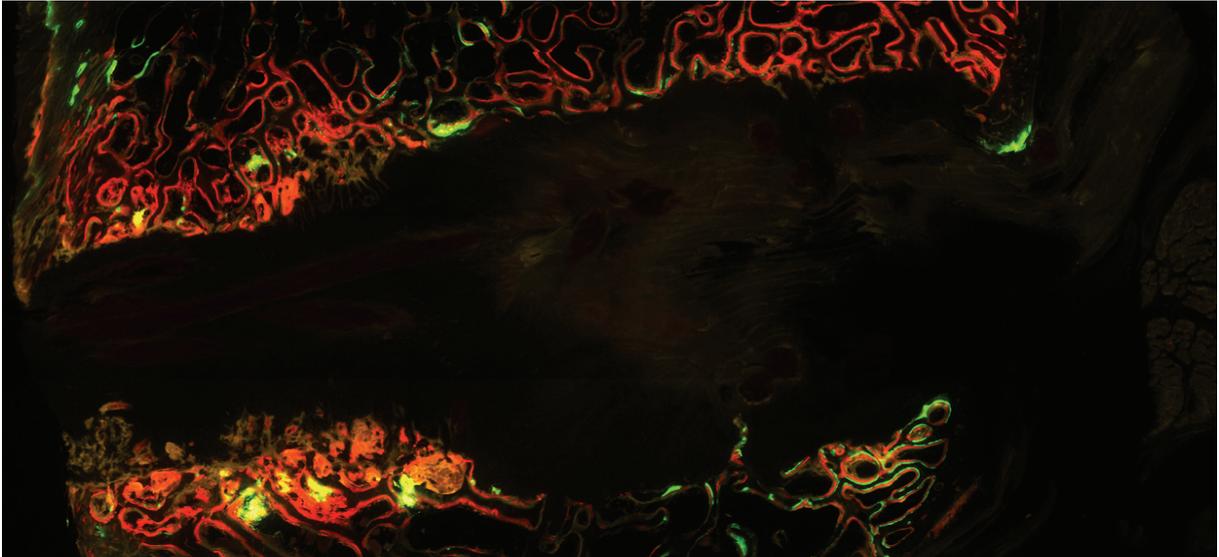


Abb. 4-15: Xylenol-orange lagert sich bei den allogenen Tieren im Vergleich zu den autologen vermehrt an, 6 Wochen allogene, Schaf 9AL6H, Femur

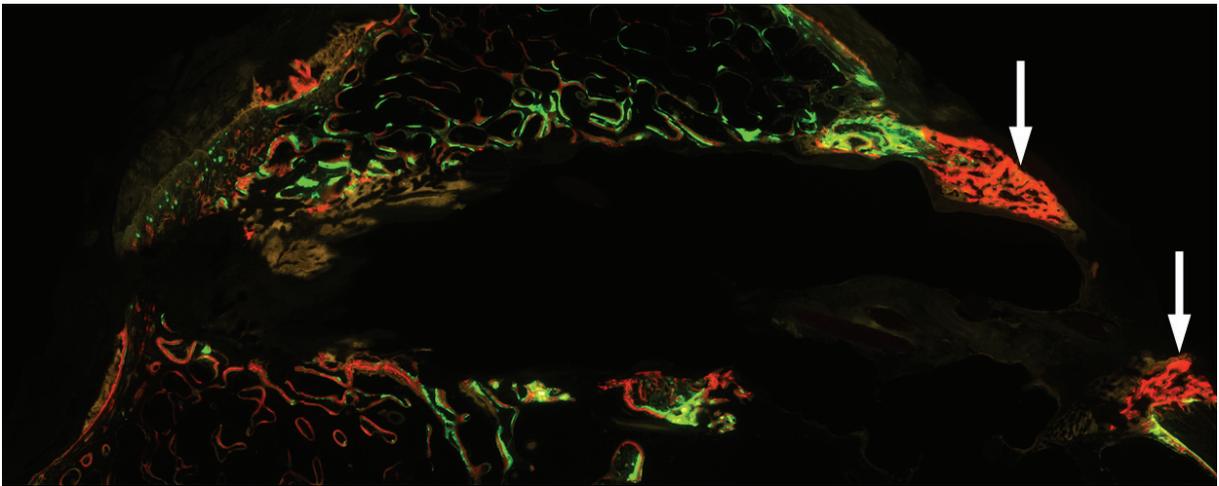


Abb. 4-16: Bei diesem allogenen 6-Wochen-Tier ist eine deutliche Anlagerung von Xylenol-orange im Tunneleingangsbereich (Pfeile) zu sehen; durch diese Knochenneubildung wird eine Verengung des Tunneleingangs erreicht. Auch der Tunnelboden zeigt eine vermehrte Anreicherung von Xylenol, 6 Wochen allogene, Schaf 2AL6B, Tibia

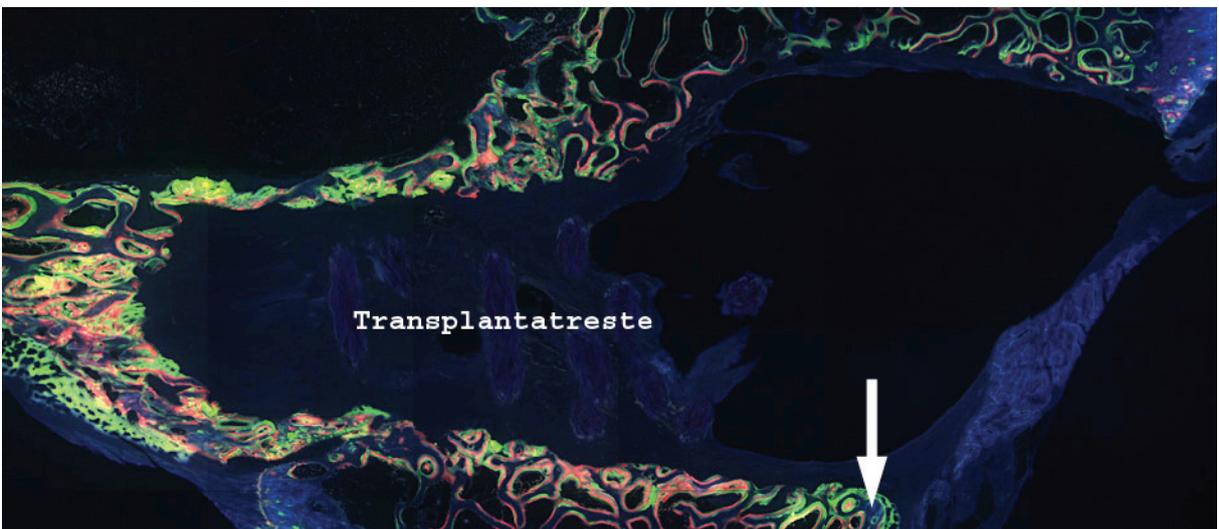


Abb. 4-17: Die Darstellung aller drei Fluorchrome zeigt die gleichmäßige Anlagerung von Calcein und Xylenol, während Tetracyclin (Pfeil) nur punktuell sichtbar ist, 6 Wochen autolog, Schaf 3AU6B, Tibia

4.3.2 Ergebnisse der 12-Wochen-Gruppe

4.3.2.1 Knochen-Band-Heilung

Autologe Transplantate

Auch in der 12-Wochen-Gruppe der autologen Präparate lag das Transplantat tibial und femoral direkt der Tunnelwand an. Die FIZ war tibial in der Tunnelmitte und am Tunnelboden breit, zellreich und zum großen Teil noch ungeordnet; Sharpey Fasern befanden sich vor allem im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens und waren in Zugrichtung ausgerichtet. Femoral war die breite, zellreiche und wenig strukturierte FIZ entlang des gesamten Transplantates vorhanden. Auch hier gab es als Zeichen einer indirekten Bandinsertion viele in Zugrichtung verlaufende Sharpey Fasern.

Bei den tibialen Präparaten gab es an der Zug- und Druckseite des Tunneleingangs sowohl unreife (2/7) als auch reife (5/7) Stadien der direkten Bandinsertion mit dem klassischen 4-Zonen-Aufbau. In der Tunnelmitte und am Tunnelboden gab es -von vereinzelt unverkalkten (Grad I) über chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) bis hin zur unreifen und reifen direkten Bandinsertion- alle Stadien der direkten Bandinsertion.

Im Gegensatz dazu konnte bei den femoralen Präparaten die direkte Bandinsertion im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens in Form von chondroiden Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) und einer unreifen direkten Bandinsertion (Grad III) beobachtet werden. Am Tunneleingang waren keinerlei Anzeichen einer direkten Bandinsertion zu sehen.

Tibial wurden vor allem von der Zugseite aus Mineralisationsfronten gebildet, wobei auch an der Druckseite welche zu erkennen waren. Femoral war dieser Vorgang vom Ausgang ausgehend zu beobachten.

Ein degloving konnte tibial nur an einem Präparat gesehen werden. Femoral gab es ein degloving vor allem im Eingangsbereich.

Allogene Transplantate

Auch in der allogenen Gruppe lag das Transplantat tibial und femoral der Tunnelwand direkt an.

Die FIZ war breit, hatte einen normalen Zellgehalt und begann sich zu ordnen. Sowohl femoral als auch tibial gab es vereinzelt gerichtete Sharpey Fasern. Eine direkte Bandinsertion

war in den tibialen Präparaten weiter fortgeschritten. Während an der Druckseite chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) und zum Teil eine reife direkte Bandinsertion (Grad IV) ausgebildet war, war an der Zugseite von chondroiden Zellen mit schmalem Mineralisationssaum (2/7) über einen Vierzonenaufbau (4/7) bis zu einer reifen direkten Bandinsertion (1/7) alles zu sehen. Im Bereich der Tunnelmitte lagen sowohl chondroide Zellen mit schmalem Mineralisationssaum (4/6) als auch eine direkte Bandinsertion (2/6) vor; am Tunnelboden waren chondroide (3/6) Zellen vorhanden, die nur vereinzelt (3/6) von Mineralisationssäumen umgeben waren.

Vom Knochentunnel ausgehende Mineralisationsfronten hatten sich vor allem am Tunneleingang und am Tunnelboden gebildet.

An der femoralen Seite waren am Tunneleingang chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (5/7) und zum Teil (2/7) auch eine direkte Bandinsertion zu sehen. Vom Knochen ausgehende Mineralisationsfronten gab es im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens.

Ein degloving konnte tibial in nur einem Präparat und femoral in 4 Präparaten festgestellt werden.

Vergleich autologe vs. allogene Knochen-Band-Heilung

Nach 12 Wochen gab es sowohl in der autologen als auch in der allogenen Gruppe vor allem an der anterioren Zugseite schon eine reife direkte Bandinsertion (Grad IV), allerdings häufiger und in größeren Bereichen bei den autologen Transplantaten.

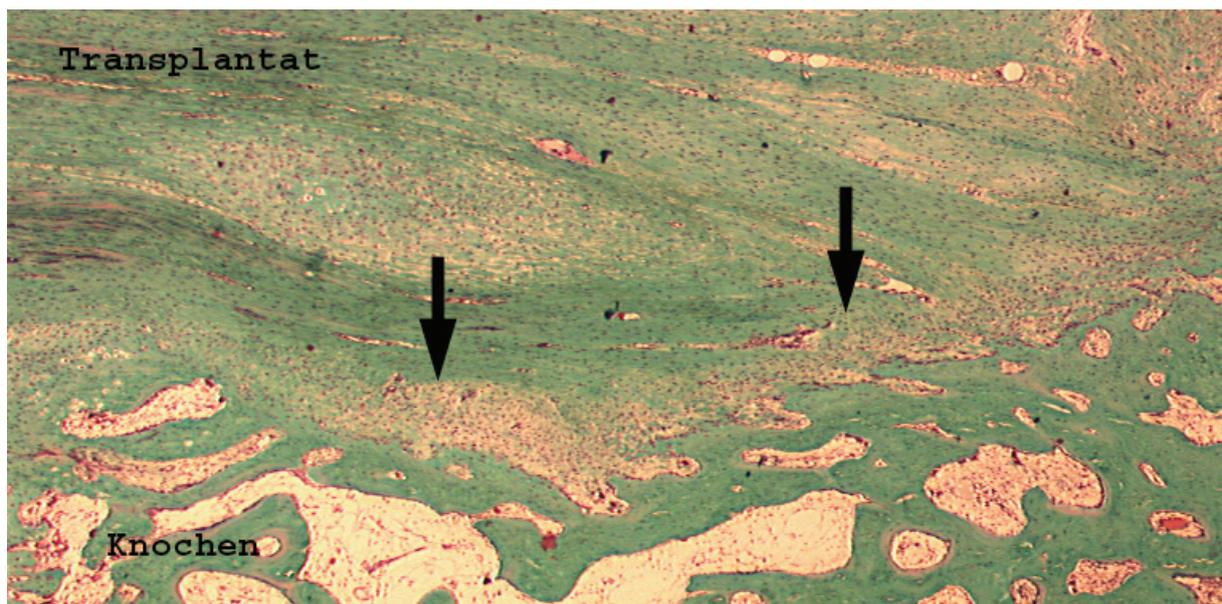


Abb. 4-18: Darstellung der FIZ (Pfeile) bei einem allogenen 12-Wochen-Tier als breiter, sich ordnender Bereich zwischen Transplantat und Knochen mit normalem Zellgehalt, Schaf 8AL12H, Tibia, MG, 25x



Abb. 4-19: Direkte Bandinsertion Grad II im Bereich der Tunnelmitte; die chondroiden Zellen sind zum Teil von einem Mineralisationsaum umgeben (Pfeil), 12 Wochen autolog, Schaf 7AU12B, Tibia, MG, 200x

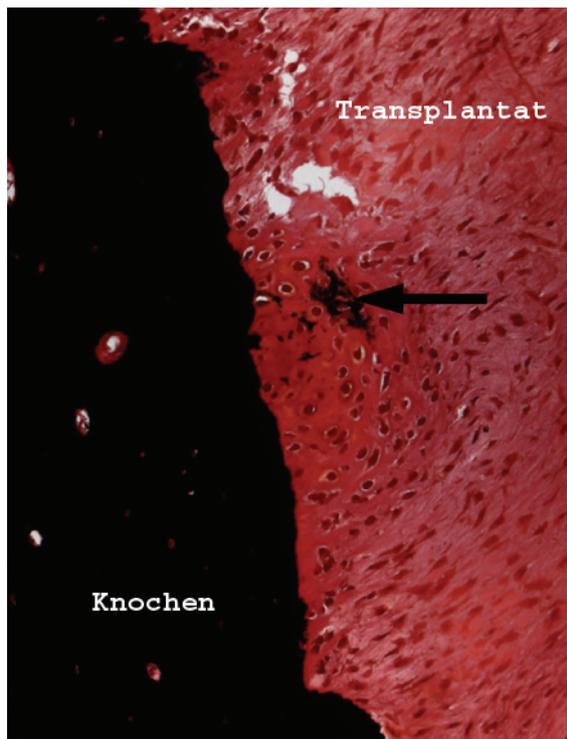


Abb. 4-20: Der korrespondierende Tunnelabschnitt in der SOK-Färbung verdeutlicht das erste Auftreten von Mineralisationsäumen (Pfeil) zwischen den Knorpelzellen, 12 Wochen autolog, Schaf 7AU12B, Tibia, SOK, 200x

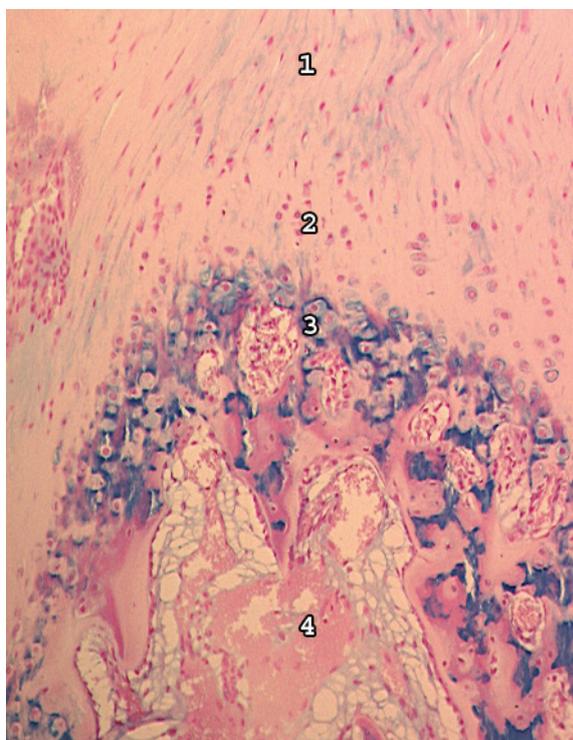


Abb. 4-21: Direkte Bandinsertion Grad IV mit klassischem Vierzonenaufbau (1-Band, 2-Faserknorpel, 3-Kalkknorpel, 4-Knochen) an einem Knochenvorsprung in der Alcian-Blau-Färbung, 12 Wochen allogene, Schaf 3AL12B, Tibia, AB, 100x

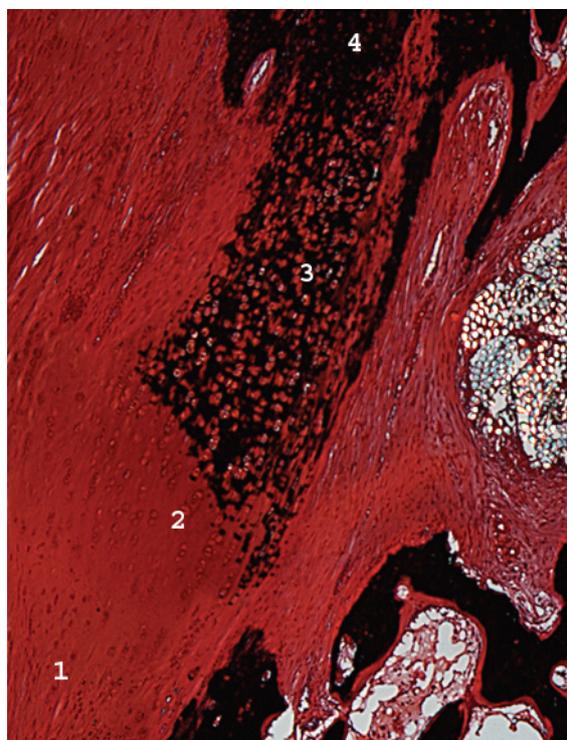


Abb. 4-22: Eine direkte Bandinsertion Grad IV in der Safranin-O-von-Kossa-Färbung, 12 Wochen autolog, Schaf 8AU12B, Tibia, SOK, 50x

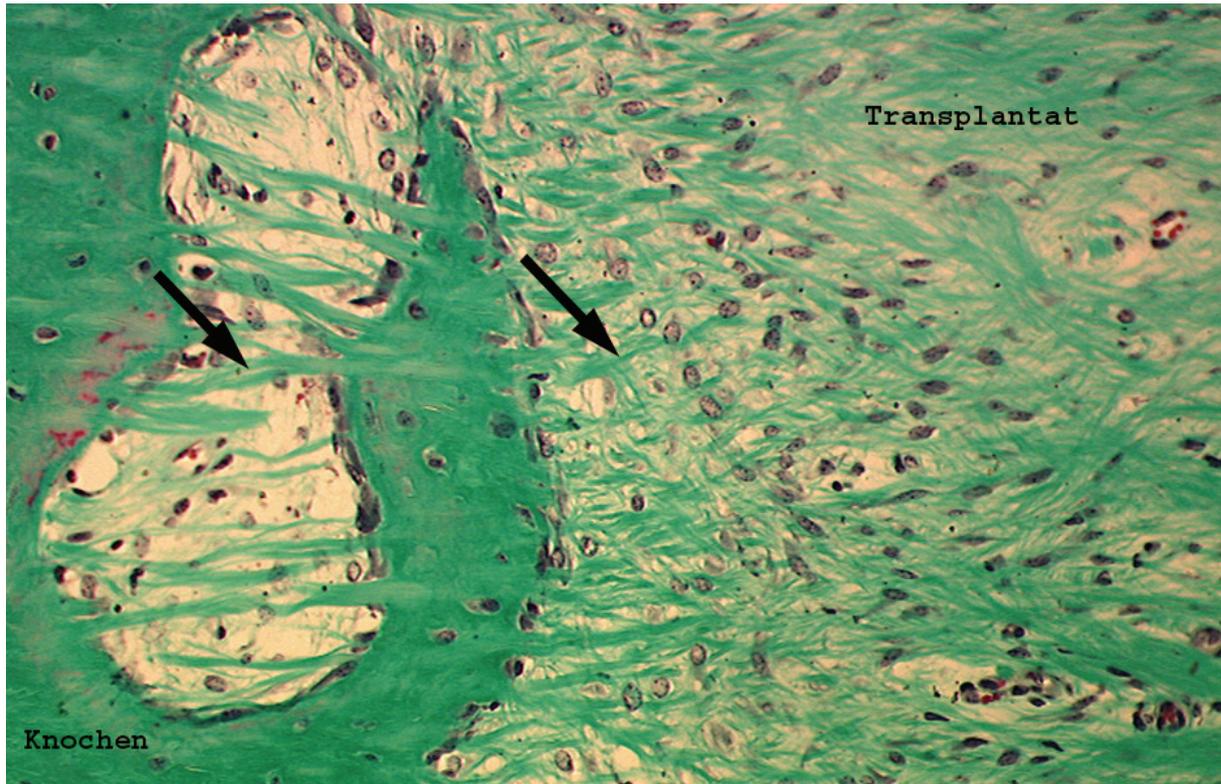


Abb. 4-23: Indirekte Bandinsertion: Sharpey Fasern (Pfeile) durchdringen den Knochen, 12 Wochen allogene, Schaf 2AL12B, Tibia, MG, 200x

4.3.2.2 Transplantat

Autologe Transplantate

Bei der Beurteilung des Transplantates gab es bei den 12-Wochen-Tieren vor allem zentral avitales Gewebe. Es lag eine Normo- bis Hyperzellularität mit flachen Zellkernen vor; die Gefäßverteilung und Anzahl entsprach der eines nativen Bandes (normovaskulär). Bei den tibialen Präparaten gab es eine beginnende wellenförmige Struktur des Bandgewebes (sogenannter „crimp“). Bei den femoralen Transplantaten waren die Fasern nur teilweise gerichtet.

Allogene Transplantate

In allen Präparaten der 12-Wochen-Tiere mit einem allogenen Bandersatz lag zentral nekrotisches Gewebe vor. Es lag eine Hyper- bis Normozellularität mit deutlicher Infiltration von Rundzellen und einer Hypervaskularität vor und der Faserverlauf war erst zum Teil gerichtet. Peripher normalisierte sich der Zellgehalt, wobei auch hier eine deutliche

Infiltration von Rundzellen vorlag. Gefäße waren in einer Vielzahl vorhanden und der Faserverlauf war erst zum Teil gerichtet.

Vergleich autologe vs. allogene Transplantate

Vergleichend zeigte sich bei den autologen Transplantaten eine wellenförmige Ausrichtung des neugebildeten Bandgewebes, während bei den allogenen Tieren bei beginnender Ausrichtung noch eine deutliche Hyperzellularität vorlag.

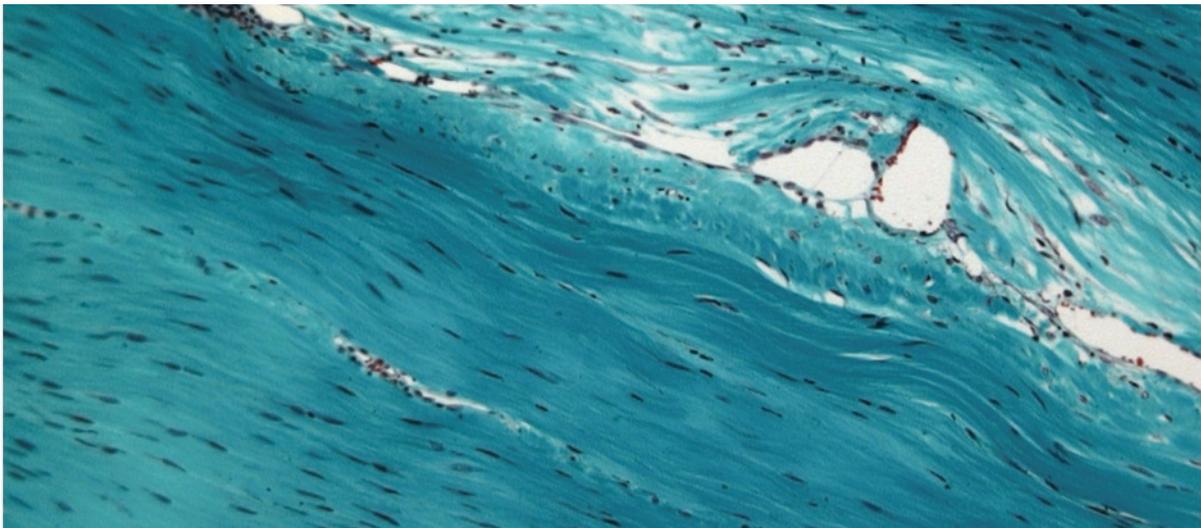


Abb. 4-24: Beginnende Ausrichtung des Transplantatgewebes, 12 Wochen allogene, Schaf 6AL12B, Femur, MG, 100x

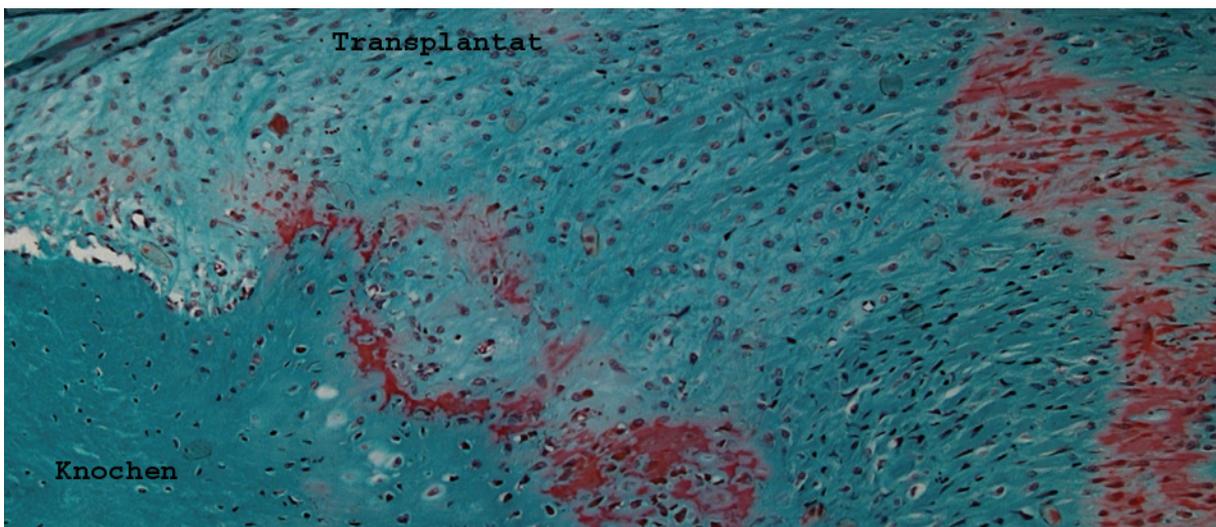


Abb. 4-25: Auch bei den autologen Tieren liegt zum Teil in der Peripherie noch eine deutliche Hyperzellularität vor, 12 Wochen autolog, Schaf 6AU12B, Femur, MG, 100x

4.3.2.3 Knochenumbau

Autologe Transplantate

Die Tunnelaufweitung war bei den Tieren dieser Gruppe nur mäßig fortgeschritten. Während es bei den femoralen Tieren deutliche vakuolige Auflockerungen in den osteoklastären Lakunen gab, kamen sie bei den tibialen Tieren nur in geringem Maße vor.

Osteoklasten kamen nur noch vereinzelt vor, während die Zahl der aktiven Osteoblasten und damit auch das gebildete Osteoid vor allem im Bereich des Tunneleingangs zunahm.

Allogene Transplanate

In fast allen (tibial: 5/7; femoral: 6/7) Präparaten lag eine deutliche Tunnelaufweitung vor. Es gab in den osteoklastären Lakunen vakuolige Auflockerungen. Osteoklasten traten nur vereinzelt auf; es sammelten sich Fremdkörper-Riesenzellen um das Nahtmaterial. Osteoid nahm Richtung Tunnelboden zu; seinem Verlauf entsprach auch das Auftreten der aktiven Osteoblasten.

Vergleich autologer vs. allogener Knochenumbau

Während bei den autologen Transplantaten die Zahl der aktiven Osteoblasten und des Osteoids vor allem im Bereich des Tunneleingangs zunahm, war dies bei den allogenen in Richtung des Tunnelbodens zu beobachten. Die Zahl der Osteoklasten nahm in beiden Gruppen im Vergleich zu den 6-Wochen-Tieren ab.

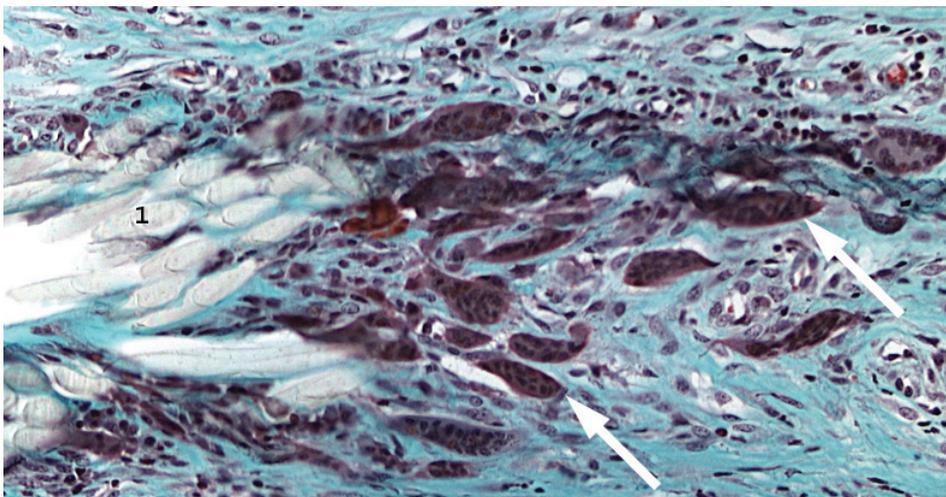


Abb. 4-26: Ansammlung von Fremdkörperriesenzellen (Pfeile) um das Nahtmaterial (1), 12 Wochen autolog, Schaf 9AU12H, Femur, MG, 200x

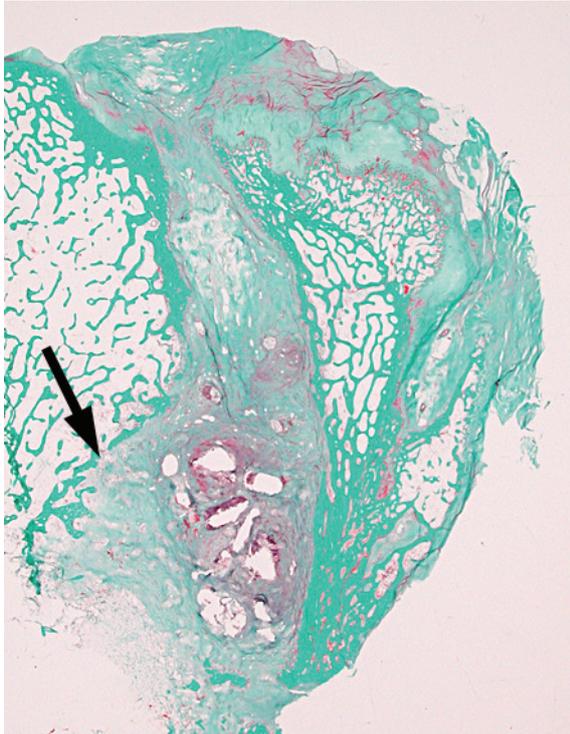


Abb. 4-27: Massive Tunnelaufweitung (Pfeil) im Bereich des Tunnelbodens, 12 Wochen autolog, Schaf 5AU12B, Tibia, MG, Übersicht

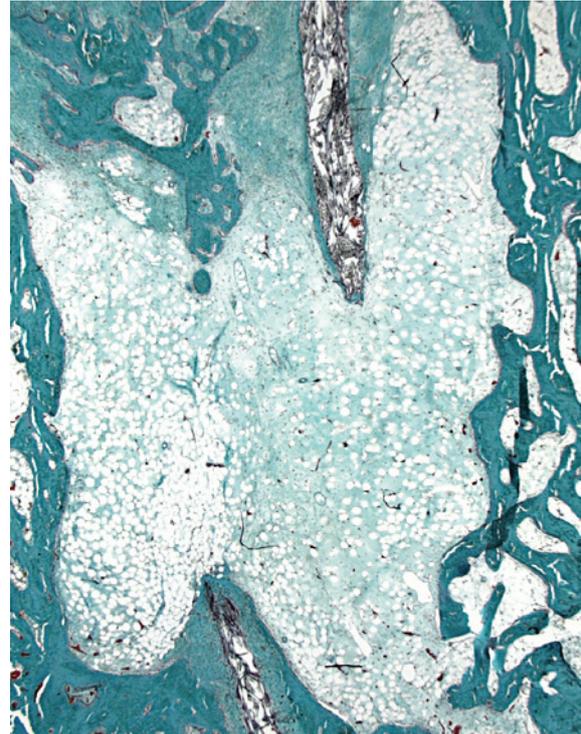


Abb. 4-28: Vakuolige Auflockerungen im Bereich des Tunnelbodens, 12 Wochen allogenen, Schaf 9AL12H, Tibia, MG, 16x

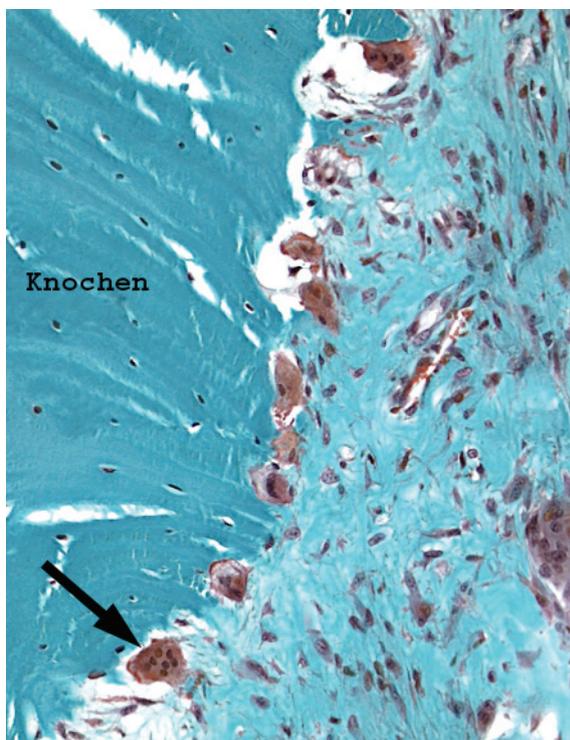


Abb. 4-29: Osteoklasten (Pfeil) im Bereich des Tunnelbodens zeigen bei einem allogenen 12-Wochen-Tier den aktiven Knochenstoffwechsel, Schaf 9AL12H, Femur, MG, 200x



Abb. 4-30: Deutliche Knochenneubildung über Mineralisationsfronten (Pfeile) bei einem autologen 12-Wochen-Tier, Schaf 1AU12B, Tibia, SOK, 50x

4.3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Autologe Transplantate

Bei der Fluoreszenz konnte ein Rückgang beobachtet werden, wobei es vor allem in unmittelbarer Tunnelumgebung zu einer abgeschwächten Anreicherung kam.

Wie auch bei den 6-Wochen-Tieren stellte sich Calcein nach 12 Wochen am stärksten dar. Es war entlang des gesamten Tunnels im affektierten Lamellenknochen zu sehen; die Verteilung des Xylenols war ähnlich, aber in deutlich geringerem Maße. Tetrazyklin hatte sich nur punktuell in der Tunnelwand angelagert.

Alle 3 Stoffe konnten in der beginnenden Brückenbildung zum Tunnelverschluß gesehen werden.

Allogene Transplantate

Auch bei den allogenen Präparaten war ein Rückgang im Vergleich zu den 6-Wochen-Tieren zu sehen.

Sowohl Calcein als auch Xylenol stellten sich nicht mehr kontinuierlich entlang des gesamten Tunnels dar; im Gegensatz zu Xylenol lag Calcein aber in breiteren Banden vor.

Tetrazyklin war auch bei den allogenen Präparaten nur punktuell angelagert, dabei vor allem im neugebildeten Geflechtknochen und in der beginnenden Brückenbildung.

Vergleich autologe vs. allogene Transplantate

In beiden Gruppen war insgesamt ein Rückgang der dargestellten Fluoreszenzmarker zu beobachten. Sowohl bei den autologen als auch den allogenen Tieren war die Darstellung von Calcein am deutlichsten. Tetrazyklin stellte sich auch nach 12 Wochen am schwächsten dar.

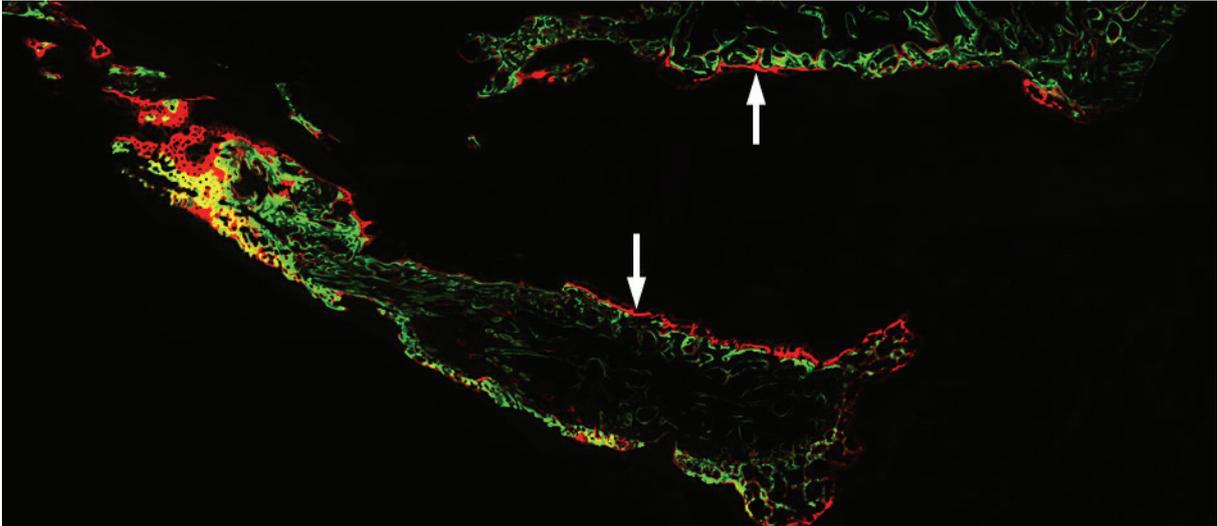


Abb. 4-31: Während Xylenol (Pfeile) eine nahezu lineare schmale Anlagerungsbande aufweist, kann Calcein entlang des gesamten Tunnels auch in tieferen Bereichen gesehen werden, 12 Wochen allogene, Schaf 9AU12H, Tibia

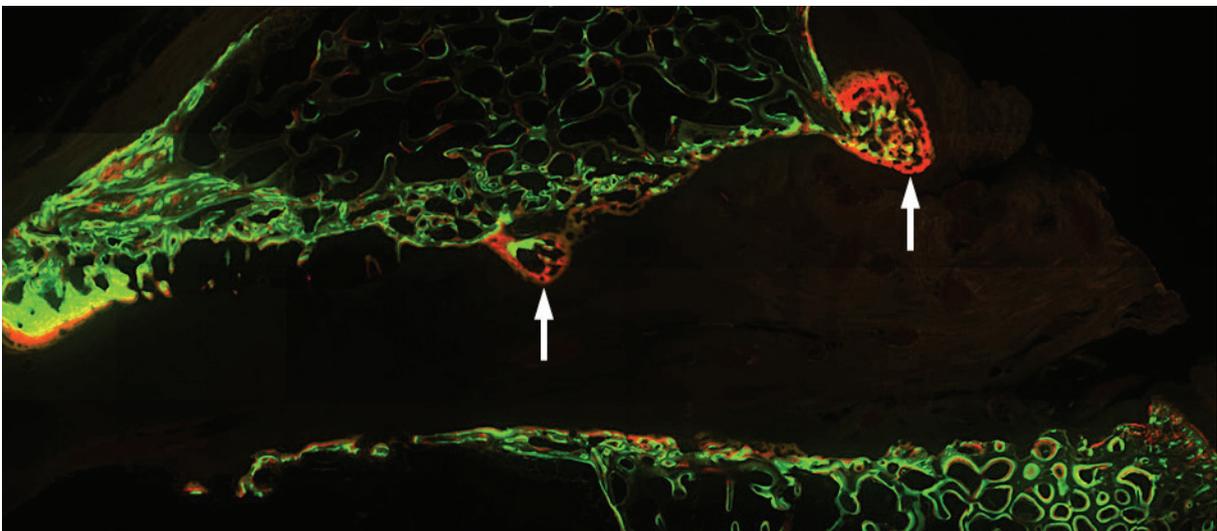


Abb. 4-32: Xylenol-Anreicherungen am Tunneleingang und mittig an einem Knochenvorsprung (Pfeile) zeigen den Beginn des Zuwachsens des Tunnels; Calcein lagert sich gleichmäßig an, 12 Wochen allogene, Schaf 2AL12B, Tibia

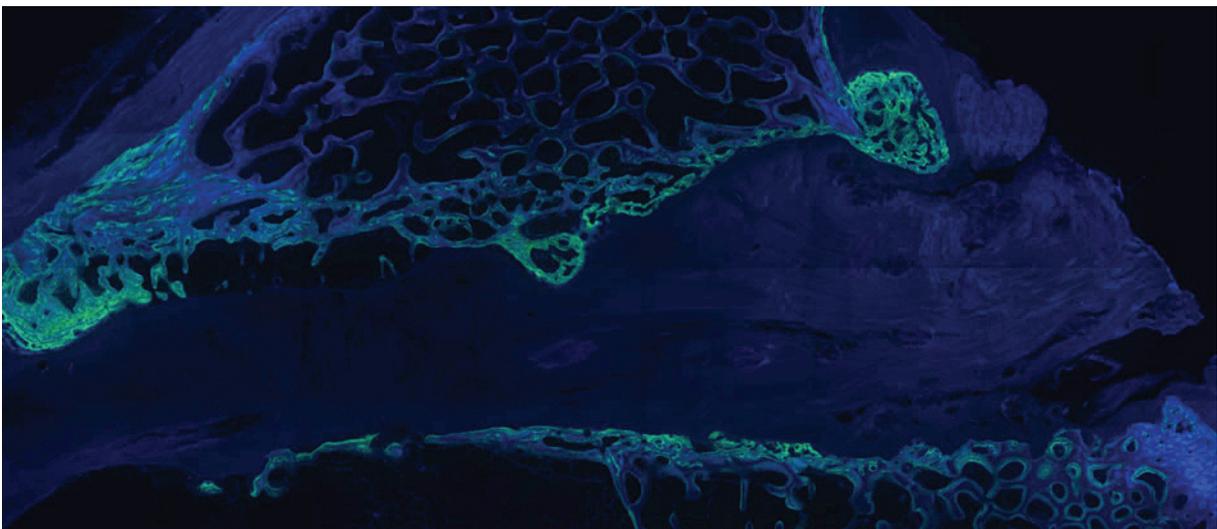


Abb. 4-33: Korrespondierendes Bild mit Darstellung des Tetracyklins: auch hier kann eine vermehrte Anreicherung an den Punkten der Knochenneubildung beobachtet werden, 12 Wochen allogene, Schaf 2AL12B, Tibia

4.3.3 Ergebnisse der 52-Wochen-Gruppe

4.3.3.1 Knochen-Band-Heilung

Autologe Transplantate

In allen autologen Präparaten der 52-Wochen-Tiere lag das Transplantat tibial und femoral der Tunnelwand direkt an.

Während in den tibialen Präparaten eine schmale und zum Teil geordnete FIZ vorlag, war sie in den femoralen Präparaten immer noch breit und ungeordnet mit normalem Zellgehalt. Sowohl tibial als auch femoral waren im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens Sharpey Fasern vorhanden; femoral allerdings in erhöhtem Maße.

Die direkte Bandinsertion hatte sich deutlich weiterentwickelt. Tibial gab es in allen Präparaten eine reife direkte Bandinsertion mit dem klassischen Vierzonen-Aufbau im Tunneleingangsbereich. In der Tunnelmitte gab es in 2 Präparaten diesen hohen Grad der reifen Bandinsertion, während in den anderen 5 Präparaten nur chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) vorhanden waren. Im Bereich des Tunnelbodens waren in 3 Präparaten keine Anzeichen einer direkten Bandinsertion zu sehen; im Gegensatz dazu lag in 3 Präparaten in diesem Tunnelabschnitt eine reife direkte Bandinsertion vor.

Femoral lag die reifere direkte Bandinsertion im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens vor. Im Gegensatz dazu waren im Tunneleingangsbereich nur vereinzelt chondroide Zellen mit Mineralisationssaum (Grad II) oder sogar nur einzelne chondroide Zellen als erstes Anzeichen einer direkte Bandinsertionen (Grad I) vorhanden.

Tibial gab es nur noch im Bereich des Tunneleingangs Mineralisationsfronten; femoral war der Tunnelboden fast durchbaut und auch in den anderen Tunnelabschnitten waren noch deutliche Mineralisationsfronten zu sehen.

Es konnte in keinem Präparat ein degloving beobachtet werden, so dass von einer kompletten Inkorporation des Bandes gesprochen werden konnte.

Allogene Transplantate

Auch in der allogenen Gruppe lag das Transplantat in großen Teilen der Tunnelwand an. Die FIZ war schmal, aber gut strukturiert mit normalem Zellgehalt. Während im tibialen Teil nur vereinzelte Sharpey Fasern vorlagen, gab es femoral vor allem am Tunnelboden viele in Zugrichtung des Transplantates ausgerichtete Sharpey Fasern. Dementsprechend gab es tibial

sowohl am Tunneleingang als auch in der Tunnelmitte und am Tunnelboden eine reife direkte Bandinsertion und auch Mineralisationsfronten lagen im Bereich des Tunneleingangs und des Tunnelbodens vor. Femoral gab es dagegen nur in 2 Präparaten eine reife direkte Bandinsertion im Bereich des Tunnelbodens, im Bereich des Tunneleingangs und der Tunnelmitte lagen als Zeichen einer direkten Bandinsertion nur chondroide Zellen vor, die auch nur z.T. einen Mineralisationssaum aufwiesen. Deutliche Mineralisationsfronten waren im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens zu sehen.

Zu einem zentralen Herausgleiten des Transplantates kam es nach 52 Wochen nur in 2 femoralen Präparaten.

Vergleich autologe vs. allogene Knochen-Band-Heilung

In beiden Gruppen lag nach 52 Wochen eine reife direkte Bandinsertion vor. Auch die Mineralisationsfronten waren in beiden Gruppen deutlich ausgebildet und führten zum Teil zu einer kompletten Durchbauung des Tunnels.

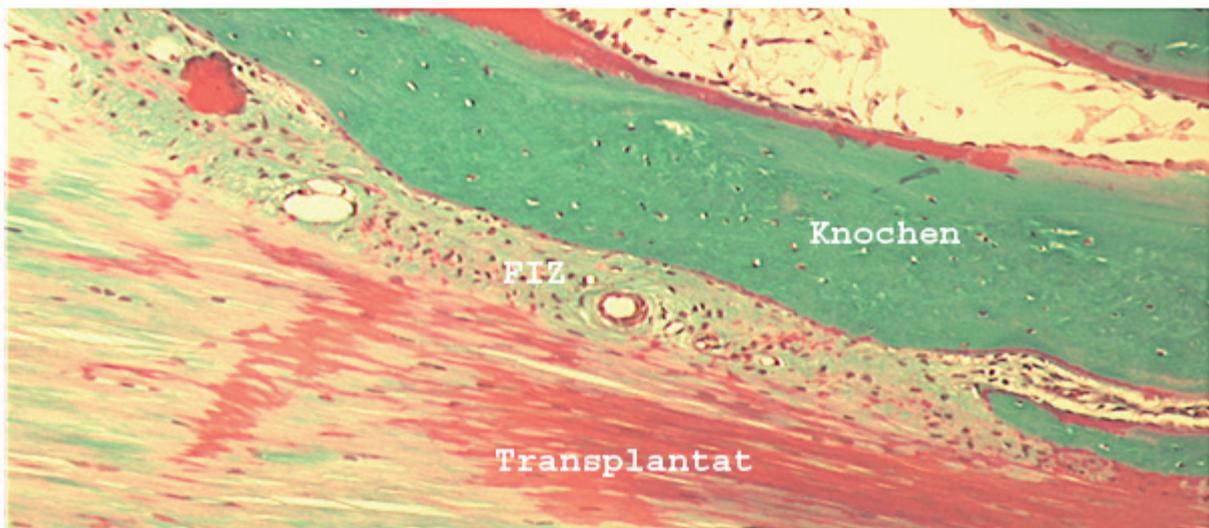


Abb. 4-34: Darstellung der schmalen und zum großen Teil geordneten fibrösen Zwischenschicht (FIZ) bei einem allogenen 52-Wochen-Tier, Schaf 1AL52B, Tibia, MG, 100x

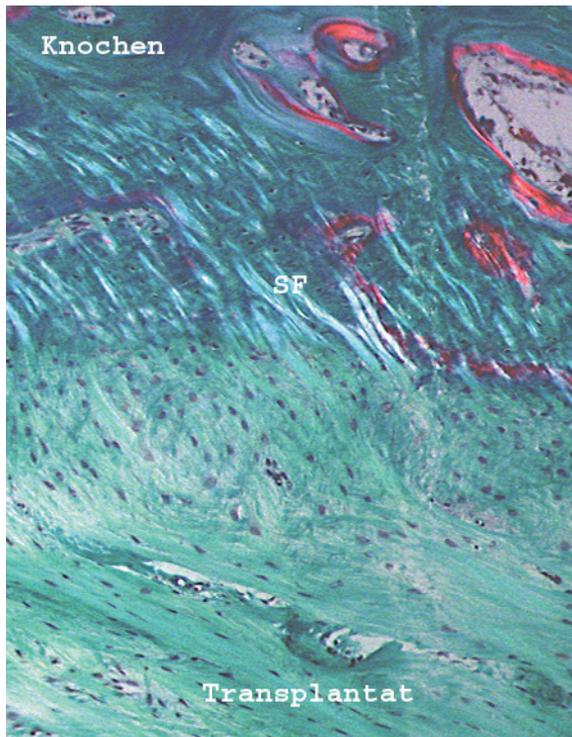


Abb. 4-35: Sharpey Fasern (SF) stellen sich unter dem Polarisationsmikroskop gut dar, 52 Wochen autolog, Schaf 1AU52B, Tibia, pol, 100x

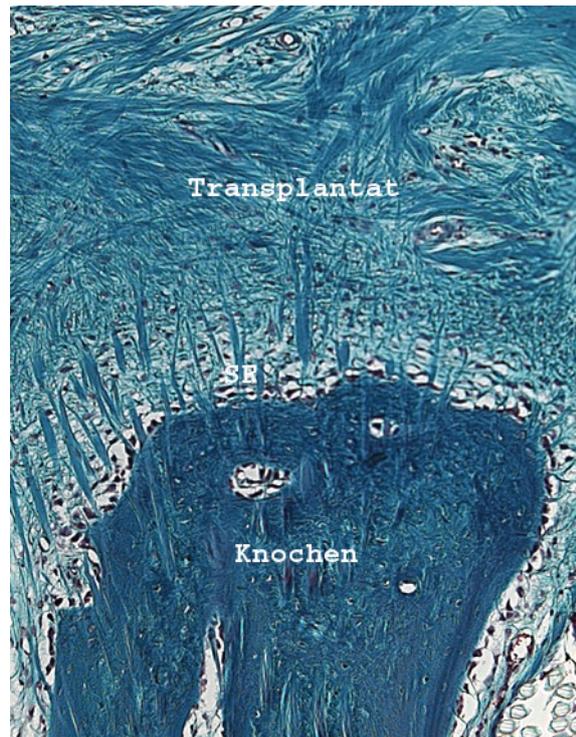


Abb. 4-36: Sharpey Fasern (SF) verbinden Transplantat und Knochen als indirekte Bandinsertion an einem Knochenvorsprung am Tunnelboden, 52 Wochen allogene, Schaf 3AL52B, Tibia, MG, 100x

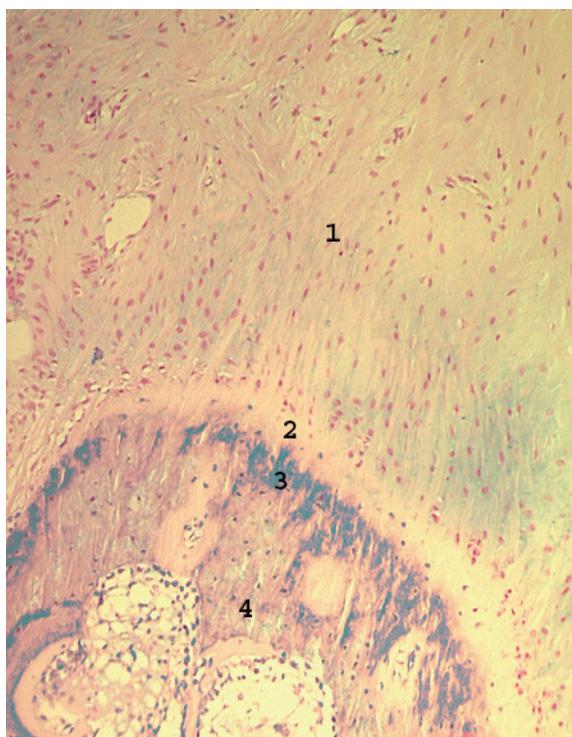


Abb. 4-37: Eine direkte Bandinsertion Grad IV in der Alcian-Blau-Färbung (1-Band, 2-Faserknorpel, 3-Kalkknorpel, 4-Knochen), 52 Wochen autolog, Schaf 1AU52B, Tibia, AB, 100x

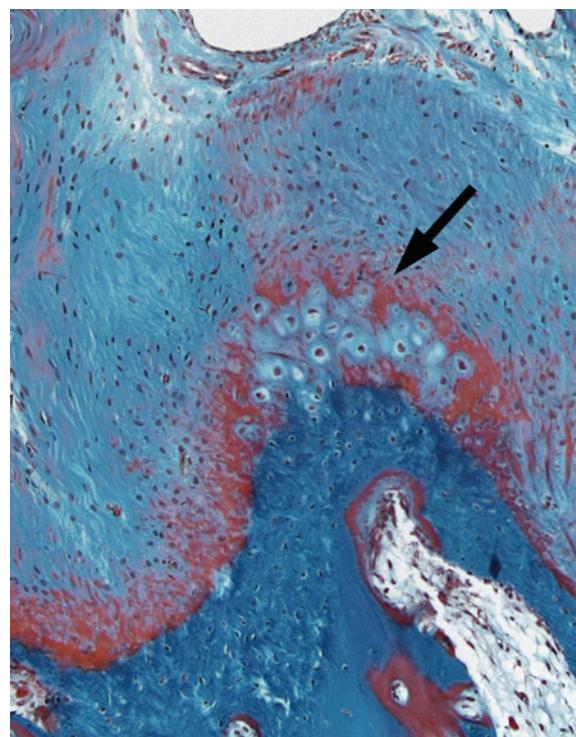


Abb. 4-38: Eine direkte Bandinsertion Grad II mit von einem Kalksaum umgebenen Knorpelzellen (Pfeil) in der Masson-Goldner-Färbung am Tunneleingang, 52 Wochen autolog, Schaf 5AL52B, Femur, MG, 100x

4.3.3.2 Transplantat

Autologe Transplantate

Während in der Mitte des Transplantates noch avitale Bereiche vorlagen, hatte sich der Zellgehalt peripher auf einen normalen Gehalt reduziert, so dass man von einem normozellulären Neoligament sprechen konnte. Die kollagenen Fasern waren lang gestreckt und in Zugrichtung orientiert. Im Bereich der FIZ waren hyperzelluläre und hypervaskuläre Bereiche zu sehen, die auch mit Rundzellinfiltraten durchsetzt waren.

Allogene Transplantate

Bei den allogenen Transplantaten gab es zentral weiterhin avitale Bereiche. Der Zellgehalt hatte sich normalisiert und der Faserverlauf richtete sich in Zugrichtung aus.

Auch hier konnten vor allem peripher noch Rundzellinfiltrate gesehen werden.

Vergleich autologe vs. allogene Transplantate

Nach 52 Wochen gab es in beiden Gruppen nur noch zentral schmale avitale Bereiche. Der Rest des Bandgewebes war im Faserverlauf ausgerichtet.



Abb. 4-39: Darstellung eines zentralen Transplantatabschnittes mit gleichmäßiger Faserausrichtung, 52 Wochen allogene, Schaf 3AL52B, Tibia, MG, 100x

4.3.3.3 Knochenumbau

Autologe Transplantate

Bei den autologen 52-Wochen-Tieren war eine deutliche Tunnelaufweitung im Bereich des Tunnelbodens bei zuwachsendem Tunneleingang zu sehen. Eine vakuolige Auflockerung kam nur noch in der Hälfte der Präparate vor. Während die Zahl der Osteoklasten deutlich reduziert war, lag eine große Zahl an aktiven Osteoblasten vor allem im Bereich des Tunneleingangs vor; sie produzierten Osteoid in Richtung Tunnel, so dass von der Zugseite aus ein deutlicher knöcherner Vorsprung ausgebildet war. Im Bereich der Tunnelmitte und des Tunnelbodens gab es tibial wenig und femoral viel Osteoid.

Allogene Transplantate

Bei den allogenen Präparaten lag eine Tunnelaufweitung nur noch im mittleren Teil vor, Ein- und Ausgang wuchsen zu. Zu einer vakuoligen Auflockerung kam es nur noch in den femoralen Bereichen. Während im tibialen Teil nur noch vereinzelt Osteoklasten vorkamen, gab es im femoralen noch einige. Osteoid wurde vor allem im Eingangs- und Bodenbereich gebildet, mittig lag es nur in schmalen Säumen vor. Auch aktive Osteoblasten waren in einer großen Anzahl in den Lakunen zu sehen.

Vergleich autologer vs. allogener Knochenumbau

Vergleichend nähern sich auch im Knochenumbau die allogenen den autologen Tieren an. Bei beiden kommt es zum großen Teil zu einer Durchbauung des Knochentunnels durch aktive Osteoblasten entlang des gesamten Tunnels

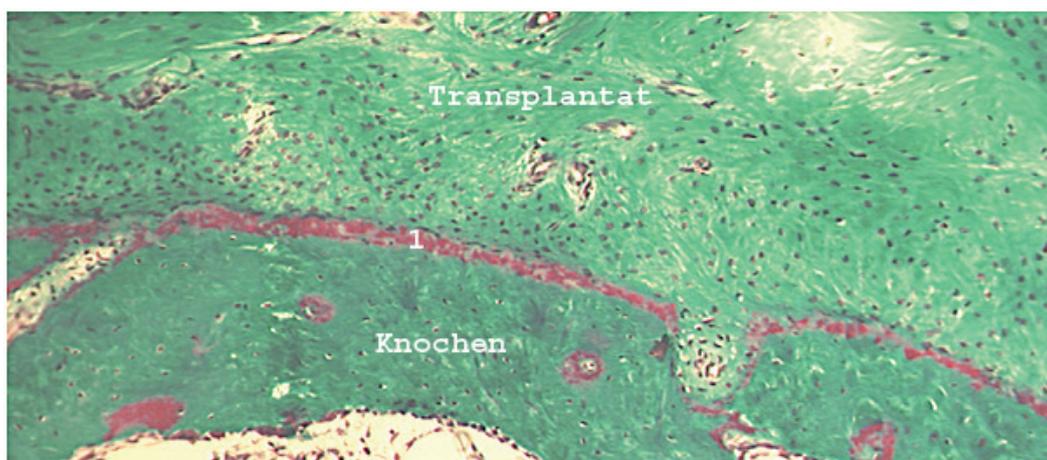


Abb. 4-40: Deutliche Osteoidsäume (1) bei einem autologen 52-Wochen-Tier, Schaf 1AU52B, Tibia, MG, 100x

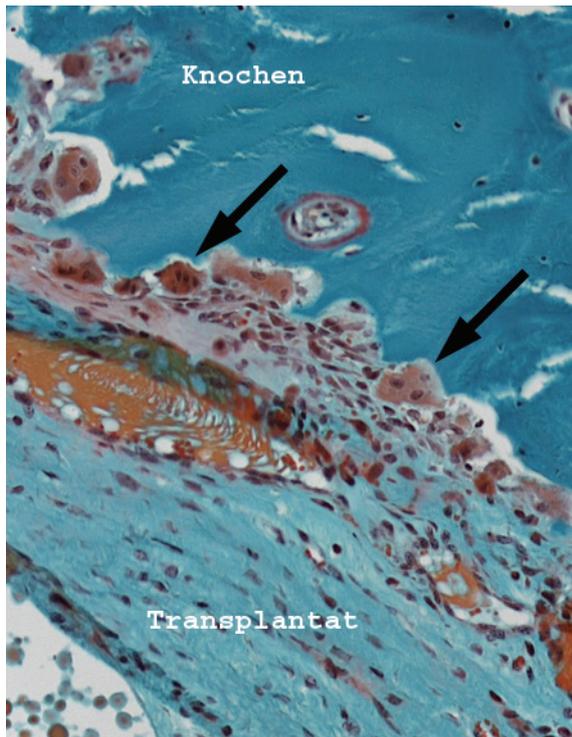


Abb. 4-41: Auch bei den allogenen 52-Wochen-Tieren kommen Osteoklasten (Pfeile) als Zeichen des aktiven Knochenumbaus vor, Schaf 9AL52H, Femur, MG, 100x

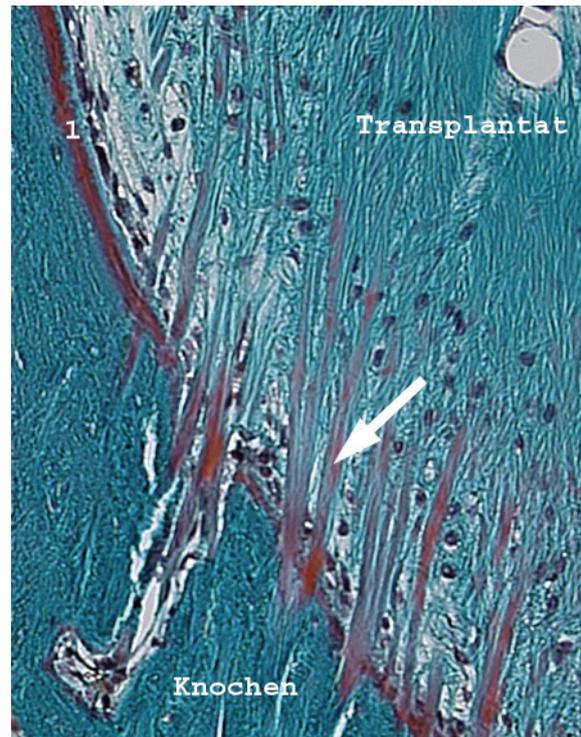


Abb. 4-42: Osteoidsäume (1) in einer indirekten Bandinsertion mittels Sharpey Fasern (Pfeil) stehen für den aktiven Knochenaufbau hier im Bereich der Tunnelmitte, 52 Wochen allogene, Schaf 9AL52H, Tibia, MG, 200x

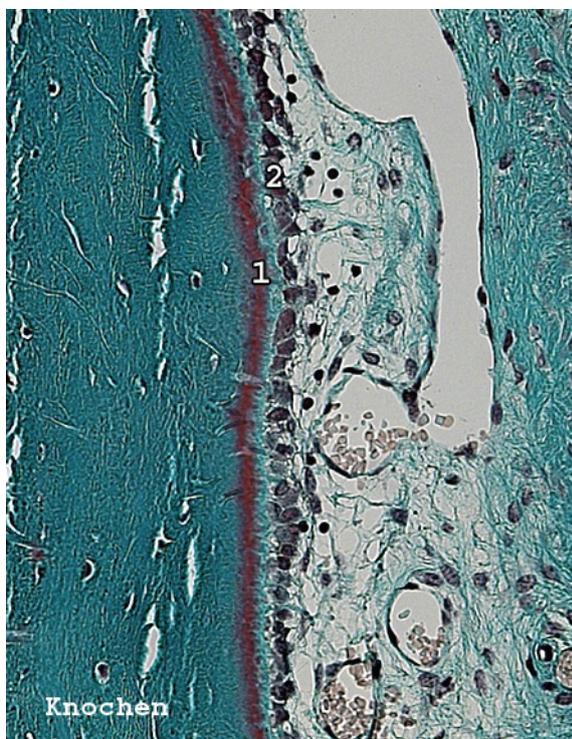


Abb. 4-43: Osteoidsäume (1) und aktive Osteoblasten (2) im Bereich des Tunnelbodens, 52 Wochen allogene, Schaf 9AL52H, Tibia, MG, 200x

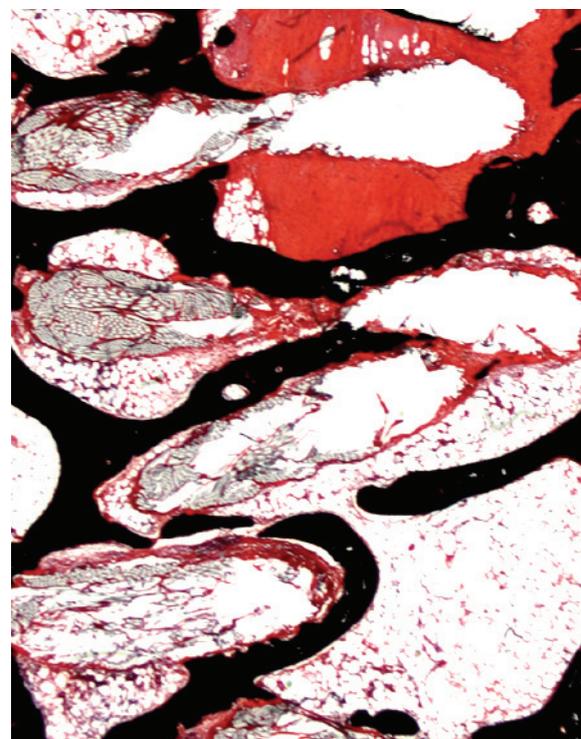


Abb. 4-44: Ein durchbauter Knochentunnel (Fadenreste gut zu erkennen) bei einem allogenen 52-Wochen-Tier, Schaf 7AL52B, Femur, SOK, 100x

4.3.3.4 Fluoreszenzauswertung

Autologe Transplantate

Bei den autologen 52-Wochen-Tieren reicherten sich die 3 Fluoreszenzmarker v.a. im oberen und mittleren Tunneleingang an. Sie drangen immer mehr in den Bereich des intraossären Transplantates vor, so dass es durch die Knochenneubildung zu einer deutlichen Verengung des Tunneleingangs kam.

Bei der Verteilung lag Calcein am stärksten vor; Xylenol hatte sich nur in Form von schmalen Banden angereichert und wurde in den Kombinationsbildern vom Calcein überlagert.

Auch in dieser Gruppe hatte sich das Tetrazyklin nur punktuell angereichert, vermehrt am Tunneleingang.

Allogene Transplantate

Auch bei den allogenen Präparaten waren die Fluoreszenzmarker am deutlichsten an Stellen der knöchernen Brückenbildung zu sehen. Calcein und Xylenol kamen nur vereinzelt vor und vermehrt tunnelfern als dem Tunnel direkt angrenzend.

Tetrazyklin lag als schmaler Saum entlang des Tunnels vor.

Vergleich autologe vs. allogene Transplantate

In beiden Gruppen kamen die Fluoreszenzmarker an den Stellen der Durchbauung des Tunnels vor. Bei den autologen Tieren herrschte das Calcein vor, während bei den allogenen Tieren alle 3 Marker nur vereinzelt dargestellt werden konnten.

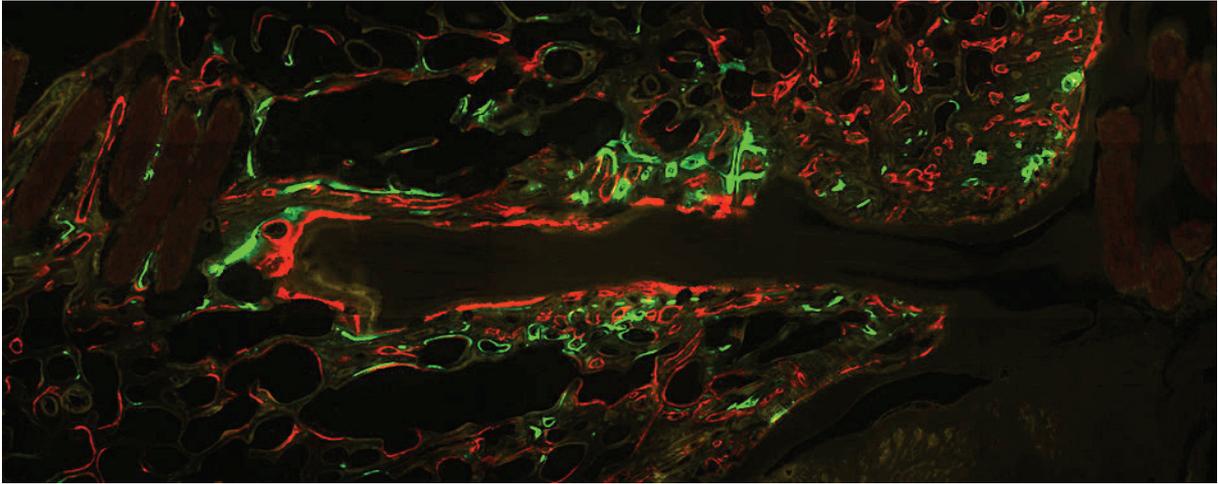


Abb. 4-45: Xylenol-orange stellt sich in diesem Präparat, in dem ein deutliches Zuwachsen des Tunnels zu erkennen ist, deutlicher als Calcein-grün dar, 52 Wochen autolog, Schaf 10AU52B, Tibia

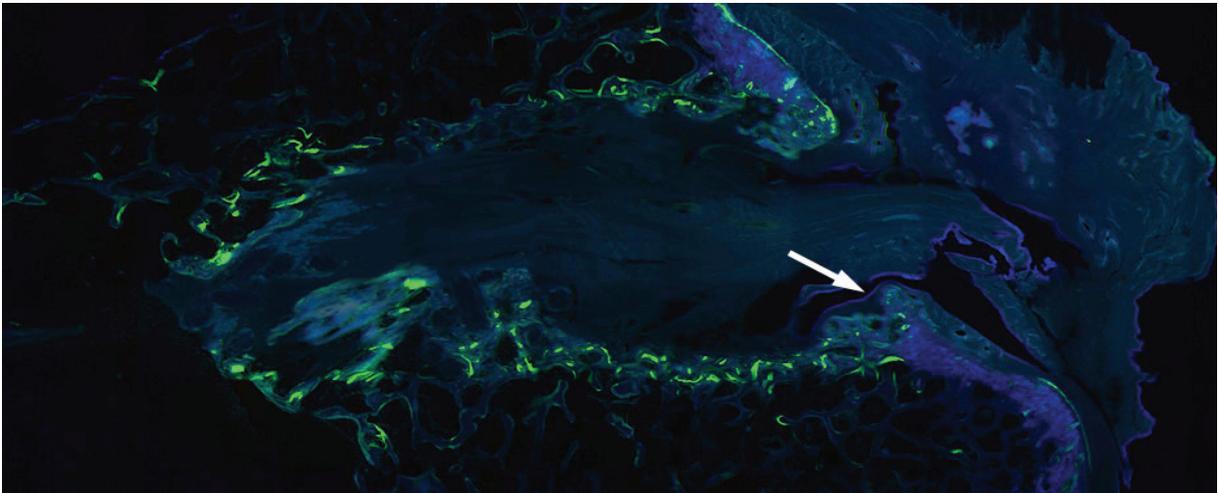


Abb. 4-46: Während Calcein-grün eine gleichmäßige punktuelle Anreicherung zeigt, liegt Tetrazyklin (Pfeil) hauptsächlich im Bereich des Tunneleingangs vor, 52 Wochen allogene, Schaf 6AL52B, Tibia

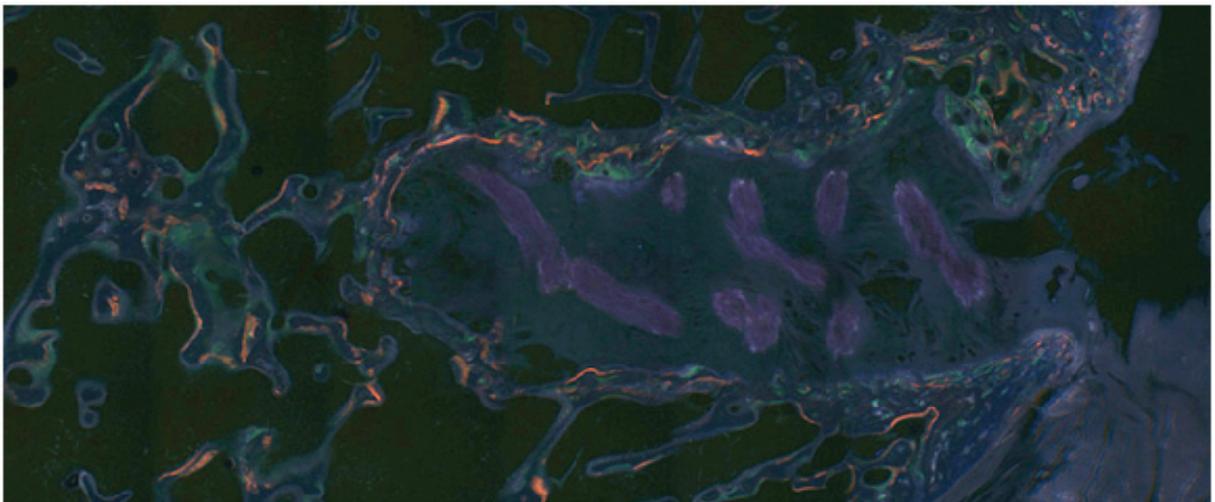


Abb. 4-47: Xylenol und Calcein stellen sich in vereinzelt Banden dar, während sich Tetrazyklin nur punktuell darstellt; deutlich zu sehen ist ein Zuwachsen des Tunneleingangs, 52 Wochen autolog, Schaf 7AU52B, Femur

4.4 Tabellarische Auswertung der direkten Bandinsertion

4.4.1 Tibiale tabellarische Auswertung

6 Wochen								
	Autolog				Allogen			
	Anterior Zug	Posterior Druck	Tunnel- mitte	Tunnel- boden	Anterior Zug	Posterior Druck	Tunnel- mitte	Tunnel- boden
0	1/7	4/7	6/7	6/7	1/7	3/7	5/7	5/7
I	-	2/7	1/7		3/7	3/7	2/7	1/7
II	5/7	1/7	-	1/7	3/7	1/7	-	1/7
III	1/7	-	-	-	-	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	-	-	-

12 Wochen								
	Autolog				Allogen			
	Anterior Zug	Posterior Druck	Tunnel- mitte	Tunnel- boden	Anterior Zug	Posterior Druck	Tunnel- mitte	Tunnel- boden
0	-	-	2/7	4/7	-	-	-	-
I	-	-	3/7	1/7	-	-	-	2/6
II	1/7	-	1/7	-	1/6	4/6	4/6	4/6
III	3/7	1/7	-	-	4/6	2/6	2/6	-
IV	3/7	6/7	1/7	2/7	1/6	-	-	-

52 Wochen								
	Autolog				Allogen			
	Anterior Zug	Posterior Druck	Tunnel- mitte	Tunnel- boden	Anterior Zug	Posterior Druck	Tunnel- mitte	Tunnel- boden
0	-	-	-	3/7	-	-	1/6	1/6
I	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	4/7	-	-	1/6	-	-
III	2/7	2/7	1/7	1/7	-	1/6	4/6	1/6
IV	5/7	5/7	2/7	3/7	6/6	4/6	1/6	4/6

Tab. 4-1: Ergebnisse der direkten Bandinsertion tibial anhand der Scores

4.4.2 Femorale tabellarische Auswertung

Aufgrund der oft schlecht beurteilbaren femoralen Präparate z.B. durch Herausreißen des Transplantates oder der allgemein schlechten Lokalisierbarkeit von Zug- oder Druckseite konnte die detaillierte Auswertung der genauen Lokalisation der direkten Bandinsertion nur tibial erfolgen. Femoral konnte nur eine Beurteilung des gesamten Präparates vorgenommen werden.

<i>Score</i>	<i>6 Wochen</i>		<i>12 Wochen</i>		<i>52 Wochen</i>	
	<i>Auto</i>	<i>Allo</i>	<i>Auto</i>	<i>Allo</i>	<i>Auto</i>	<i>Allo</i>
<i>0</i>	<i>4/5</i>	<i>4/5</i>	-	-	-	<i>1/6</i>
<i>I</i>	<i>1/5</i>	<i>1/5</i>	-	<i>1/6</i>	-	<i>1/6</i>
<i>II</i>	-	-	<i>3/6</i>	<i>4/6</i>	-	<i>2/6</i>
<i>III</i>	-	-	<i>3/6</i>	<i>1/6</i>	<i>5/6</i>	-
<i>IV</i>	-	-	-	-	<i>1/6</i>	<i>2/6</i>

Tab. 4-2: Ergebnisse der direkten Bandinsertion femoral anhand der Scores

5. Diskussion

5.1 Direkte versus indirekte Heilung

Während bezüglich der direkten Einheilung eines Knochenblock-tragenden Transplantates über den klassischen 4-Zonen-Aufbau in der Literatur Einigkeit herrscht (Kawakami et al., 2004, Tomita et al., 2001, Yoshiya et al., 2000), wurde in älteren Studien bei freien Sehnen-Transplantaten die Ausbildung einer indirekten Bandinsertion beobachtet (Rodeo et al., 1993, Rodeo und Izawa, 1999, Tomita et al., 2001, Blickenstaff et al., 1997, Jones et al., 1986, Forward und Cowan, 1963). Einige konnten in der fortgeschrittenen Heilungsphase chondroide Zellen erkennen, die auf einen möglichen Umbau zu einer direkten Bandinsertion schließen lassen könnten (Forward und Cowan, 1963, Shino et al., 1984, Yamakado et al., 2002). Dabei spricht die Existenz von Faserknorpel mit Knorpelzelltransformation nicht zwingend für eine direkte Bandinsertion; sie kann auch nur ein Hinweis für Spann- und Zugkräfte sein.

Die Arbeitsgruppe um Yamakado (2002) beschäftigte sich mit der Einwirkung der unterschiedlichen physikalischen Kräfte auf den Einheilungsprozeß eines Transplantates. Sie transplantierten den M. extensor digitorum longus in einen tibialen Knochentunnel, der senkrecht zur Knochenlängsachse angelegt wurde. Ein Vergleich zwischen der Histologie und der Stressverteilung im Tunneleingangsbereich führte zu der Schlußfolgerung, dass Zugkräfte den Heilungsprozeß der Knochen-Band-Verbindung vorantreiben, während Druckkräfte zu chondroider Zelltransformation führen. Im Gegensatz dazu haben die im restlichen Knochentunnel auftretenden Scherkräfte keinen oder nur wenig Einfluß auf den Verlauf oder die Art der Knochen-Band-Verbindung.

Auch in der vorliegenden Studie zeigte die anteriore Zugseite am Tunneleingang ein fortgeschritteneres Stadium der direkten Bandinsertion als die posteriore Druckseite. Tibial waren Tunnelmitte und Tunneltiefe ähnlich, aber in der Reife der Insertion im Vergleich zum Tunneleingang zurückgeblieben. Femoral war der Grad der Bandinsertion am Tunnelboden weiter fortgeschritten als im Bereich der Tunnelmitte und des Tunneleingangs; dabei erreichte aber auch der Bereich des Tunnelbodens nicht ein so fortgeschrittenes Stadium der direkten Bandinsertion wie der des Tunneleingangs der Tibia.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen zu den frühen Zeitpunkten kann die Verankerung mittels Endobutton sein: durch sie ist das Transplantat auf der femoralen Seite komplett von Knochen umgeben (mit Ausnahme der 1,2 mm K-Draht Austrittsstelle für die Einzugsfäden), so dass ein Zug weg vom Tunnelboden mit entsprechender Osteoklastenaktivierung zu beobachten war. Im Gegensatz hierzu wurde bei Anlage des tibialen Tunnels immer die tibiale Kortikalis mit dem Tunneldurchmesser penetriert, so dass es per-se keinen Tunnelboden gab und dadurch keine entsprechenden Zugkräfte beobachtet werden konnten. Bisherigen Studien zufolge führt die extraartikuläre Fixation freier Sehnentransplantate auch tibial zu der Ausbildung einer indirekten Bandinsertion (Weiler et al., 2002a, Schlichting, 2007). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, in der bei den autologen Transplantaten eine direkte Bandinsertion zunehmend schon nach 12 Wochen, bei den allogenen schliesslich auch nach 52 Wochen festgestellt werden konnte.

Einen quantitativen Vergleich der Knochen-Band-Heilung zwischen tibialem und femoralem Tunnel nahmen Wen et al. (2010) in einer Studie mit Kaninchen vor. Sie beurteilten qualitativ und zusätzlich mit einem modifizierten Score nach Yeh et al. (2007) die neue Knochen- und Knorpelformation und die Kollagenfaserverbindung zwischen Transplantat und Knochen. Dabei gab es jeweils 3 Kategorien: nicht vorhanden, vorhanden und signifikant vorhanden. Nach 6 und 12 Wochen war der Score der Tunnel-Band-Heilung femoral signifikant größer; zu den gleichen Zeitpunkten war auch die Zelldichte tibial signifikant geringer (spricht für ein langsames Remodeling). Die Transplantatbefestigung erfolgte bei Wen et al. (2010) durch je einen Knoten an den Transplantatenden ohne Verwendung eines Endobuttons oder einer Knochenbrücke. Vermutlich wurden so die Mikrobewegungen des Transplantates im Tunnel minimiert, so dass es femoral nicht -wie in der vorliegenden Studie- zur Tunnelaufweitung und schlechterer Tunnel-Band-Heilung am Tunneleingang (gelenknah) als am Tunnelboden kam.

Betrachtet man die Studien, die die Einheilung von Knochenblock-tragenden Transplantaten mit freien Sehnentransplantaten vergleichen, kommen diese einheitlich zu dem Schluß, dass bei den freien Sehnentransplantaten die Art der Verankerung vor allem in der ersten postoperativen Zeit einen entscheidenden Einfluß auf die Festigkeit der gesamten Plastik hat, da ihre Einheilung im Vergleich zu der über einen Knochenblock verzögert ist.

Tomita et al. (2001) verglichen die Einheilung eines Knochenblock-tragenden Patellarsehnen-transplantates mit der Einheilung einer freien doppelten Flexorsehne unter extraartikulärer Verankerung im Hundemodell. Die biomechanische Auswertung zeigte zu allen Zeitpunkten (3, 6, 12 Wochen) eine Unterlegenheit des freien Transplantates gegenüber dem Knochenblock-tragenden Patellarsehnen-transplantat; signifikant war dieser Unterschied allerdings nur nach 3 Wochen. Diese biomechanischen Ergebnisse konnten auch histologisch bestätigt werden; während das BPTB bereits nach 3 Wochen über neugebildeten Knochen eingewachsen war, erfolgte die Verankerung der Flexorsehne erst nach 12 Wochen über Sharpey Fasern als indirekte Bandinsertion an der Tunnelwand.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Park et al. (2001). Sie stellten in ihrer Studie mit Kaninchen eine verzögerte Ausbildung der normalen Knochen-Band-Verbindung bei den freien Transplantaten fest, wobei nur 4 und 8 Wochen postoperativ ein signifikanter Unterschied in der Biomechanik festzustellen war; nach 2 und 12 Wochen gab es keinen signifikanten Unterschied. So zeigen ihre Ergebnisse, dass die Einheilung einer freien Sehne zwar langsamer abläuft, es nach abgeschlossener Einheilung aber keine Unterschiede in der Biomechanik im Vergleich zu Knochenblock-tragenden Transplantaten gibt.

Eine weitere Untersuchung zum Vergleich zwischen freien und Knochenblock-tragenden Transplantaten anhand des medialen Kollateralbandes im Kaninchenmodell nahmen Kawakami et al. (2004) vor. Während tibial beide Transplantattypen über eine Schraube verankert wurden, wurde die gleiche Art der Verankerung femoral nur beim Knochenblock gewählt. Im Gegensatz dazu befestigten sie das freie Sehnen-transplantat femoral über einen Endobutton. Obwohl das Knochenblock-tragende Transplantat nach 8 Wochen komplett knöchern integriert war und das freie Sehnen-transplantat nur eine feste Verbindung durch gereiftes Granulationsgewebe zeigte, waren beide Transplantate in der frühen postoperativen Phase biomechanisch vergleichbar. Somit führt auch die extraartikuläre Verankerung zu einer stabilen Bandinsertion.

Analog der Studien von Rodeo et al. (1993) und Weiler et al. (2002a), die die frühe Ausbildung einer fibrösen Zwischenzone (FIZ) zur Verankerung des Transplantates in der Tunneltiefe beobachteten, und erst im weiteren Heilungsverlauf die Ausbildung einer direkten Bandinsertion gelenknah feststellten, konnten wir in der vorliegenden Untersuchung sowohl für das autologe als auch allogene freie Sehnen-transplantat einen ähnlichen Zeitverlauf

analysieren. Während Rodeo et al. (1993) durch die Wahl ihrer Untersuchungszeitpunkte die ersten Sharpey-like-fibers (SLF) nach 4 Wochen beobachteten, konnte die Arbeitsgruppe um Weiler et al. (2002a) die ersten SLF nach 6 Wochen in Gebieten mit vermehrter physikalischer Belastung wie dem Tunneleingang oder an Stellen, wo kein direkter Kontakt mit dem umgebenden Knochen vorhanden war, feststellen.

Beide Arbeitsgruppen konnten nach 12 Wochen eine kontinuierliche Knochen-Band-Verbindung über SLF sehen. In der vorliegenden Studie stellten sich die ersten SLF nach 6 Wochen dar.

Desweiteren zeigte die Arbeitsgruppe um Weiler et al. (2002a), dass freie Sehnen-Transplantate bei anatomischer Fixation mittels biodegradierbarer Interferenzschrauben über eine direkte Bandinsertion einheilen können. Dabei war die FIZ vermutlich durch den direkten Kontakt zwischen Sehne und Knochen nur teilweise ausgebildet und durch die Neutralisation der Band-Tunnel-Bewegungen konnte die Ausbildung der direkten Bandinsertion schon nach 24 Wochen beobachtet werden.

Auch die Studie von Bedi et al. (2009), die nach einer unilateralen Rekonstruktion des VKBs an Ratten einen Vergleich zwischen der Einheilung des Transplantates im intraartikulären, mittleren und extraartikulären Tunnelabschnitt untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass die Knochen-Band-Heilung im extraartikulären Abschnitt eine fortgeschrittenere Organisation des Knochen-Band-Zwischenraumes mit einer vermehrten Knochenneubildung und Mineralisierung und einer kleineren Osteoklastenzahl aufweist. Sie führten dies auf die Mikrobewegungen des Transplantates im Tunnel bei extraartikulärer Fixation zurück.

Die Hypothese der oben genannten Arbeitsgruppen, dass eine nicht-anatomische, indirekte Verankerung des Transplantates durch die vermehrten Scherkräfte zu einer indirekten Bandinsertion führen würden, konnte in der vorliegenden Studie widerlegt werden. Hier konnte auch bei nicht-anatomischer indirekter extrakortikaler Verankerung über einen Endobutton und eine Knochenbrücke die Ausbildung einer direkten Bandinsertion auf Gelenkniveau beobachtet werden; sie begann in den autologen Rekonstruktionen nach 12 Wochen vor allem auf Gelenkniveau. Nach 52 Wochen war sie in beiden Studiengruppen bei allen Tieren abgeschlossen und sichtbar. Eine mögliche Erklärung liegt in der bereits wenige Tage nach der Operation einsetzenden Belastung des operierten Beines der Tiere. Sie erhielten zwar einen Wundverband, waren dadurch aber nicht in ihrer Bewegung eingeschränkt. In wieweit zeitliche Unterschiede in der Ausbildung einer direkten Neoinsertion auf Gelenkniveau in Abhängigkeit des Verankerungsverfahrens möglich sind,

konnte durch die vorliegende Studie nicht geklärt werden, da keine Vergleichsgruppe mit direkter anatomischer Transplantatverankerung existierte.

Somit bleibt zwar die These bestehen, dass eine direkte Bandinsertion als Folge der mechanischen Belastungssituation auftritt, sie ist aber nicht abhängig von einer Kompression des Transplantates am Kochentunnel.

Die vorliegende Studie ergab nach 1 Jahr die Ausbildung einer reifen direkten Bandinsertion zwischen Transplantat und Knochen auf Gelenkniveau. Das Versagen der Transplantate nach der biomechanischen Testung kam zu diesem Zeitpunkt durch ein intraligamentäres Zerreißen zustande.

5.2 Autologe versus allogene Transplantate

Die Verwendung allogener Transplantate stellt vor allem in der Revisionschirurgie und bei multiplen Bandverletzungen eine Alternative zum autologen Bandersatz dar. Dabei gibt es nur wenig tierexperimentelle Studien zu freien Sehnentransplantaten und keine Studie, die für diese Transplantatart histologisch die Knochen-Band-Heilung untersucht hat. Durch Unterschiede in der Wahl der Tierart, der Art der Transplantate und ihrer Verankerungen, den unterschiedlichen Standzeiten und Probenaufbereitungen sind direkte Vergleiche der tierexperimentellen Studien kritisch zu beurteilen. Auch im klinischen Bereich gibt es fast nur Studien, die Knochenblock-tragende Transplantate vergleichen. Umso wichtiger sind Untersuchungen der freien Sehnentransplantate, da bei der primären Rekonstruktion mit Spendersehnen heute hauptsächlich Transplantate ohne Knochenblock (Hamstringsehnen, Tibialis anterior, Pes anserinus-Sehnen) Verwendung finden.

Neuere tierexperimentelle Studien kommen einheitlich zu dem Ergebnis, dass die Inkorporation und das Remodeling bei den Knochenblock-tragenden Allografts langsamer verlaufen als bei autologen Vergleichsgruppen.

So verglich eine Studie von Jackson et al. (1993) frisch-gefrorene allogene mit autologen Patellarsehnentransplantaten von Ziegen. Neben einer langsameren biologischen Inkorporation, einer verlängerten Entzündungsreaktion und schlechteren strukturellen Eigenschaften untersuchten sie auch elektronenmikroskopisch den Durchmesser der Kollagenfibrillen. Dabei zeigten die allogenen Transplantate eine längere Persistenz von Kollagenfibrillen mit dickerem Durchmesser, so dass von einem verzögerten Remodeling

gesprochen werden konnte. Nach 6 Monaten stellten sie keinen Unterschied bezüglich der Zellularität, der Zellmorphologie und der Einheilung der Knochenblöcke im Tunnel fest. Eine Analyse der Knochen-Sehnen-Einheilung und des im ossären Tunnel befindlichen Transplantatanteils wurde nicht durchgeführt.

Eine weitere Untersuchung an Ziegen -allerdings unter Verwendung allogener Knochenblock-tragender Patellarsehnentransplantate- führten Harris et al. (2002) durch. Nach 18 Wochen beobachteten sie im intraossären Anteil des Transplantates eine Revaskularisation und Repopulation besonders peripher mit normaler longitudinaler Kollagenausrichtung und dichtem zellulärem Bindegewebe im Knochen-Band-Zwischenraum. Die Tunnelwand zeigte aktives Remodeling mit Osteoklastenresorption und Knochenneubildung. Nach 36 Wochen waren Heilung, Remodeling, Integration und Reifung des allogenen Knochenblock-tragenden Transplantates beendet und es war durch dichtes Bindegewebe mit dem Tunnel verbunden. Ein Vergleich zu autologen Sehnen wurde in dieser Studie nicht durchgeführt.

Analog der Studie von Harris et al. (2002) konnten in der vorliegenden Studie sowohl bei den autologen als auch bei den allogenen Gruppen ähnliche Umbauprozesse des intraossären Transplantates beobachtet werden. Bezüglich des Zeitpunktes der Ausbildung einer reifen Bandinsertion der freien Sehnenentransplantate kann in der vorliegenden Studie nur spekuliert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die allogenen Transplantate in unserer Studie nach 12 Wochen noch keine reife, aber nach 52 Wochen eine komplette direkte Bandinsertion zeigten, belegt, dass eine entsprechende Entwicklung zwischen diesen Zeitpunkten stattgefunden haben muss. Ob diese vor oder nach den 36 Wochen der Ausbildung der Neoinsertion der Patellarsehnentransplantate der Studie von Harris et al. (2002) erfolgt ist, kann nicht eindeutig geklärt werden.

Auch eine Studie von Arnoczky et al. (1986) kam unter Verwendung von allogenen Patellarsehnen an Hunden histologisch zu dem Ergebnis, dass die Einheilung eines Allografts langsamer verläuft. Wie auch bei der Studie von Harris et al. (2002) existierte hier jedoch keine autologe Vergleichsgruppe, sondern es wurde lediglich anhand existierender Untersuchungen von autologen Kreuzbandrekonstruktionen am Tiermodell argumentiert. Die zentrale Transplantatnekrose dauerte bei der Studie von Harris et al. (2002) bis zur 8. postoperativen Woche und die Gefäßinvasion und Zellrepopulation erreichte erst nach 3-4 Monaten ihren Höhepunkt. Die frisch-gefrorenen Transplantate hatten nach 1 Jahr ähnliche

Eigenschaften wie ein normales VKB. Durch den Vergleich von frischen mit frisch-gefrorenen Transplantaten konnten sie außerdem bei den frischen Allografts eine Lymphozyten-Invasion und Entzündung nachweisen, so dass die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass die Verwendung von frischen Allografts nicht empfohlen werden kann. Somit wird die Wahl der frisch-gefrorenen Transplantate in der vorliegenden Untersuchung gerechtfertigt.

Allen vorangegangenen Studien ist jedoch ein entscheidender Nachteil gemeinsam: es wurden im Hinblick auf die Knochen-Band-Einheilung nicht direkt autologe mit allogenen Rekonstruktionen des VKB verglichen. In der vorliegenden Studie wurde festgestellt, dass analog den Beobachtungen, dass der biologische Umbau des intraartikulären Anteils des allogenen Transplantates verzögert abläuft, dies ebenfalls Gültigkeit für das ossäre Einwachsen der Allografts hat. Es konnte sowohl für die Ausbildung einer Neoinsertion als auch für die Knochenneubildung am Knochen-Sehnen-Zwischenraum eine zeitliche Verzögerung der Allografts beobachtet werden.

Einige der wenigen Studien, die tatsächlich den intraartikulären Umbau von Auto- und Allografts in einer Tierstudie verglichen haben, sind die Studien von Kirkpatrick et al. (1996) und Thorson et al. (1989), die ebenfalls ein schlechteres Abschneiden der allogenen Transplantate erkannten. Beide wählten als Versuchstier den Hund.

Kirkpatrick et al. (1996) stellten neben einer verzögerten intraartikulären Revaskularisierung und Repopulation der Zellen eine biomechanische Unterlegenheit des allogenen Transplantates auch nach 2 Jahren fest; die funktionelle Stabilität war nach 2 Jahren adäquat.

Thorson et al. (1989) verglichen freie autologe Iliotibialis-Transplantate mit gefrorenen allogenen Patellarsehnentransplantaten. Hinsichtlich Klinik und Röntgen gab es keine Unterschiede. Vier Monate postoperativ zeigten die allogenen Transplantate aber eine erhöhte Entzündungsreaktion und einen verminderten Hydroxyprolin-Umsatz. Aufgrund einer Leukozytenanreicherung in der Synovialflüssigkeit, Knorpelschäden, einer verminderten Transplantatstärke und einer verminderten metabolischen Aktivität konnten sie die Verwendung allogener Transplantate nicht empfehlen.

Die vorliegende Studie hat in weiteren Untersuchungen den intraartikulären Umbau von Auto- und Allografts verglichen. Die Revaskularisierung der Allografts zeigte eine deutliche Verzögerung, vor allem in den ersten 3 Monaten postoperativ. Nach Ablauf eines Jahres war die Gefäßdichte der Allografts weiterhin erhöht, während die autologen Transplantate eine

Vaskularität vergleichbar mit dem nativen vorderen Kreuzband aufwiesen (Scheffler et al., 2008). Die Untersuchung des extrazellulären Transplantatumbaues zeigte ebenfalls eine deutliche Verzögerung in den ersten 3 Monaten bei den Allografts. Nach Ablauf eines Jahres verschwanden jedoch die histologischen Unterschiede (Dustmann et al., 2008).

Interessant ist, dass der Einsatz von Spendersehnen offensichtlich nicht nur die biologischen Umbauprozesse des intraartikulären Transplantates, sondern auch die knöcherne Einheilung verzögert. Hierbei scheinen die Umbauvorgänge parallel abzulaufen mit einer ähnlichen zeitlichen Verzögerung, und dem Verschwinden der Unterschiede nach 1 Jahr. Diese Beobachtung ist vor allem von Bedeutung, wenn Überlegungen angestrengt werden, wie und vor allem wo eine biologische Optimierung der Spendersehnen Sinn macht beim Einsatz als Transplantat in der vorderen Kreuzbandchirurgie.

Im Gegensatz zu den histologischen Studien, die zu ähnlichen Ergebnissen bei der Untersuchung von allogenen Kreuzbandersatz kommen, gibt es beim Vergleich der Ergebnisse klinischer Studien deutliche Unterschiede, obwohl fast ausschließlich Patellarsehnentransplantate untersucht wurden, die über eine Knochen-Knochen-Heilung integriert werden.

Eine umfangreiche Studie führten Poehling et al. (2005) durch; sie ersetzten bei 118 Patienten das VKB durch ein BPTB-Autograft und 41 Patienten erhielten ein allogenes Achillessehnen-transplantat. Die Vergleiche erfolgten anhand von subjektiven und objektiven Nachuntersuchungsskalen. In der frühen postoperativen Phase lagen die Vorteile bei den allogenen Transplantaten. Neben weniger postoperativen Schmerzen war die funktionelle Einschränkung geringer. Die Messung am KT-1000-Kniearthrometer ergab dagegen eine größere Laxizität bei den allogenen Transplantaten. Die Langzeitbeurteilung nach 5 Jahren zeigte hinsichtlich der Stabilität und Funktion ähnliche Ergebnisse.

Aufgrund der unterschiedlichen Transplantattypen und -befestigungen ist diese Studie sehr kritisch zu beurteilen; eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die vorliegende Studie ist schwierig, da hier auch bei den allogenen Tieren die Flexorsehne entnommen wurde.

Eine retrospektive Studie nahmen Siebold et al. (2002) vor. Es wurde entweder das Patellarsehnentransplantat mit 2 Knochenblöcken oder die Achillessehne mit 1 Knochenblock verwendet und sowohl Primär- als auch Revisionseingriffe beurteilt. Es kam weder peri- noch postoperativ zu spezifischen Komplikationen durch das allogene Material und es erfolgte eine

Nachuntersuchung über mindestens 24 Monate. Die Ergebnisse waren bei beiden Transplantattypen zufrieden stellend. Einzig die Versagerraten, die bei den Primäreingriffen bei 13,7 % und bei den Revisionseingriffen bei 15% lagen, und im Vergleich zu den publizierten Rerupturraten von Autografts deutlich erhöht waren, geben Anlaß zur negativen Beurteilung. Eine mögliche Begründung sind subklinisch ablaufende Abstoßungsreaktionen.

Ähnliche Ergebnisse wie auch die tierexperimentellen Studien lieferte die klinisch-histologische Studie von Gorschewsky et al. (2005) beim Menschen. Es wurden γ -bestrahlte allogene Patellarsehnentransplantate verwendet. Neben einer wesentlich höheren Rerupturrate zeigten die allogenen Transplantate eine größere Laxizität. Dafür war bei den autologen eine deutliche Entnahmemorbidität festzustellen. Proben zur histologischen Untersuchung wurden von Revisionspatienten gewonnen. Diese zeigten neben einer verzögerten Einheilung und einem verlängerten Umbauvorgang eine länger bestehende Hyperzellularität und Hypervaskularität. Außerdem war das Kollagengerüst auch nach 1 Jahr noch nicht deutlich longitudinal ausgerichtet. Berücksichtigt werden muß hierbei der negative Einfluß der γ -Strahlen auf das Sehngewebe. In einer weiteren Untersuchung des Patientenkollektivs mit längerem Nachuntersuchungszeitraum musste eine deutlich höhere Rerupturrate, vor allem in der Gruppe mit höherem Belastungsniveau, beobachtet werden, so dass geschlussfolgert wurde, dass Allografts bei Patienten mit hohem Belastungsanspruch nur zurückhaltend eingesetzt werden sollten.

Diese klinischen Beobachtungen könnten durch die Ergebnisse unserer Studie erklärbar sein. Sollte eine frühe Belastung auf hohem Niveau angestrebt werden zu einem Zeitpunkt, an dem die Einheilung und der Umbau des Transplantates noch nicht abgeschlossen sind, wäre eine Auslockerung des allogenen Transplantates denkbar.

Letztendlich hat sich die Hypothese der vorliegenden Studie, dass allogene Transplantate eine verzögerte knöcherne Einheilung im Vergleich zu körpereigenen Sehnen ausweisen, bestätigt.

5.3 Methodenkritik

Die Übertragbarkeit von tierexperimentellen Studien auf den Menschen ist nicht unmittelbar möglich. Aufgrund funktioneller und anatomischer Ähnlichkeiten, der guten Verfügbarkeit und der ausreichenden Größe ist das Schaf zwar in der experimentellen Kreuzbandchirurgie bewährt, die direkte Übertragbarkeit auf den Menschen ist aber wegen der unterschiedlichen Belastung des Vierfußgängers Schaf und des Zweifußgängers Mensch nicht gegeben.

Neben der fehlenden Einschränkung der Bewegung postoperativ und der daraus folgenden sofortigen Belastung des Transplantates konnte keine angepasste Rehabilitation erfolgen. Weiterhin ist bekannt, dass die biologischen Reaktionen und der Stoffwechsel bei Tieren schneller ablaufen, so dass sowohl Wundheilung als auch Remodeling möglicherweise positiv beeinflusst werden könnten. Aufgrund der gleichen Kriterien bei der Tierauswahl, gleichen postoperativen Einflußgrößen für alle Standzeiten und Transplantatgruppen ist dennoch ein guter Vergleich zwischen den Gruppen und deren Beurteilung im Zeitverlauf möglich.

Ein weiterer Kritikpunkt sind die 5 Tierverluste dieser Studie. Dabei hätte bei den Tieren mit Wund- und folgender Gelenkinfektion bzw. mit der Arthrofibrose eine frühzeitige Gelenkpunktion mit Anfertigen einer Zytologie und Bakteriologie (mit anschließendem Antibiogramm) durch gezieltere Behandlung eventuell die Tierverluste vermeiden können.

Bezüglich der histologischen Auswertung könnten in weiteren Arbeiten bezüglich der Knochen-Band-Heilung in der vorderen Kreuzbandchirurgie zusätzliche Untersuchungen vorgenommen werden. Zum einen würde eine Typisierung von Kollagen eine quantitative Differenzierung der direkten und indirekten Bandinsertion möglich machen. Eine Studie hierzu wurde von Petersen und Laprell (2000) durchgeführt: um die Art des Kollagens in den unterschiedlichen Bandinsertionen zu differenzieren, untersuchten sie bei Menschen Biopsien von Patellarsehnen- bzw. Hamstringtransplantaten unter extraartikulärer Befestigung. Dabei zeigte sich, dass in indirekten Bandinsertionen vermehrt Kollagen I und III auftritt, während bei der Befestigung der Patellarsehne mit Schrauben und der daraus folgenden direkten Bandinsertion hauptsächlich Kollagen II vorkommt. Somit wäre nicht nur eine qualitative Beurteilung der Knochen-Band-Heilung -wie in der vorliegenden Studie- möglich, sondern auch eine quantitative.

Ein zweiter Verbesserungsvorschlag ergibt sich aus einer neueren Studie von Lui et al. (2010). Sie entwickelten und validierten einen Score (TBTH: Tendon-bone tunnel healing) zur quantitativen Beurteilung der Knochen-Band-Heilung. Dabei wurde das Transplantat (Degeneration und Remodeling), der Prozentsatz des Bindegewebes und die Verbindung zum

Knochen mit einer Skala von 0-4 (bzw. 5) beurteilt. Weiterhin wurden als Kriterien die Kollagenfaserorganisation im Transplantat, die Organisation des Bindegewebes, das Auftreten von Chondrozyten-ähnlichen Zellen, proteoglycanreiche Matrix und die Vaskularität und Zellularität des Transplantates herangezogen. An der Komplexität und der Anzahl der genannten Kriterien kann man erkennen, dass die quantitative Beurteilung sehr schwierig ist. Somit stellt sich die Frage, ob die Verwendung dieses Scores zu stark abweichenden Ergebnissen im Vergleich zu der qualitativen Beurteilung in der vorliegenden Studie führen würde. Weiterhin wurde bei Lui et al. (2010) keine Bewertung des Grades der Bandinsertion vorgenommen; diese spielte in der vorliegenden Studie aber eine wichtige Rolle.

5.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie zum Vergleich von autologem zu allogenen Bandersatz in der vorderen Kreuzbandchirurgie im Tierversuch ergab eine verzögerte Einheilung des allogenen Transplantates im Hinblick auf das Transplantatremodeling und der ossären Integration. Erst nach 1 Jahr waren die histologischen Ergebnisse der Allografts mit denen der Autografts vergleichbar. Somit sollte bei der klinischen Anwendung von Allografts eine vorsichtiger Rehabilitation mit langsamerer Belastungssteigerung im Vergleich zu Autografts erfolgen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen, dass allogene Transplantate nicht die autologen als Standard zum Ersatz der vorderen Kreuzbandes ablösen sollten; sie stellen jedoch –mit dem richtigen Management hinsichtlich der Rehabilitation- eine gute Alternative vor allem bei multiplen Bandverletzungen bzw. in der Revisionschirurgie dar.

Dass auch freie Sehnen transplantate bei extrakortikaler Verankerung über eine direkte Bandinsertion einheilen können, wurde ebenfalls in der vorliegenden Studie bestätigt. Bereits nach 12 Wochen konnte der klassische Vier-Zonen-Aufbau zwischen Transplantat und Knochen auf Gelenkniveau festgestellt werden. Nach 52 Wochen verband bei allen Transplantaten und in allen Tunnelabschnitten eine direkte Bandinsertion das Transplantat mit dem Knochen. Somit kann eine extrakortikale Verankerung von freien Transplantaten auch in der klinischen Anwendung empfohlen werden, auch hier sollte aber die Rehabilitation nicht zu schnell erfolgen.

6. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde erstmalig die ossäre Einheilung, das intraossäre Transplantatremodeling und der Knochenumbau zwischen autologen und allogenen freien frisch-gefrorenen Sehnentransplantaten bei gelenkferner Transplantatverankerung am Schafmodell untersucht.

Dabei gingen 54 weibliche Merino-Mix-Schafe mit einem Alter von 2-3 Jahren in die Studie ein. Ihnen wurde die Sehne des M. flexor digitalis entnommen und in der gleichen Operation als Kreuzbandersatz eingesetzt oder bei -80°C mindestens 1 Woche tiefgekühlt und dann dem nächsten Tier als Allograft eingesetzt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen (autolog/ allogene) mit jeweils drei Standzeiten (6/ 12/ 52 Wochen) eingeteilt. Zur besseren Beurteilung des Knochenbaus wurde zusätzlich an drei Zeitpunkten eine Markierung mit drei verschiedenen Fluoreszenzmarkern (Calcein-grün, Xylenol-orange und Tetrazyklin) durchgeführt. Nach der Tötung wurden die Präparate histologisch aufgearbeitet und nach Durchführung von drei verschiedenen Färbungen (Masson-Goldner-Trichrom, Safranin-O/ von Kossa, Alcian-Blau) quantitativ unter einem Durchlichtmikroskop- zum Teil unter Zuhilfenahme eines Polarisationsfilters- ausgewertet. Um die Ergebnisse der deskriptiven Auswertung besser vergleichen zu können, wurde bei der Beurteilung des Grades der direkten Bandinsertion der semiquantitative Score nach Unterhauser et al. (2006). Es konnte festgestellt werden, dass eine gelenkferne, indirekte Transplantatverankerung die Ausbildung einer gelenknahen Neoinsertion nach 52 Wochen erlaubt, welches in der aktuellen Literatur bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Die ossäre Einheilung und der intraossäre Umbau von freien körperfremden Spendersehnen, sog. Allografts, lief im Vergleich zu den körpereigenen Transplantaten deutlich verzögert ab. Bei den Tieren mit autologem Bandersatz konnten bereits 6 Wochen nach der Operation erste Anzeichen der Entwicklung einer direkten Bandinsertion am tibialen Tunneleingang beobachtet werden. Dabei zeigte sich an der anterioren Zugseite ein fortgeschritteneres Stadium (Grad II) als an der posterioren Druckseite (Grad I). Bei den allogenen Tieren lagen nur vereinzelt chondroide Zellen vor. Die Beurteilung des Knochen- und Bandumbaus ergab, dass die Strukturveränderungen im Transplantat und seine Integration bei den autologen Präparaten weiter fortgeschritten war.

Nach 12 Wochen war bei den autologen Tieren vor allem am tibialen Tunneleingang bereits ein klassischer Vierzonenaufbau der direkten Bandinsertion zu erkennen. In den anderen

Tunnelabschnitten gab es alle Stadien der direkten Bandinsertion. Auch bei den allogenen Tieren zeigte sich nach 12 Wochen eine reife direkte Bandinsertion, allerdings in geringerem Ausmaß als bei den autologen Tieren.

52 Wochen nach der Operation inserierte in allen Präparaten der autologen und allogenen Gruppen ein Neoligament über eine reife direkte Bandinsertion am Knochen, deren histologisches Erscheinungsbild keinen Unterschied zum nativen Kreuzband erkennen ließ.

Die schon bekannte Verzögerung des intraartikulären Bandumbaus muss jetzt zusätzlich durch die Kenntnis der Verzögerung des Transplantateinbaus ergänzt werden. Diese Ergebnisse sind von Bedeutung für die Entwicklung von Optimierungen beim Einsatz von Allografts als Transplantat in der vorderen Kreuzbandchirurgie.

7. Summary

Comparison of Tendon-to-Bone-Healing after soft-tissue autograft and allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model

This study compared for the first time the osseous healing, the intraosseous remodeling and the bone remodeling between soft tissue autografts and fresh-frozen allografts with extracortical fixation in a sheep model.

Altogether 54 female Merino-Mix sheep, aged 2-3 years, were included in the study. In these animals the tendons of M. flexor digitalis were removed and inserted during the same operation as cruciate ligament substitute, or they were kept for at least one week at a temperature of -80°C and were then inserted in another animal as allografts. The experimental animals were divided into 2 groups (autologous/allogeneic), each of them with 3 different periods of observation (6, 12 or 52 weeks, resp.). In order to improve the judgement on bone-remodeling 3 fluorescence markers (calcein-green, xylenol-orange and tetracycline) were applied additionally at 3 different times. After killing the sheep microscopic sections were stained, using Masson-Goldner-trichrome, safranin-O ad modum Kossa or alcian blue, respectively. The quantitative microscopic examination of the preparations was done partly by the help of a polarization microscope. To compare the results of descriptive statistics the grade of direct ligament insertion was determined by the semiquantitative score according to Unterhauser et al. (2006).

It was shown that extracortical indirect fixation of the soft tissue graft facilitates an anatomical neoinsertion after 52 weeks. In the literature this was unmentioned till date.

Osseous tendon-to-bone-healing as well as intraosseous remodeling of soft tissue grafts from human donors, so-called allografts, require more time than autologous grafts. In the autograft group first signs of the development of a direct ligament insertion at the tibial tunnel entrance were seen after 6 weeks already. Remodeling activity at the anterior tibial tunnel aperture site (tensile site) (grade II) was more pronounced than at the posterior site (grade I). In allografts only a few chondroid cells were seen. Bone-incorporation and ligament remodeling of autografts were more advanced than in allografts.

A typical direct ligament insertion was already found in autologous reconstructions after 12 weeks, especially at the tibial tunnel entrance. All maturity levels of a direct ligament insertion were found along the other tunnel sections. Indications of a mature direct ligament insertion could also be observed after 12 weeks, but overall maturity was less in allo- compared to autologous animals.

A neoligament inserted with a mature direct ligament insertion at the bone 52 weeks after reconstruction in all auto- and allograft reconstructions. In comparison to the native cruciate ligament no histological differences could be found.

This study focused on the bony incorporation and development of neoinsertion of an ACL graft. More studies are needed to assess the intraarticular healing of auto- and allografts, which ensues parallel to the bony incorporation of the grafts. These results will provide a complete overview of the differences of auto- and allograft in ACL reconstruction and help to design optimal rehabilitation schemes to address the differences and eventually motivate future studies to compensate for possible disadvantages of either type of graft.

8. Literaturverzeichnis

- Aglietti, P., Buzzi, R., D'Andria, S. & Zaccherotti, G. 1993. Patellofemoral problems after intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop*, 195-204.
- Allen, M. J., Houlton, J. E., Adams, S. B. & Rushton, N. 1998. The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg*, 27, 596-605.
- Alm, A. & Strömberg, B. 1974. Vascular anatomy of the patellar and cruciate ligaments. A microangiographic and histologic investigation in the dog. *Acta Chir Scand Suppl*, 445, 25-35.
- Amiel, D., Frank, C., Harwood, F., Fronek, J. & Akeson, W. 1984. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res*, 1, 257-65.
- Amiel, D., Kleiner, J. B. & Akeson, W. H. 1986a. The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin. *Am J Sports Med*, 14, 449-62.
- Amiel, D., Kleiner, J. B., Roux, R. D., Harwood, F. L. & Akeson, W. H. 1986b. The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res*, 4, 162-72.
- Andersson, C., Odensten, M. & Gillquist, J. 1991. Knee function after surgical or nonsurgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament: a randomized study with a long-term follow-up period. *Clin Orthop*, 255-63.
- Arnoczky, S. P. 1983. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*, 19-25.
- Arnoczky, S. P., Tarvin, G. B. & Marshall, J. L. 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. P., Warren, R. F. & Ashlock, M. A. 1986. Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft. An experimental study. *J Bone Joint Surg Am*, 68, 376-85.

- Bach, B. R., Jr., Levy, M. E., Bojchuk, J., Tradonsky, S., Bush-Joseph, C. A. & Khan, N. H. 1998. Single-incision endoscopic anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Minimum two-year follow-up evaluation. *Am J Sports Med*, 26, 30-40.
- Becker, W. 1971. Electronmicroscopic studies of tendon insertion into bones. *Arch Orthop Unfallchir*, 69, 315-29.
- Bedi, A., Kawamura, S., Ying, L. & Rodeo, S. A. 2009. Differences in tendon graft healing between the intra-articular and extra-articular ends of a bone tunnel. *HSS J*, 5, 51-7.
- Benjamin, M., Evans, E. J. & Copp, L. 1986. The histology of tendon attachments to bone in man. *J Anat*, 149, 89-100.
- Blickenstaff, K. R., Grana, W. A. & Egle, D. 1997. Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model. *American Journal of Sports Medicine*, 25, 554-9.
- Bonamo, J. J., Krinick, R. M. & Sporn, A. A. 1984. Rupture of the patellar ligament after use of its central third for anterior cruciate reconstruction. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am*, 66, 1294-7.
- Bonatus, T. J. & Alexander, A. H. 1991. Patellar fracture and avulsion of the patellar ligament complicating arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Orthop Rev*, 20, 770-4.
- Bosch, U. & Kasperczyk, W. J. 1993. The healing process after cruciate ligament repair in the sheep model. *Orthopäde*, 22, 366-71.
- Bradley, J. P., Klimkiewicz, J. J., Rytel, M. J. & Powell, J. W. 2002. Anterior cruciate ligament injuries in the National Football League: epidemiology and current treatment trends among team physicians. *Arthroscopy*, 18, 502-9.
- Buck, B. E., Malinin, T. I. & Brown, M. D. 1989. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop Relat Res*, 129-36.

- Christen, B. & Jakob, R. P. 1992. Fractures associated with patellar ligament grafts in cruciate ligament surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 74, 617-619.
- Claes, L. E., Ludwig, J., Margevicius, K. J. & Durselen, L. 1995. Biological response to ligament wear particles. *J Appl Biomater*, 6, 35-41.
- Clark, J. M. & Sidles, J. A. 1990. The interrelation of fiber bundles in the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*, 8, 180-8.
- Cole, D. W., Ginn, T. A., Chen, G. J., Smith, B. P., Curl, W. W., Martin, D. F. & Poehling, G. G. 2005. Cost comparison of anterior cruciate ligament reconstruction: autograft versus allograft. *Arthroscopy*, 21, 786-90.
- Colombet, P., Robinson, J., Christel, P., Franceschi, J. P., Djian, P., Bellier, G. & Sbihi, A. 2006. Morphology of anterior cruciate ligament attachments for anatomic reconstruction: a cadaveric dissection and radiographic study. *Arthroscopy*, 22, 984-92.
- Cooper, R. R. & Misol, S. 1970. Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am*, 52, 1-20.
- Corry, I. S., Webb, J. M., Clingeleffer, A. J. & Pinczewski, L. A. 1999. Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. A comparison of patellar tendon autograft and four-strand hamstring tendon autograft. *American Journal of Sports Medicine*, 27, 444-54.
- Dandy, D. J. & Gray, A. J. 1994. Anterior cruciate ligament reconstruction with the Leeds-Keio prosthesis plus extra-articular tenodesis. Results after six years. *J Bone Joint Surg Br*, 76, 193-7.
- Dodds, J. A. & Arnoczky, S. P. 1994. Anatomy of the anterior cruciate ligament: a blueprint for repair and reconstruction. *Arthroscopy*, 10, 132-9.
- Dolgo-Saburoff, B. 1929. Über Ursprung und Insertion der Skelettmuskeln. *Anat. Anz.*, 68, 80-87.

- Donath, K. 1988. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Der Präparator*, 197-200.
- Durselen, L., Claes, L., Ignatius, A. & Rubenacker, S. 1996. Comparative animal study of three ligament prostheses for the replacement of the anterior cruciate and medial collateral ligament. *Biomaterials*, 17, 977-82.
- Dustmann, M., Schmidt, T., Gangey, I., Unterhauser, F. N., Weiler, A. & Scheffler, S. U. 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.
- Feller, J. A., Webster, K. E. & Gavin, B. 2001. Early post-operative morbidity following anterior cruciate ligament reconstruction: patellar tendon versus hamstring graft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 9, 260-6.
- Fideler, B.M., Vangness, C.T. Jr., Lu, B., Orlando, C. & Moore, T. 1995. - Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human. *Am J Sports Med*, 23, 643-6.
- Forward, A. D. & Cowan, R. J. 1963. Tendon suture to bone. *J Bone Joint Surg Am.*, 45-A (4), 807-23.
- Freiwald, J., Engelhardt, M., Reuter, I., Gnewuch, A. & Konrad, P. 1998. Die nervöse Versorgung des Kniegelenks, Sensorische Versorgung - Afferente Fortleitung - Verschaltung - Funktion. *Krankengymnastik*, 50, 212-227.
- Fromm, B. & Kummer, W. 1994. Nerve supply of anterior cruciate ligaments and of cryopreserved anterior cruciate ligament allografts: a new method for the differentiation of the nervous tissues. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2, 118-22.
- Fuss, F. K. 1989. Anatomy of the cruciate ligaments and their function in extension and flexion of the human knee joint. *Am J Anat*, 184, 165-76.

- Gillard, G. C., Reilly, H. C., Bell-Booth, P. G. & Flint, M. H. 1979. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect Tissue Res*, 7, 37-46.
- Gillquist, J. & Odensten, M. 1993. Reconstruction of old anterior cruciate ligament tears with a Dacron prosthesis. A prospective study. *Am J Sports Med*, 21, 358-66.
- Girgis, F. G., Marshall, J. L. & Monajem, A. 1975. The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis. *Clin Orthop*, 216-31.
- Glousman, R., Shields, C., Jr., Kerlan, R., Jobe, F., Lombardo, S., Yocum, L., Tibone, J. & Gambardella, R. 1988. Gore-Tex prosthetic ligament in anterior cruciate deficient knees. *Am J Sports Med*, 16, 321-6.
- Goldstein, S., Clarke, D., Walsh, S., Black, K. & O'Brien, M. 2000. Transpecies heart valve transplant: Advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg* 70, 1962-1969.
- Goradia, V. K., Rochat, M. C., Grana, W. A., Rohrer, M. D. & Prasad, H. S. 2000. Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model. *Am J Knee Surg*, 13, 143-51.
- Gorschewsky, O., Browa, A., Vogel, U. & Stauffer, E. 2002. Klinisch-histologischer Vergleich des allogenen und autologen Patellarsehnedrittels (Bone-Tendon-Bone) zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbands. *Unfallchirurg*, 105, 703-714.
- Gorschewsky, O., Klakow, A., Riechert, K., Pitzl, M. & Becker, R. 2005. Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results. *Am J Sports Med*, 33, 1202-9.
- Grana, W. A., Egle, D. M., Mahnken, R. & Goodhart, C. W. 1994. An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *American Journal of Sports Medicine*, 22, 344-51.

- Grüber, J., Wolter, D. & Lierse, W. 1986. Der vordere Kreuzbandreflex. *Unfallchirurg*, 89, 551-554.
- Halata, Z., Wagner, C. & Baumann, K. I. 1999. Sensory nerve endings in the anterior cruciate ligament (Lig. cruciatum anterius) of sheep. *Anat Rec*, 254, 13-21.
- Harner, C. D., Baek, G. H., Vogrin, T. M., Carlin, G. J., Kashiwaguchi, S. & Woo, S. L. 1999. Quantitative analysis of human cruciate ligament insertions. *Arthroscopy*, 15, 741-9.
- Harris, N. L., Indelicato, P. A., Bloomberg, M. S., Meister, K. & Wheeler, D. L. 2002. Radiographic and histologic analysis of the tibial tunnel after allograft anterior cruciate ligament reconstruction in goats. *Am J Sports Med*, 30, 368-73.
- Haus, J. & Halata, Z. 1990. Innervation of the anterior cruciate ligament. *Int Orthop*, 14, 293-6.
- Haus, J., Halata, Z. & Refior, H. J. 1992. Proprioception in the anterior cruciate ligament of the human knee joint--morphological bases. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 130, 484-94.
- Höher, J., Livesay, G. A., Ma, C. B., Withrow, J. D., Fu, F. H. & Woo, S. L. 1999. Hamstring graft motion in the femoral bone tunnel when using titanium button/polyester tape fixation. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 7, 215-9.
- Höher, J., Scheffler, S. U., Withrow, J. D., Livesay, G. A., Debski, R. E., Fu, F. H. & Woo, S. L.-Y. 2000. Mechanical Behavior of Two Hamstring Graft Constructs for Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament. *J Orthop Res*, 18, 456-461.
- Hunt, P., Scheffler, S. U., Unterhauser, F. N. & Weiler, A. 2004. A model of soft-tissue graft anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg*.
- Jackson, GE, W. & TM, S. 1990. - Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene. *Am J Sports Med*, 18, 1-10.

- Jackson, D. W., Corsetti, J. & Simon, T. M. 1996. Biologic incorporation of allograft anterior cruciate ligament replacements. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 126-33.
- Jackson, D. W., Grood, E. S., Arnoczky, S. P., Butler, D. L. & Simon, T. M. 1987. Cruciate reconstruction using freeze dried anterior cruciate ligament allograft and a ligament augmentation device (LAD). An experimental study in a goat model. *Am J Sports Med*, 15, 528-38.
- Jackson, D. W., Grood, E. S., Cohn, B. T., Arnoczky, S. P., Simon, T. M. & Cummings, J. F. 1991. The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats. *J Bone Joint Surg Am*, 73, 201-13.
- Jackson, D. W., Grood, E. S., Goldstein, J. D., Rosen, M. A., Kurzweil, P. R., Cummings, J. F. & Simon, T. M. 1993. A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med*, 21, 176-85.
- Johansson, H., Sjolander, P. & Sojka, P. 1986. Actions on gamma-motoneurons elicited by electrical stimulation of joint afferent fibres in the hind limb of the cat. *J Physiol*, 375, 137-52.
- Jones, J. R., Smibert, J. G., McCullough, C. J., Price, A. B. & Hutton, W. C. 1986. Tendon implantation into bone: an experimental study. *J Hand Surg [Br]*, 12, 306-12.
- Kasperczyk, W. J., Bosch, U., Oestern, H. J. & Tscherne, H. 1991. Influence of immobilization on autograft healing in the knee joint. A preliminary study in a sheep knee PCL model. *Arch Orthop Trauma Surg*, 110, 158-61.
- Kawakami, H., Shino, K., Hamada, M., Nakata, K., Nakagawa, S., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Yoshikawa, H. & Ochi, T. 2004. Graft healing in a bone tunnel: bone-attached graft with screw fixation versus bone-free graft with extra-articular suture fixation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 12, 384-90.
- Kawamura, S., Ying, L., Kim, H. J., Dynybil, C. & Rodeo, S. A. 2005. Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing. *J Orthop Res*, 23, 1425-32.
-

- Kerboull, L., Christel, P. & Meunier, A. 1991. In vitro study of the role of various preservation methods on mechanical properties of allografts of the patellar tendon. *Chirurgie*, 117, 751-62.
- Kirkpatrick, J. S., Seaber, A. V., Glisson, R. R. & Bassett, F. H., 3rd. 1996. Cryopreserved anterior cruciate ligament allografts in a canine model. *J South Orthop Assoc*, 5, 20-9.
- Kleipool, A. E., Zijl, J. A. & Willems, W. J. 1998. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone allograft or autograft. A prospective study with an average follow up of 4 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 6, 224-30.
- Kusswetter, W. & Refior, H. J. 1985. Comparative light and scanning electron microscopy studies of the morphologic structure of ligament insertions into the bone. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 123, 876-9.
- Lui, P. P., Ho, G., Shum, W. T., Lee, Y. W., Ho, P. Y., Lo, W. N. & Lo, C. K. 2010. Inferior tendon graft to bone tunnel healing at the tibia compared to that at the femur after anterior cruciate ligament reconstruction. *Journal of Orthopaedic Science*, 15, 389-401.
- Lyon, R. M., Akeson, W. H., Amiel, D., Kitabayashi, L. R. & Woo, S. L. 1991. Ultrastructural differences between the cells of the medial collateral and the anterior cruciate ligaments. *Clin Orthop*, 279-86.
- Martinek, V. & Imhoff, A. B. 2002. Revision of failed anterior cruciate ligament reconstruction. *Orthopade*, 31, 778-84.
- Merrilees, M. J. & Flint, M. H. 1980. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat*, 157, 87-106.
- Miyasaka, K. C., Daniel, D. M., Stone, M. L. & Hirshman, P. 1991. The incidence of knee ligament injuries in the general population. *American Journal of Knee Surgery*, 4, 3-8.

- Morgan, C. D., Kalman, V. R. & Grawl, D. M. 1995. Definitive landmarks for reproducible tibial tunnel placement in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*, 11, 275-88.
- Murray, M. M., Martin, M. M., Martin, T. L. & Spector, M. 2000. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume*, 82-A, 1387-1397.
- Nebelung, W., Becker, R., Merkel, M. & Ropke, M. 1998. Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with semitendinosus tendon using Endobutton fixation on the femoral side. *Arthroscopy*, 14, 810-5.
- Nikolaou, P. K., Seaber, A. V., Glisson, R. R., Ribbeck, B. M. & Bassett, F. H., 3rd. 1986. Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique. *Am J Sports Med*, 14, 348-60.
- Nogalski, M. P. & Bach, B. R., Jr. 1993. A review of early anterior cruciate ligament surgical repair or reconstruction. Results and caveats. *Orthop Rev*, 22, 1213-23.
- Noyes, F. R. & Barber-Westin, S. D. 1996. Revision anterior cruciate ligament surgery: experience from Cincinnati. *Clin Orthop Relat Res*, 116-29.
- O'Brien, M., Goldstein, S., Walsh, S., Black, K., Elkins, R. & Clarke, D. 1999. The Syner Graft valve: A new acellular (nonglutardaldehyd-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc, Surg* 11 (Suppl 1), 194-200.
- Odensten, M. & Gillquist, J. 1985. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*, 67, 257-62.
- Osterhoff, G., Loffler, S., Steinke, H., Feja, C., Josten, C. & Hepp, P. 2011. Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *Knee*, 18, 98-103.

- Palmer, I. 1938. On the injuries of the ligament of the knee joint. *Acta Chir Scand (Suppl.)*, 53.
- Panni, A. S., Milano, G., Lucania, L. & Fabbriani, C. 1997. Graft healing after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*, 203-12.
- Papageorgiou, C. D., Ma, C. B., Abramowitch, S. D., Clineff, T. D. & Woo, S. L. 2001. A multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model. *Am J Sports Med*, 29, 620-6.
- Park, M. J., Lee, M. C. & Seong, S. C. 2001. A comparative study of the healing of tendon autograft and tendon-bone autograft using patellar tendon in rabbits. *Int Orthop*, 25, 35-9.
- Pauwels, F. 1960. A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 121, 478-515.
- Petersen, W. & Laprell, H. 2000. Insertion of autologous tendon grafts to the bone: a histological and immunohistochemical study of hamstring and patellar tendon grafts. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 8, 26-31.
- Petersen, W. & Tillmann, B. 1999. Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl)*, 200, 325-34.
- Petersen, W. & Tillmann, B. 2002. Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes. *Orthopäde*, 31, 710-718.
- Peterson, R. K., Shelton, W. R. & Bomboy, A. L. 2001. Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction: A 5-year follow-up. *Arthroscopy*, 17, 9-13.

- Poehling, G. G., Curl, W. W., Lee, C. A., Ginn, T. A., Rushing, J. T., Naughton, M. J., Holden, M. B., Martin, D. F. & Smith, B. P. 2005. Analysis of outcomes of anterior cruciate ligament repair with 5-year follow-up: allograft versus autograft. *Arthroscopy*, 21, 774-85.
- Proffen, B. L., McElfresh, M., Fleming, B. C. & Murray, M. M. 2011. A comparative anatomical study of the human knee and six animal species. *Knee*.
- Radford, W. J. P., Amis, A. A. & Stead, A. C. 1996. The ovine stifle as a model for human cruciate ligament surgery. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 9, 134-139.
- Raspanti, M., Strocchi, R., De Pasquale, V., Martini, D., Montanari, C. & Ruggeri, A. 1996. Structure and ultrastructure of the bone/ligament junction. *Ital J Anat Embryol*, 101, 97-105.
- Roberts, T. S., Drez, D., Jr., McCarthy, W. & Paine, R. 1991. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med*, 19, 35-41.
- Rodeo, S. A., Arnoczky, S. P., Torzilli, P. A., Hidaka, C. & Warren, R. F. 1993. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume*, 75, 1795-803.
- Rodeo, S. A. & Izawa, K. 1999. Tendon-to-bone healing: basic science aspects and enhancement techniques. *Techniques in Orthopaedics*, 14, 22-33.
- Rosenberg, T. D., Franklin, J. L., Baldwin, G. N. & Nelson, K. A. 1992. Extensor mechanism function after patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*, 20, 519-25; discussion 525-6.
- Sakane, M., Fox, R. J., Woo, S. L., Livesay, G. A., Li, G. & Fu, F. H. 1997. In situ forces in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads. *Journal of Orthopaedic Research*, 15, 285-93.

- Scheffler, S. U., Schmidt, T., Gangey, I., Dustmann, M., Unterhauser, F. & Weiler, A. 2008. Fresh-frozen free-tendon allografts versus autografts in anterior cruciate ligament reconstruction: delayed remodeling and inferior mechanical function during long-term healing in sheep. *Arthroscopy*, 24, 448-58.
- Schlichting, K. 2007. Einheilung von Patellarsehnen- versus Beugesehnen-Transplantaten nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes-Histologische Untersuchung am Schaf-. *Inaugural-Dissertation an der Freien Universität Berlin*, Journal-Nr.: 3146.
- Schneider, H. 1956. Zur Struktur der Sehnenansatzzonen. *Z. Anat.*, 119, 431-456.
- Schutte, M. J., Dabezies, E. J., Zimny, M. L. & Happel, L. T. 1987. Neural anatomy of the human anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg [Am]*, 69, 243-7.
- Scranton, P. E., Jr., Lanzer, W. L., Ferguson, M. S., Kirkman, T. R. & Pflaster, D. S. 1998. Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. *Arthroscopy*, 14, 702-16.
- Seitz, H., Hausner, T., Schlenz, I., Lang, S. & Eschberger, J. 1997. Vascular anatomy of the ovine anterior cruciate ligament. A macroscopic, histological and radiographic study. *Arch Orthop Trauma Surg*, 116, 19-21.
- Senst, W. 1974. Cellular structure of the ligament-bone junction. *Zentralbl Chir*, 99, 275-9.
- Sharpey W. & Ellis, G. 1856. Elements of anatomy. London, *Walton and Moberly*
- Sheh, M. Y., Butler, D. & Stoffer, D. 1985. Correlation between structure and material properties in human knee ligaments and tendons. *Am Soc Mech Eng AMD*, 17-20.
- Shelton, W. R., Papendick, L. & Dukes, A. D. 1997. Autograft versus allograft anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*, 13, 446-9.
- Shino, K., Kawasaki, T., Hirose, H., Gotoh, I., Inoue, M. & Ono, K. 1984. Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br.* 66, 672-81.

- Sidles, J. A., Clark, J. M. & Garbini, J. L. 1991. A geometric theory of the equilibrium mechanics of fibers in ligaments and tendons. *J Biomech*, 24, 943-9.
- Siebold, R., Buelow, J. U., Boes, L. & Ellermann, A. 2002. Primary- and revision-reconstruction of the anterior cruciate ligament with allografts: a retrospective study including 325 patients. *Zentralbl Chir*, 127, 850-4.
- Smith, A.S. 1918. The diagnosis and treatment of injuries to the cruciate ligaments. *Br J. Surg* 6, 176-189
- Soon, M. Y., Hassan, A., Hui, J. H., Goh, J. C. & Lee, E. H. 2007. An analysis of soft tissue allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model: a short-term study of the use of mesenchymal stem cells to enhance tendon osteointegration. *Am J Sports Med*, 35, 962-71.
- Tackman, W. 1994. Das Binde- und Stützgewebe. In: *Auxilium-Repetitorien der Histologie I*. Berlin.
- Thorson, E., Rodrigo, J. J., Vasseur, P., Sharkey, N. & Heitter, D. 1989. Replacement of the anterior cruciate ligament. A comparison of autografts and allografts in dogs. *Acta Orthop Scand*, 60, 555-60.
- Tomita, F., Yasuda, K., Mikami, S., Sakai, T., Yamazaki, S. & Tohyama, H. 2001. Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-Patellar tendon-Bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*, 17, 461-76.
- Tsuda, E., Okamura, Y., Otsuka, H., Komatsu, T. & Tokuya, S. 2001. Direct evidence of the anterior cruciate ligament-hamstring reflex arc in humans. *Am J Sports Med*, 29, 83-7.
- Unterhauser, N.F., 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. *12th ESSKA Congress 2000*. Innsbruck.

- van Steensel, C. J., Schreuder, O., van den Bosch, B. F., van Paassen, H. C., Menke, H. E., Voorhorst, G. & Gratama, S. 1987. Failure of anterior cruciate-ligament reconstruction using tendon xenograft. *J Bone Joint Surg Am*, 69, 860-4.
- Weiler, A., Hoffmann, R. F., Bail, H. J., Rehm, O. & Sudkamp, N. P. 2002a. 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, 124-35.
- Weiler, A., Peine, R., Pashmineh-Azar, A., Abel, C., Sudkamp, N. P. & Hoffmann, R. F. 2002b. 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., Scheffler, S. & Apreleva, M. 2005. Healing of Ligament and Tendon to Bone. Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons and Joint Capsule, ed. W. Walsh, R. Vol. Chapter 19. *Totowa: Humana Press Inc.*, 221-233
- Weiler, A., Scheffler, S. & Höher, J. 2002c. Transplantatauswahl für den primären Ersatz des vorderen Kreuzbandes. *Der Orthopäde*, 8, 731-740.
- Weiler, A., Scheffler, S. U. & Sudkamp, N. P. 2000. Current aspects of anchoring hamstring tendon transplants in cruciate ligament surgery. *Chirurg*, 71, 1034-44.
- Weiler, A., Unterhauser, F. N., Faensen, B., Hunt, P., Bail, H. J. & Haas, N. P. 2002d. Comparison of tendon-to-bone healing using extracortical and anatomic interference fit fixation of soft tissue grafts in a sheep model of acl reconstruction. *Proceedings of the 48th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*. Dallas, TX, USA.
- Wen, C. Y., Qin, L., Lee, K. M., Wong, M. W. & Chan, K. M. 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.

- Whiston, T. B. & Walmsley, R. 1960. Some observations on the reaction of bone and tendon after tunneling of bone and insertion of tendon. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 42-B, 377-86.
- Wojtys, E. M. & Huston, L. J. 1994. Neuromuscular performance in normal and anterior cruciate ligament-deficient lower extremities. *Am J Sports Med*, 22, 89-104.
- Yamakado, K., Kitaoka, K., Yamada, H., Hashiba, K., Nakamura, R. & Tomita, K. 2002. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel. *Arthroscopy*, 18, 82-90.
- Yeh, W. L., Lin, S. S., Yuan, L. J., Lee, K. F., Lee, M. Y. & Ueng, S. W. 2007. Effects of hyperbaric oxygen treatment on tendon graft and tendon-bone integration in bone tunnel: biochemical and histological analysis in rabbits. *J Orthop Res*, 25, 636-45.
- Yoshiya, S., Nagano, M., Kurosaka, M., Muratsu, H. & Mizuno, K. 2000. Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 278-86.
- Zhang, C. C., Zhou, J. S. & Pan, G. P. 2003. Ultrastructure of anterior cruciate ligament after transplantation. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 17, 370-3.
- Zichner, L. 1985. Replacement of the cruciate ligament with heterologous connective tissue structures. *Unfallchirurgie*, 11, 238-41.

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

ABB. 2-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES KNIEGELENKES VOM MENSCHEN (AUS PUTZ, R.; PABST, R. (1997): SOBOTTA- ATLAS DER ANATOMIE DES MENSCHEN).....	3
ABB. 2-2: HISTOLOGIE EINER DIREKTEN INSERTION, PATELLARSEHNE MENSCH. 1 – SEHNE, 2 – NICHT MINERALISIERTER FASERKNORPEL, 3 – MINERALISIERTER FASERKNORPEL, 4 – KNOCHEN (BACH ET AL., 1998).....	9
ABB. 2-3: SHARPEY FASERN (1) ALS HAUPTMERKMAL EINER INDIREKTEN BANDINSERTION REICHEN VOM BANDGEWEBE BIS IN DEN KNOCHEN, MG, 400x (WEILER ET AL., 2005).....	10
ABB. 2-4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ANATOMISCHEN FIXATION EINES FREIEN SEHNENTRANSPLANTATES MIT INTERFERENZSCHRAUBEN IM SCHAFSMODELL (WEILER ET AL., 2002B).....	21
ABB. 2-5: „BUNGEE-CORD-EFFECT“ BEI INDIREKTER EXTRAKORTIKALER FIXATION: DAS TRANSPLANTAT BEWEGT SICH LONGITUDINAL ZUM BOHRKANAL (WEILER ET AL., 2000).....	22
ABB. 2-6: „WINDSHIELD-WIPER-EFFECT“ BEI INDIREKTER EXTRAKORTIKALER FIXATION: ES KOMMT ZUR TRICHTERFÖRMIGEN AUFWEITUNG DES TUNNELEINGANGS DURCH TRANSVERSALE TRANSPLANTATBEWEGUNGEN (WEILER ET AL., 2000).....	22
ABB. 3-1: SCHAFE BEIM ZÜCHTER.....	26
ABB. 3-2: DARSTELLUNG DER SEHNE DES M. FLEXOR DIGITALIS SUPERFICIALIS (2), DIE VON DER SEHNE DES M. GASTROCNEMIUS (1) UMHÜLLT IST.....	28
ABB. 3-3: LINKS: DARSTELLUNG DER PRÄPARATIONSTECHNIK (AUS STROBEL, ARTHROSKOPISCHE CHIRURGIE, SPRINGER VERLAG).....	29
RECHTS: TRANSPLANTAT IN BASEBALL-STITCH-TECHNIK PRÄPARIERT.....	29
ABB. 3-4: DARSTELLUNG DER EXTRAARTIKULÄREN TRANSPLANTATFIXIERUNG FEMORAL ÜBER EINEN ENDOBUTTON UND TIBIAL ÜBER EINE KNOCHENBRÜCKE (WEILER ET AL., 2005).....	30
ABB. 3-5: MARKIERUNGSZEITPUNKTE DER POLYCHROMEN SEQUENZMARKIERUNG.....	33
ABB. 3-6: BEISPIEL EINER GESÄGTEN KNOCHENSCHLEIFE EINER TIBIA MIT KOMPLETTEM TRANSPLANTAT, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 1AL6B, TIBIA.....	35
ABB. 3-7: BEISPIEL EINER FEMORALEN KNOCHENSCHLEIFE MIT TEILWEISE HERAUSGERISSENEM TRANSPLANTAT, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 2AL6B, FEMUR.....	35
ABB. 3-8: BEISPIEL FÜR DEN GRAD I DER DIREKTEN BANDINSERTION MIT VEREINZELTEN UNVERKALKTEN KNORPELZELLEN (PFEIL), 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 6AU6B, FEMUR, MG, 200x.....	40
ABB. 3-9: BEISPIEL FÜR DEN GRAD II DER DIREKTEN BANDINSERTION UND DEM AUFTRETEN VON KNORPELZELLEN MIT DEUTLICHEM MINERALISATIONSSAUM (PFEIL), 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 8AU6H, TIBIA, SOK, 100x.....	40
ABB. 3-10: GRAD III EINER DIREKTEN BANDINSERTION (1-BAND, 2-FASERKNORPEL, 3- KALKKNORPEL, 4-KNOCHEN), 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 3AL12B, TIBIA, MG, 100x.....	40
ABB. 3-11: EINE REIFE DIREKTE BANDINSERTION GRAD IV IM BEREICH DES TUNNELBODENS IN DER ALCIAN-BLAUFÄRBUNG, 52 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 6AL52B, FEMUR, AB, 100x.....	40

ABB. 4-1: EIN MIT GEFÄßEN DURCHZOGENER SYNOVIALSCHLAUCH UMGIBT DAS TRANSPLANTAT, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 3AL6B	43
ABB. 4-2: DEUTLICH WENIGER ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN BEI EINEM AUTOLOGEN 12-WOCHEN-TIER, SCHAF 2AU12B	43
ABB. 4-3: VEREINZELTE CHONDROIDE ZELLEN (PFEIL) IM BEREICH DES TUNNELBODENS ZEIGEN DEN GRAD I DER DIREKTEN BANDINSERTION, 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 6AU6B, FEMUR, MG, 200X	46
ABB. 4-4: KORRESPONDIERENDER BILDAUSSCHNITT IN DER SAFRANIN-O-VON-KOSSA-FÄRBUNG BESTÄTIGT DAS VORKOMMEN VON UNVERKALKTEN KNORPELZELLEN (PFEIL), 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 6AU6B, FEMUR, SOK, 200X.....	46
ABB. 4-5: DARSTELLUNG DES GRAD II DER DIREKTEN BANDINSERTION IN DER ALCIAN-BLAU-FÄRBUNG MIT VON KALKSÄUMEN UMGEBENDEN KNORPELZELLEN (PFEILE) IM TUNNELEINGANGSBEREICH, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 7AL6B, TIBIA, AB, 100X.....	46
ABB. 4-6: AUCH IN DER SAFRANIN-O-VON-KOSSA-FÄRBUNG ZEIGT DAS VORKOMMEN VON KNORPELZELLEN MIT MINERALISATIONSSAUM (PFEILE) DEN GRAD II EINER DIREKTEN BANDINSERTION, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 7AL6B, TIBIA, SOK, 100X.....	46
ABB. 4-7: DAS TRANSPLANTAT STELLT SICH ALS ALTES BANDGEWEBE DAR, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 9AL6H, TIBIA, MG, 100X.....	48
ABB. 4-8: BEI DEN AUTOLOGEN 6-WOCHEN-TIEREN IST DIE BANDSTRUKTUR (1) SCHON DEUTLICH AUFGELOCKERT UND ES GIBT EINE VIELZAHL VON RUNDZELLEN (2), DIE VON DER PERIPHERIE EINWANDERN, 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 4AU6B, FEMUR, MG, 100X.....	48
ABB. 4-9: ÜBERSICHT EINES ALLOGENEN 6-WOCHEN-PRÄPARATES MIT HERAUSGERISSENEM TRANSPLANTAT UND DEUTLICHER TUNNELAUFWERTUNG, SCHAF 7AL6B, FEMUR, MG, ÜBERSICHT	48
ABB. 4-10: KOMPLETTES TRANSPLANTAT EINES ALLOGENEN 6-WOCHEN-TIERES, SCHAF 9AL6H, TIBIA, MG, ÜBERSICHT	48
ABB. 4-11: OSTEOKLASTEN (PFEILE) AM TUNNELEINGANG SIND DER ABBAUENDE FAKTOR IM AKTIVEN KNOCHENSTOFFWECHSEL, 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 4AU6B, FEMUR, MG, 200X	50
ABB. 4-12: DAGEGEN STEHEN OSTEOIDSÄUME (1) MIT AKTIVEN OSTEOBLASTEN (2) FÜR DIE KNOCHENNEUBILDUNG, 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 8AU6H, TIBIA, MG, 200X.....	50
ABB. 4-13: NEU GEBILDETER UNMINERALISIERTER (1) UND MINERALISIERTER (2) GEFLECHTKNOCHEN IM BEREICH DES TUNNELBODENS, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 9AL6H, TIBIA, SOK, 50X	50
ABB. 4-14: ÜBERSICHTSBILD MIT DEUTLICHER TUNNELAUFWERTUNG (PFEIL) IM EINGANGSBEREICH, 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 8AU6H, FEMUR, SOK, ÜBERSICHT	50
ABB. 4-15: XYLENOL-ORANGE LAGERT SICH BEI DEN ALLOGENEN TIEREN IM VERGLEICH ZU DEN AUTOLOGEN VERMEHRT AN, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 9AL6H, FEMUR.....	52
ABB. 4-16: BEI DIESEM ALLOGENEN 6-WOCHEN-TIER IST EINE DEUTLICHE ANLAGERUNG VON XYLENOL-ORANGE IM TUNNELEINGANGS-BEREICH (PFEILE) ZU SEHEN; DURCH DIESE KNOCHENNEUBILDUNG WIRD EINE VERENGUNG DES TUNNELEINGANGS ERREICHT. AUCH DER TUNNELBODEN ZEIGT EINE VERMEHRTE ANREICHERUNG VON XYLENOL, 6 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 2AL6B, TIBIA	52
ABB. 4-17: DIE DARSTELLUNG ALLER DREI FLUORCHROME ZEIGT DIE GLEICHMÄßIGE ANLAGERUNG VON CALCEIN UND XYLENOL, WÄHREND TETRAZYKLIN (PFEIL) NUR PUNKTUELL SICHTBAR IST, 6 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 3AU6B, TIBIA.....	52

ABB. 4-18: DARSTELLUNG DER FIZ (PFEILE) BEI EINEM ALLOGENEN 12-WOCHEN-TIER ALS BREITER, SICH ORDNENDER BEREICH ZWISCHEN TRANSPLANTAT UND KNOCHEN MIT NORMALEM ZELLGEHALT, SCHAF 8AL12H, TIBIA, MG, 25x	54
ABB. 4-19: DIREKTE BANDINSERTION GRAD II IM BEREICH DER TUNNELMITTE ; DIE CHONDROIDEN ZELLEN SIND ZUM TEIL VON EINEM MINERALISATIONSSAUM UMGEBEN (PFEIL), 12 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 7AU12B, TIBIA, MG, 200x.....	55
ABB. 4-20: DER KORRESPONDIERENDE TUNNELABSCHNITT IN DER SOK-FÄRBUNG VERDEUTLICHT DAS ERSTE AUFTRETEN VON MINERALISATIONSSÄUMEN (PFEIL) ZWISCHEN DEN KNORPELZELLEN, 12 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 7AU12B, TIBIA, SOK, 200x	55
ABB. 4-21: DIREKTE BANDINSERTION GRAD IV MIT KLASSISCHEM VIERZONENAUFBAU (1-BAND, 2-FASERKNORPEL, 3-KALKKNORPEL, 4-KNOCHEN) AN EINEM KNOCHENVORSPRUNG IN DER ALCIAN-BLAU-FÄRBUNG, 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 3AL12B, TIBIA, AB, 100x.....	55
ABB. 4-22: EINE DIREKTE BANDINSERTION GRAD IV IN DER SAFRANIN-O-VON-KOSSA-FÄRBUNG, 12 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 8AU12B, TIBIA, SOK, 50x.....	55
ABB. 4-23: INDIREKTE BANDINSERTION: SHARPEY FASERN (PFEILE) DURCHDRINGEN DEN KNOCHEN, 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 2AL12B, TIBIA, MG, 200x.....	56
ABB. 4-24: BEGINNENDE AUSRICHTUNG DES TRANSPLANTATGEWEBES, 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 6AL12B, FEMUR, MG, 100x.....	57
ABB. 4-25: AUCH BEI DEN AUTOLOGEN TIEREN LIEGT ZUM TEIL IN DER PERIPHERIE NOCH EINE DEUTLICHE HYPERZELLULARITÄT VOR, 12 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 6AU12B, FEMUR, MG, 100x	57
ABB. 4-26: ANSAMMLUNG VON FREMDKÖRPERRIESENZELLEN (PFEILE) UM DAS NAHTMATERIAL (1), 12 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 9AU12H, FEMUR, MG, 200x.....	58
ABB. 4-27: MASSIVE TUNNELAUFWERTUNG (PFEIL) IM BEREICH DES TUNNELBODENS, 12 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 5AU12B, TIBIA, MG, ÜBERSICHT	59
ABB. 4-28: VAKUOLIGE AUFLÖCKERUNGEN IM BEREICH DES TUNNELBODENS, 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 9AL12H, TIBIA, MG, 16x	59
ABB. 4-29: OSTEOKLASTEN (PFEIL) IM BEREICH DES TUNNELBODENS ZEIGEN BEI EINEM ALLOGENEN 12-WOCHEN-TIER DEN AKTIVEN KNOCHENSTOFFWECHSEL, SCHAF 9AL12H, FEMUR, MG, 200x.....	59
ABB. 4-30: DEUTLICHE KNOCHENNEUBILDUNG ÜBER MINERALISATIONSFRONTEN (PFEILE) BEI EINEM AUTOLOGEN 12-WOCHEN-TIER, SCHAF 1AU12B, TIBIA, SOK, 50x	59
ABB. 4-31: WÄHREND XYLENOL (PFEILE) EINE NAHEZU LINEARE SCHMALE ANLAGERUNGSBANDE AUFWEIST, KANN CALCEIN ENTLANG DES GESAMTEN TUNNELS AUCH IN TIEFEREN BEREICHEN GESEHEN WERDEN, 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 9AU12H, TIBIA.....	61
ABB. 4-32: XYLENOL-ANREICHERUNGEN AM TUNNELEINGANG UND MITTIG AN EINEM KNOCHENVORSPRUNG (PFEILE) ZEIGEN DEN BEGINN DES ZUWACHSENS DES TUNNELS; CALCEIN LAGERT SICH GLEICHMÄRIG AN, 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 2AL12B, TIBIA.....	61
ABB. 4-33: KORRESPONDIERENDES BILD MIT DARSTELLUNG DES TETRAZYKLINS: AUCH HIER KANN EINE VERMEHRTE ANREICHERUNG AN DEN PUNKTEN DER KNOCHENNEUBILDUNG BEOBACHTET WERDEN, 12 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 2AL12B, TIBIA	61
ABB. 4-34: DARSTELLUNG DER SCHMALEN UND ZUM GROßEN TEIL GEORDNETEN FIBRÖSEN ZWISCHENSCHICHT (FIZ) BEI EINEM ALLOGENEN 52-WOCHEN-TIER, SCHAF 1AL52B, TIBIA, MG, 100x.....	63

ABB. 4-35: SHARPEY FASERN (SF) STELLEN SICH UNTER DEM POLARISATIONSMIKROSKOP GUT DAR, 52 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 1AU52B, TIBIA, POL, 100x.....	64
ABB. 4-36: SHARPEY FASERN (SF) VERBINDEN TRANSPLANTAT UND KNOCHEN ALS INDIREKTE BANDINSERTION AN EINEM KNOCHENVORSPRUNG AM TUNNELBODEN, 52 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 3AL52B, TIBIA, MG, 100x.....	64
ABB. 4-37: EINE DIREKTE BANDINSERTION GRAD IV IN DER ALCIAN-BLAU-FÄRBUNG (1-BAND, 2-FASERKNORPEL, 3-KALKKNORPEL, 4-KNOCHEN), 52 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 1AU52B, TIBIA, AB, 100x	64
ABB. 4-38: EINE DIREKTE BANDINSERTION GRAD II MIT VON EINEM KALKSAUM UMGEBENDEN KNORPELZELLEN (PFEIL) IN DER MASSON-GOLDNER-FÄRBUNG AM TUNNELEINGANG, 52 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 5AL52B, FEMUR, MG, 100x.....	64
ABB. 4-39: DARSTELLUNG EINES ZENTRALEN TRANSPLANTATABSCHNITTES MIT GLEICHMÄßIGER FASERAUSRICHTUNG, 52 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 3AL52B, TIBIA, MG, 100x.....	65
ABB. 4-40: DEUTLICHE OSTEOIDSÄUME (1) BEI EINEM AUTOLOGEN 52-WOCHEN-TIER, SCHAF 1AU52B, TIBIA, MG, 100x.....	66
ABB. 4-41: AUCH BEI DEN ALLOGENEN 52-WOCHEN-TIEREN KOMMEN OSTEOKLASTEN (PFEILE) ALS ZEICHEN DES AKTIVEN KNOCHENUMBAUS VOR, SCHAF 9AL52H, FEMUR, MG, 100x	67
ABB. 4-42: OSTEOIDSÄUME (1) IN EINER INDIREKTEN BANDINSERTION MITTELS SHARPEY FASERN (PFEIL) STEHEN FÜR DEN AKTIVEN KNOCHENAUFBAU HIER IM BEREICH DER TUNNELMITTE, 52 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 9AL52H, TIBIA, MG, 200x.....	67
ABB. 4-43: OSTEOIDSÄUME (1) UND AKTIVE OSTEOBLASTEN (2) IM BEREICH DES TUNNELBODENS, 52 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 9AL52H, TIBIA, MG, 200x	67
ABB. 4-44: EIN DURCHBAUTER KNOCHENTUNNEL (FADENRESTE GUT ZU ERKENNEN) BEI EINEM ALLOGENEN 52-WOCHEN-TIER, SCHAF 7AL52B, FEMUR, SOK, 100x	67
ABB. 4-45: XYLENOL-ORANGE STELLT SICH IN DIESEM PRÄPARAT, IN DEM EIN DEUTLICHES ZUWACHSEN DES TUNNELS ZU ERKENNEN IST, DEUTLICHER ALS CALCEIN-GRÜN DAR, 52 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 10AU52B, TIBIA.....	69
ABB. 4-46: WÄHREND CALCEIN-GRÜN EINE GLEICHMÄßIGE PUNKTUELLE ANREICHERUNG ZEIGT, LIEGT TETRAZYKLIN (PFEIL) HAUPTSÄCHLICH IM BEREICH DES TUNNELEINGANGS VOR, 52 WOCHEN ALLOGEN, SCHAF 6AL52B, TIBIA	69
ABB. 4-47: XYLENOL UND CALCEIN STELLEN SICH IN VEREINZELTEN BANDEN DAR, WÄHREND SICH TETRAZYKLIN NUR PUNKTUELL DARSTELLT; DEUTLICH ZU SEHEN IST EIN ZUWACHSEN DES TUNNELEINGANGS, 52 WOCHEN AUTOLOG, SCHAF 7AU52B, FEMUR.....	69

9.2 Tabellenverzeichnis

TAB. 3-1: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER EINTEILUNG DER IN DEN VERSUCH AUFGENOMMENEN TIERE, POSTOPERATIVEN STANDZEITEN, EINTEILUNG DER GRUPPEN UND ANZAHL DER TIERE PRO GRUPPE.....	25
TAB. 3-2: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER MARKIERUNGSZEITPUNKTE.....	33
TAB. 3-3: MODIFIZIERTER SCORE ZUR BEURTEILUNG EINER ENTSTEHENDEN DIREKTEN BANDINSERTION (UNTERHAUSER ET AL., 2006)	39
TAB. 4-1: ERGEBNISSE DER DIREKTEN BANDINSERTION TIBIAL ANHAND DER SCORES	70
TAB. 4-2: ERGEBNISSE DER DIREKTEN BANDINSERTION FEMORAL ANHAND DER SCORES.....	71

9.3 Danksagung

Zuerst danke ich meinen Eltern für ihre jahrelange Unterstützung sowohl finanzieller als auch mentaler Art. Danke dass Ihr immer für mich da seid!

Der nächste Dank gilt Herrn Dr. Friedrich Walter, der mir die Chance gab, seine Praxis zu übernehmen, mir damit mein finanzielles Standbein und gleichzeitig durch seine Arbeit als Praxisvertreter die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit fertig zu stellen. Danke für alles mein lieber Fritz!

Für die Vergabe des Themas möchte ich herzlich Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Weiler danken; mein besonderer Dank für die fachliche Beratung gilt Dr. Sven Scheffler, der immer ein offenes Ohr für meine vielen Fragen hatte. Herrn Dr. Frank Unterhauser möchte ich für seine Hilfe bei Fragen rund um die histologische Auswertung danken. Besonderer Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Tanja Schmidt, Moritz Dustmann und Insa Gangey, durch unsere gute Zusammenarbeit kamen wir immer gut voran.

Für die vielen guten Korrekturen möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Rudolph danken, der sich auch nach 10 Jahren noch meine Arbeit angeschaut hat.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Marzena Princ und Gabriele Hardung möchte ich für ihre immer sofortige Hilfe bei der Ein- und Durchführung der Laborarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Lars Preußner, der sich mit stoischer Ruhe und einem unglaublichem Durchhaltevermögen gegen meine Ungeduld mit Computern und ihren Problemen durchsetzte und immer wieder ein offenes Ohr für mich hatte.

Gute Hilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung ins Englische leistete mir Prof. Dr. Dr. Dr. Werner Köhler und sein Enkel Stefan. Vielen Dank für die guten Korrekturen!

Zum guten Schluß danke ich meinem lieben Michael, der immer für mich da ist und mich immer wieder motiviert hat, meine Doktorarbeit auch nach der langen Zeit noch fertigzustellen.

9.4 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Judith Keil, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich habe ausschließlich die angegebenen Materialien, Geräte und Quellen in Anspruch genommen.

Berlin, den 25.06.2012

Judith Keil