

Aus dem Centrum für muskuloskeletale Chirurgie
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Thermische Kollagenverkürzung mittels monopolarer
Hochfrequenzenergie zur Behandlung der
vorderen Kreuzbandelongation*

—

*Histomorphometrische
Untersuchung am Schaf*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Heike Unterhauser-Chwastek

aus Magdeburg

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Weiler
2. Prof. Dr. med. C. Perka
3. Prof. Dr. med. R. Becker

Datum der Promotion: 07.09.2012

Ich möchte Herrn PD Dr. Andreas Weiler herzlich für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit danken. Ohne seinen wissenschaftlichen Rat und Beistand bei der Durchführung des Projekts, sowie den Operationen an den Versuchstieren, wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Herrn Dr. Sven Scheffler und Frau Dr. Veronica Schönfelder für die Betreuung meiner experimentellen Arbeit und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Hardung und Frau Prinz, die mir während meiner Tätigkeit im Labor jederzeit helfend zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Frank für seine große Geduld.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mit ihrer moralischen Unterstützung wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Für meine Eltern,
Paula und Frank

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	8
1.1 Das vordere Kreuzband	10
1.1.1 Funktion	10
1.1.2 Anatomie	11
1.1.2.1 Makroskopische Anatomie	11
1.1.2.2.1 Interzellulärsubstanz	13
1.1.2.2.2 Zelluläre Bestandteile	17
1.1.2.3 Physiologische Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes	18
1.2 Elektrochirurgie	19
1.2.1 Geschichtliche Entwicklung der Elektrochirurgie	19
1.2.2 Physikalische und technische Grundlagen	20
1.2.2.1 Bioelektrische Wirkung	20
1.2.2.2 Hochfrequenzapplikationstechnik	22
1.2.3 Thermische Stabilität des Kollagens	23
1.2.4 Gewebereaktion auf thermische Energie	25
1.2.5 Monopolare Hochfrequenzenergie in der Kniegelenkschirurgie	27
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Allgemeiner experimenteller Aufbau	29
2.1.1 Gruppeneinteilung	30
2.2 Operativer Ablauf	31
2.2.1 Präoperative Maßnahmen	31
2.2.2 Operative Eingriffe	31
2.2.3 Postoperative Maßnahmen	33
2.2.3.1 Gewebeentnahme	34

2.2.3.2 Gewebepreparation für die Lichtmikroskopie	35
2.2.3.3 Färbung	36
2.2.3.3.1 Konventionelle Färbung	36
2.2.3.3.2 Immunhistologie	36
2.2.3.3.2.1 Grundlagen der Immunhistologie	37
2.2.3.3.2.2 Allgemeines Grundprinzip der Faktor VIII Färbung	37
2.3 Histologische Auswertung und Datenanalyse	38
2.3.1 Durchlichtmikroskopie	39
2.3.2 Polarisationsmikroskopie	40
2.3.3 Statistische Auswertung	40
3. ERGEBNISSE	41
3.1 Allgemeines	41
3.1.1 Komplikationen	41
3.2 Postoperativer Verlauf	41
3.3 Klinische Beurteilung der Kniestabilität	41
3.4 Makroskopische Auswertung	42
3.5 Mikroskopische Auswertung	45
3.5.1 Konventionelle Lichtmikroskopie	45
3.5.1.1 Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild	45
3.5.1.2 Kollagenwellenlänge (Crimp)	50
3.5.2 Immunhistologie	53
3.5.2.1 Vaskularisierung/ Faktor VIII	53
4. DISKUSSION	56
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATUR	67

7. ANHANG	86
7.1 Spezielles Operationsinstrumentarium	86
7.1.1 Elektrochirurgisches Instrumentarium	86
7.1.2 Operationsinstrumente	86
7.2 Histologische Untersuchungsmaterialien	86
7.2.1 Materialien zur histologischen Aufarbeitung	86
7.2.2 Übersichtsfärbungen	88
7.2.3 Immunhistologie	89
7.3 Arzneimittel	90
7.4 Röntgenverlaufskontrolle	90
7.5 Abbildungsverzeichnis	91
7.6 Tabellenverzeichnis	94
7.7 Graphikverzeichnis	94
7.8 Abkürzungsverzeichnis	95
7.9 Eidesstattlicher Erklärung	96
CURRICULUM VITAE	97
VERÖFFENTLICHUNGEN	98

1. EINLEITUNG

Die Verletzung des vorderen Kreuzbandes (VKB) ist von großer sozialmedizinischer Bedeutung. Besonders sportlich aktive Jugendliche haben eine hohe Verletzungsinzidenz und die Therapie ist meist langwierig. Etwa 70% aller Kreuzbandverletzungen in Deutschland ereignen sich beim Sport in einem Lebensalter von 15 bis 45 Jahren. In dieser Altersgruppe liegt die Inzidenz bei etwa einer Verletzung pro 1.750 Einwohner. Betrachtet man die Gruppe der 15 bis 25 jährigen erhöht sich die Inzidenz gar auf 1 zu 1.000 [27,48,93].

Als Folge der VKB-Verletzung verspürt der Patient meist eine progrediente Kniegelenksinstabilität, die ihn sowohl bei sportlicher als auch bei alltäglicher Aktivität stark einschränkt. Aufgrund rezidivierender (Sub)-luxationsereignisse (giving way) kann es zu einem vorzeitigem Gelenkverschleiß mit zunehmender Beschwerdesymptomatik kommen [11].

Bei einer Kreuzbandrupturen zählt der Ersatz des VKB mit einem autologen Sehnentransplantat heute zum „Gold Standard“ der Therapie des sportlich aktiven Patienten [24,25,41,43,63,163]. Die Entscheidung für eine VKB-Rekonstruktion fällt schwer, wenn bei klinisch eindeutiger VKB-Insuffizienz intraoperativ lediglich eine Partialruptur oder Elongation des nativen VKB nachgewiesen wird [83]. In diesen Fällen könnte durch ein VKB-erhaltendes Verfahren - zum Beispiel durch Raffung des VKB und Wiederherstellung der in-situ Spannung - Komplikationen und Folgeschäden eines Kreuzbandersatzes vermieden werden. Trotz stetiger Weiterentwicklung und Optimierung von Operationstechniken, insbesondere bei der Transplantatfixation sowie -präparation, birgt die technisch anspruchsvolle Operation einige Risiken. Eine anatomisch ungenaue und mechanisch instabile Implantation des Bandersatzes, intraoperative Verletzungen von knöchernen oder ligamentären Strukturen der Interkondylärgrube sowie eine inadäquate Vorspannung des Bandes führen in bis zu 10% aller Eingriffe zu unbefriedigenden Operationsergebnissen in Form von Beschwerdepersistenz, Funktionsverlust und wiederkehrender Knieinstabilität [13,16,33,46,48,67-69,108,145,147,159]. Bei jährlich zirka 25.000 Primäreingriffen am VKB in Deutschland entsteht somit ein Bedarf an 2.000 bis 3.000 Revisionsoperationen. Darüber hinaus ist auch nach einer Rekonstruktion des VKB die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung sekundärer Gelenkerkrankungen, wie

degenerative Meniskusläsionen und Ausbildung einer Arthrose höher als bei kreuzbandgesunden Patienten [38,41,43,46,68,72,75,77,82,104,133].

In der Schulterchirurgie ist bei Schulterinstabilitäten die Raffung beziehungsweise Verkürzung der Kapsel-Band-Strukturen mittels Hochfrequenzenergie (HF-Energie) seit einigen Jahren ein gängiges operatives Verfahren und zeigt bei strenger Indikationsstellung gute klinische Ergebnisse [28,85,130,160,161].

Basierend auf diesen viel versprechenden Ergebnissen fand die Methode der HF-Applikation bereits eine weite klinische Verbreitung in der Kreuzbandchirurgie. Das elongierte VKB mit seiner erhaltenen Kontinuität und seinen intakten anatomischen Insertionsstellen scheint die ideale Indikation zur Anwendung von HF-Energie zur Verkürzung und damit Wiederherstellung der klinischen Funktionsfähigkeit zu sein.

Nichtsdestotrotz sind in der Literatur bislang sehr widersprüchliche klinische Ergebnisse nach Verwendung von HF-Energie am VKB dokumentiert [21,35,50,70,110,126,134,139]. Darüber hinaus finden sich lediglich zwei experimentelle in-vivo Arbeiten über die Wirkung von HF-Energie auf das VKB [79,89]. Keine dieser in-vivo Studien beschreibt jedoch die histomorphologischen Veränderungen des VKB über 12 Wochen nach Applikation von HF-Energie hinaus.

Für eine sichere Applikation von HF-Energie in der humanen Kreuzbandchirurgie besteht somit ein großer Bedarf an intensiver Grundlagenforschung, die die histologischen und biomechanischen Veränderungen der Kreuzbänder nach Anwendung von HF-Energie weiter aufklärt.

Die vorliegende Arbeit soll weiteren Aufschluss über die Auswirkung monopolarer HF-Energie auf die histologischen Eigenschaften des elongierten vorderen Kreuzbandes nach 24 Wochen geben. Untersucht werden soll dies anhand der Revaskularisierung, der Zellpopulation und der Veränderung der Kollagentertiärstruktur - dem Kollagen-Crimp.

1.1 Das vordere Kreuzband

1.1.1 Funktion

Das vordere Kreuzband bildet zusammen mit dem hinteren Kreuzband (HKB) den zentralen Bandapparat des Kniegelenkes. Die Bänder führen und stabilisieren die Roll-Gleitbewegung des Kniegelenkes. Dabei sichert das VKB die Tibia vor einer Translationsbewegung und verhindert die anteriore (Sub)luxation der Tibia zum Femur [111].

Alle bisher durchgeführten Untersuchungen zum Spannungsverhalten des VKB haben gezeigt, dass seine Faserbündel sich nicht isometrisch verhalten und die einzelnen Faseranteile nicht kontinuierlich über den gesamten Bewegungssektor angespannt bleiben. Die anteromedialen (AM) Fasern entspringen näher am Drehzentrum des Gelenks und sind über einen breiteren Bewegungssektor gespannt als die posterolateralen (PL) Fasern. Aus diesem Grund wird das AM-Bündel auch als „Führungsbündel“ beziehungsweise „Leitbündel“ bezeichnet, welches das Kniegelenk vergleichsweise konstant in Beugung und Streckung stabilisiert. Die PL-Fasern kommen erst in endgradiger Streckstellung unter Spannung und unterstützen das Kniegelenk ausschließlich in der Streckung. Sie werden somit als „Sicherungsfasern“ bezeichnet [6,8].

Eine weitere wichtige Funktion des VKB bei der Erhaltung der Kniegelenksstabilität ist die Sicherung bei Rotationsbewegungen. Bei einer Innenrotation wickeln sich die Kreuzbänder umeinander und begrenzen auf diese Weise das Bewegungsausmaß des Unterschenkels nach Innen (Innenrotation > Außenrotation). Zusätzlich sind die Kreuzbänder an der Sicherung des Kniegelenkes gegen varische und valgische Kräfte beteiligt (15% varus und 22% valgus). Das VKB spielt jedoch nicht nur eine Rolle bei der passiven Stabilisierung des Kniegelenkes. Im Verankerungsbereich an Femur und Tibia sowie im subsynovialen Bindegewebe besitzt das VKB zahlreiche Mechanorezeptoren. Beschrieben wurde das Vorkommen von Vater–Pacini–Körperchen, Ruffini–Körperchen sowie freien Nervenendigungen. Die Propriozeption der Kreuzbänder hat, als Bestandteil des neuromuskulären Rückkopplungsmechanismus, für die Kinematik des Kniegelenkes große Bedeutung [94,96].

1.1.2 Anatomie

1.1.2.1 Makroskopische Anatomie

Die Kreuzbänder liegen innerhalb der Fossa intercondylaris. Das VKB entspringt fächerförmig an der Innenfläche des Condylus lateralis ossis femoris und verläuft schräg in anteromedialer Richtung nach distal, wo es in der Area intercondylaris anterior tibiaseitig inseriert. Das VKB besteht aus einer Vielzahl von Faserbündeln, die umeinander rotieren. Die femoral-kränial entspringenden Fasern inserieren im anteromedialen Anteil, die femoral-kaudal entspringenden Fasern inserieren im posterolateralen Anteil der tibialen Insertionszone (Abb.1).

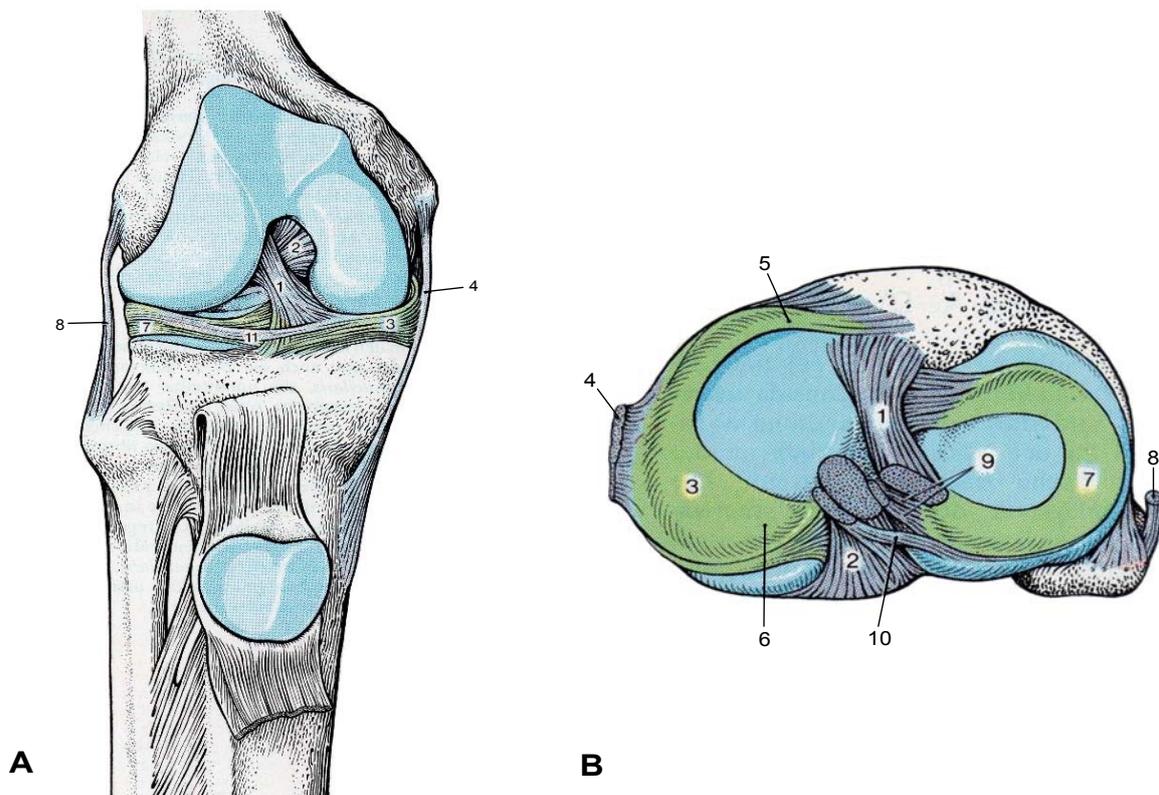


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kreuzbänder im Kniegelenk; **A:** rechtes Kniegelenk, Kreuzbänder von vorn; **B:** Ansicht der Kreuzbänder von oben; 1: das vordere Kreuzband (Lig. cruciatum anterius); 2: das hintere Kreuzband (Lig. cruciatum posterius); 3: der mediale Meniskus; 4: Lig. collaterale tibiale mit den Ansatzstellen; 5: Crus anterius; 6: Crus posterius; 7: der laterale Meniskus; 8: Lig. collaterale fibulare; 9: Lig. menisiofemorale anterius; 10: Lig. menisiofemorale posterius; 11: Lig. transversum genus [74].

Der femorale Ursprung des VKB liegt im posterioren Anteil der Fossa intercondylaris und hat eine ovale Form mit einem Längsdurchmesser von durchschnittlich 18 mm und einem Querdurchmesser von durchschnittlich 11 mm. Unterhalb der Fossa intercondylaris divergieren die Kreuzbandbündel fächerförmig. Die tibiale Insertionszone befindet sich im mittleren Anteil der Area intercondylaris zwischen dem Tuberculum intercondylare mediale und laterale. Ihre Form ist mit einer Ausdehnung von durchschnittlich 17 mm in der Sagittalebene und durchschnittlich 11 mm in der Transversalebene variabel [94,136].

Umgeben sind vorderes und hinteres Kreuzband von einem sie schützenden fettreichen Bindegewebe. Das VKB ist komplett von einer synovialen Scheide umhüllt, demzufolge verläuft das VKB intraartikulär, aber extrasynovial [8,30,32,47,94].

Der Durchmesser des VKB variiert im Verlauf. Im Bereich der Ansatz- und Ursprungsfläche findet man eine Auffächerung; die Kreuzbandmitte ist dagegen wesentlich dünner.

In Studien von Weber (1836) [151], Palmer et al. (1938) [107], Abbot et al. (1944) [1] und Girgis et al. (1975) [47] konnte belegt werden, dass das vordere Kreuzband aus zwei sich kreuzenden Faserbündeln besteht, und zwar aus einem anteromedialen und einem posterolateralen Bündel. In der jüngeren Geschichte beschrieben Norwood et al. (1979) [101] und Amis et al. (1991) [7] ein zusätzliches drittes intermediäres Bündel. Trotz der Studien von Norwood et al. und Amis et al. hat man sich allgemein darauf verständigt, dass das VKB trotz der damit einhergehenden Vereinfachung der komplexen anatomischen Struktur wie auch der biomechanischen Abläufe, als ein „Zwei-Bündel-System“ zu betrachten ist.

1.1.2.2 Mikroskopische Anatomie

1.1.2.2.1 Interzellulärsubstanz

Die Erscheinungsformen des Bindegewebes beruhen auf Unterschieden in den fibrillären und nichtfibrillären Bestandteilen der Interzellulärsubstanz, auch Extrazellulärsubstanz oder -matrix (EZM) genannt.

Bänder besitzen hoch spezialisierte mechanische Eigenschaften, mit welchen sie an die mechanischen Anforderungen ihrer Umgebung hervorragend angepasst sind. So verfügt zum Beispiel das VKB über ein großes Elastizitätsmodul, das wiederum eine hohe Zugbeanspruchung ermöglicht. Die biomechanischen Eigenschaften werden durch die spezielle Zusammensetzung, Organisation und Interaktion von folgenden Matrixbestandteilen gewährleistet [6,30]:

A Bindegewebsfasern

Dieser solide Anteil liegt in einer sehr geordneten Struktur beziehungsweise einem hohen Ordnungsgrad der Makromoleküle vor und wird aus den Strukturproteinen Kollagen und Elastin aufgebaut.

Aa Kollagen

Hauptbestandteil der EZM des VKB ist mit 75% der Trockensubstanz das Kollagen.

Kollagen Typ I gehört mit 90% zu den überwiegend vorhandenen Kollagenfasern, zudem findet man Kollagen Typ III (10%) und zu einem geringen Anteil filamentäres Kollagen IV und VI [6,100]. Die Typ I positiven Kollagenfibrillenbündel werden von lockerem Bindegewebe, in denen die Kollagen Typ III Fasern vorkommen, umgeben. Diese Zusammensetzung und Anordnung hat eine funktionelle Bedeutung:

Das Vorkommen von Typ I - Kollagen gewährleistet die hohe Zugfestigkeit des VKB, Kollagen Typ III erlaubt mit seinen hohen viskoelastischen Eigenschaften insbesondere die Rekrutierung von Faserbündeln in unterschiedlichsten Kniegelenkstellungen [113,135].

Das Kollagen Typ I wird von den Fibroblasten exprimiert und gehört zu den Skleroproteinen, den sogenannten Gerüstproteinen. Die Grundeinheit einer Kollagenfibrille stellt dabei das Tropokollagen (Tripelhelix) dar. Dabei handelt es sich um ein heterotrimeres Molekül, welches aus drei linksgängigen α -Ketten besteht, von denen zwei in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind: $[\alpha 1(I)]_2 [\alpha 2(I)]$ (Abb. 2). Eine Polypeptidkette setzt sich dabei aus zirka 1.000 Aminosäuren zusammen und bildet die Primärstruktur des Kollagens. Jeweils drei Ketten winden sich zu einer rechtsgängigen Tripelhelix umeinander, für die sich eine Gesamtgröße von 300 kDa ergibt [10,71,109].

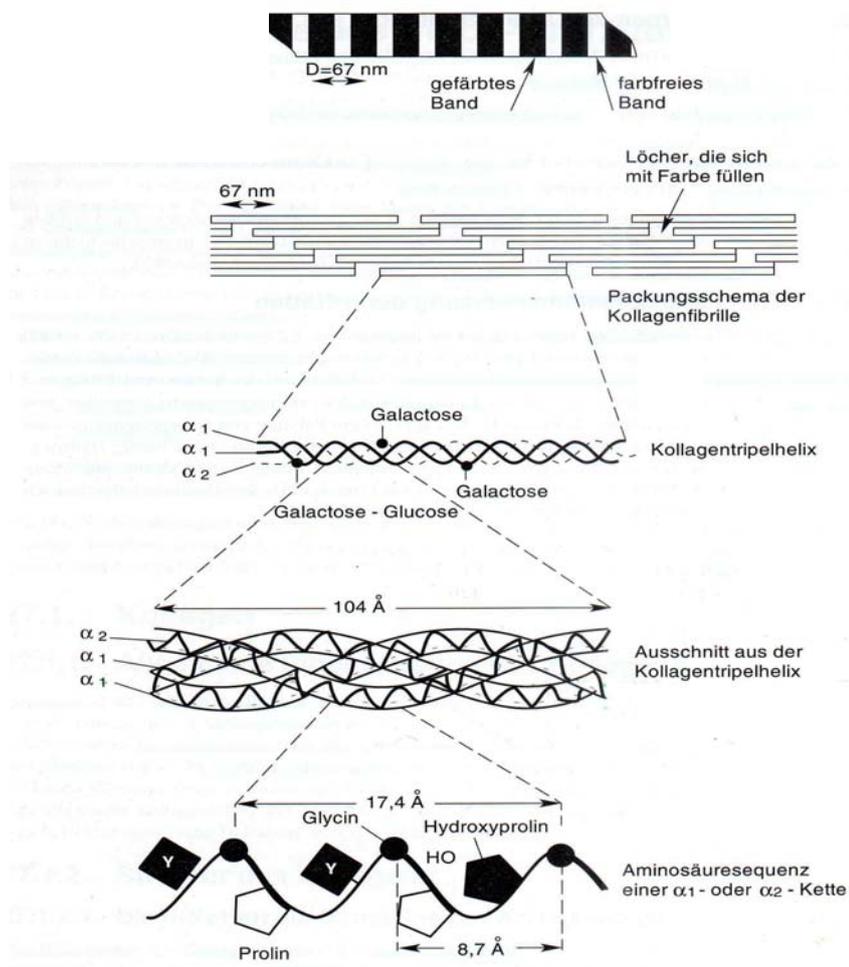


Abbildung 2: Die Strukturhierarchie des Kollagens von der Aminosäuresequenz bis zur Kollagenfibrille [65].

Die Besonderheit der Primärstruktur der Polypeptidketten liegt in der regelmäßigen Anordnung der Aminosäuren. Man kann das Kollagen ebenfalls als ein Polymer von Tripeptideinheiten mit einer repetitiven G-X-Y Zusammensetzung auffassen. So findet man an jeder dritten Position Glycin in der Sequenzeinheit Gly-X-Y. Dabei steht Prolin häufig an Stelle X; an Stelle Y findet sich 5-Hydroxylysin oder 4-Hydroxyprolin.

Die Kollagensynthese erfolgt in mehreren Stufen und beginnt intrazellulär in den Fibroblasten mit der Biosynthese von Prokollagen am rauen endoplasmatischen Retikulum. Die von den Fibroblasten gebildeten rechtsgewundenen Tripelhelices (Prokollagen) werden aus den Fibroblasten ausgeschleust. Direkt nach der Sekretion aus der Zelle erfolgt die Abtrennung der Prosequenzen durch eine N- bzw. C-Proteinase, wodurch aus dem Prokollagen assemblierungsfähiges Tropokollagen (3-4 nm) entsteht. Dieses Phänomen der Selbstassemblierung liegt unter Normalbedingungen (Raumtemperatur, neutraler pH-Wert) darin begründet, dass die in einer Fibrille angeordneten Kollagenmoleküle thermodynamisch stabiler sind als in freier Form. Unter Einwirkung der Zugspannungen erfolgt die Kristallisation der 10-100 nm langen Mikrofibrillen zu 200-400 nm langen Kollagenfibrillen. Diese wiederum lagern sich ebenfalls zusammen und formieren sich zu den eigentlichen kollagenen Fasern (1-10 µm). Diese sind miteinander vliesartig verwoben und bilden die Matrix des VKB (Abb. 3).

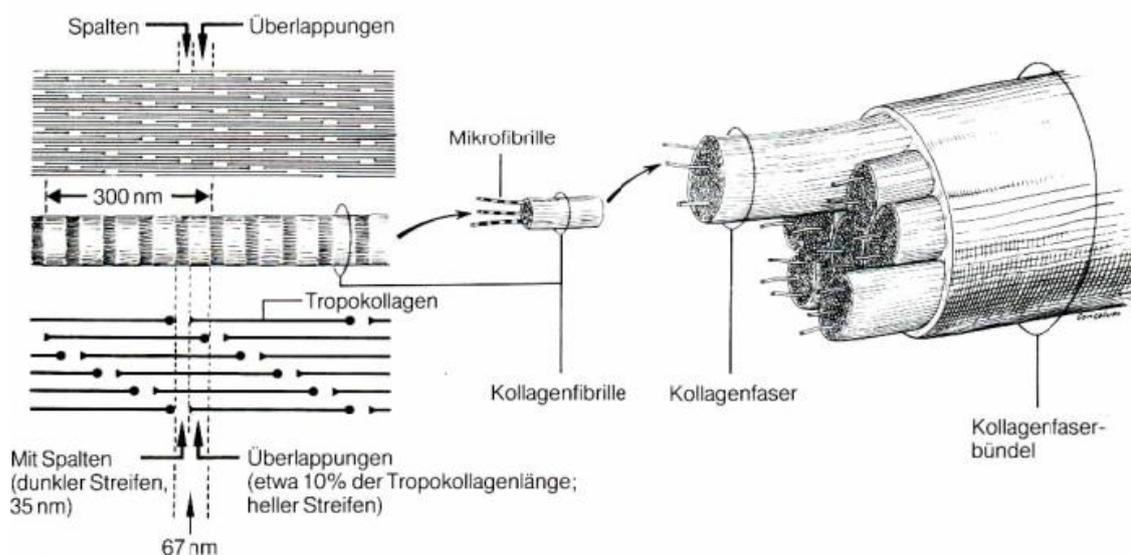


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Kollagenfaserbündels [73].

Während der Fibrillogenese ordnen sich die Tropokollagenmoleküle nicht bündig an, sondern um 64 nm versetzt. Daraus ergibt sich ein charakteristisches Querstreifenmuster entlang der Fibrille, die so genannte D-Periodizität (Abb. 2).

Die Kollagenfasern haben in Faserrichtung eine wellenartige Struktur, den so genannten Kollagen-Crimp, der eine gewisse Dehnung der Struktur des VKB zulässt, ohne dass die Fasern Schaden nehmen.

Ab Elastin

Das Skleroprotein der elastischen Fasern ähnelt in der Aminosäurezusammensetzung dem Kollagen (reich an Prolin und Glycin). Das VKB enthält zu einem geringen Anteil Elastin (< 5%). In der elektronenmikroskopischen Vergrößerung ist zu erkennen, dass die elastischen Fasernetze aus zirka 10 nm dicken Mikrofibrillen aufgebaut sind, die unter Einbau von Elastin granula zunehmend zu dickeren Elastinsträngen vernetzt werden. Diese elastischen Fasernetze verleihen dem Gewebe seine dehnbaren Eigenschaften [18,19,66].

B Grundsubstanz

Die nichtfibrillären, in der Regel lichtmikroskopisch amorphen zwischenzelligen Substanzen werden Grundsubstanz oder auch Kittsubstanz genannt. In der Hauptsache besteht sie aus interstitieller Flüssigkeit, aus Proteoglykanen und aus den Glykoproteinen Fibronectin und Laminin.

Ba Proteoglykane

Bei Proteoglykanen überwiegt der Polysaccharidanteil gegenüber dem Proteinanteil. Beim VKB machen sie weniger als 1% des Trockengewichtes aus. Proteoglykane verleihen der interstitiellen Flüssigkeit visköse bis feste Eigenschaften. Sie machen Bindegewebsstrukturen plastisch verformbar oder elastisch formkonstant [17,19,95].

Bb Glykoproteine

Glykoproteine sind im Organismus weit verbreitet. Sie kommen unter anderem als Bausteine biologischer Membranen vor. Glykoproteine der Grundsubstanz sind

Fibronectin und Laminin. Sie ermöglichen die Adhäsion von Zellen sowie die von Zellen mit ihren Nachbarstrukturen [19,42].

Bc Interstitielle Flüssigkeit

Das VKB besteht zu über 60% seines Feuchtgewichts aus Wasser. Im Zusammenspiel mit der Grundsubstanz sowie den Proteoglykanen sorgt dies für ein „Gleiten“ der kollagenen Fasern, was dem VKB sein typisches viskoelastisches Verhalten verleiht [6,42].

1.1.2.2.2 Zelluläre Bestandteile

Der dominierende Zelltyp im VKB ist der Fibrozyt. Der Fibrozyt ist die in ihrer Aktivität reduzierte, aber keineswegs inaktive Bindegewebszelle. Die hochaktive Grundsubstanz und Fasern bildende Bindegewebszelle ist der Fibroblast; dieser tritt im wachsenden Bindegewebe auf. Als fixe Bindegewebszelle reguliert der Fibrozyt den Auf- und Abbau der EZM.

Entlang des longitudinalen Verlaufes des VKB liegen die Fibrozyten perlschnurartig zwischen den kollagenen Fasern. Ihre Morphologie variiert je nach Aktivitätszustand. Eine spindelförmige Form zeigt einen wenig aktiven Fibrozyten; hingegen signalisieren runde oder ovoide Zellen die starke Syntheseaktivität der Fibroblasten.

In wechselnder Anzahl finden sich weiterhin freie Zellen, wie zum Beispiel Histiozyten, Mastzellen, Plasmazellen und diverse Granulozyten, deren Hauptaufgabe in der Immunabwehr besteht [6,136].

1.1.2.3 Physiologische Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes

Die Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes erfolgt hauptsächlich über die Arteria media genus, die aus der Arteria poplitea entspringt. Im tibialen Anteil erhält das VKB seinen arteriellen Zufluss aus Endästen der Arteria inferior medialis genus [5,6].

Die Blutgefäße gelangen durch den infrapatellären Fettkörper und bilden jeweils proximal und distal ein periligamentäres Netzwerk. Von diesem synovialen Gefäßnetz aus durchdringen die Blutgefäße das VKB. Die Ausrichtung der Blutgefäße erfolgt entlang der Längsachse des Bandes.

Innerhalb des VKB besteht eine inhomogene Verteilung der Blutgefäße. Im Bereich der chondral apophysären Insertionszone sowie in den distalen Faserknorpelzonen sind keine Blutgefäße nachweisbar. Ebenso fehlen ossär-ligamentäre Gefäßanastomosen, jedoch konnten Anastomosen der periligamentären Synovialis mit dem Periost sowie dem endostalen Raum nachgewiesen werden. Die Gefäßdichte im Bereich der Mitte des VKB ist geringer als im tibialen und femoralen Ansatzbereich [111] (Abb. 4).

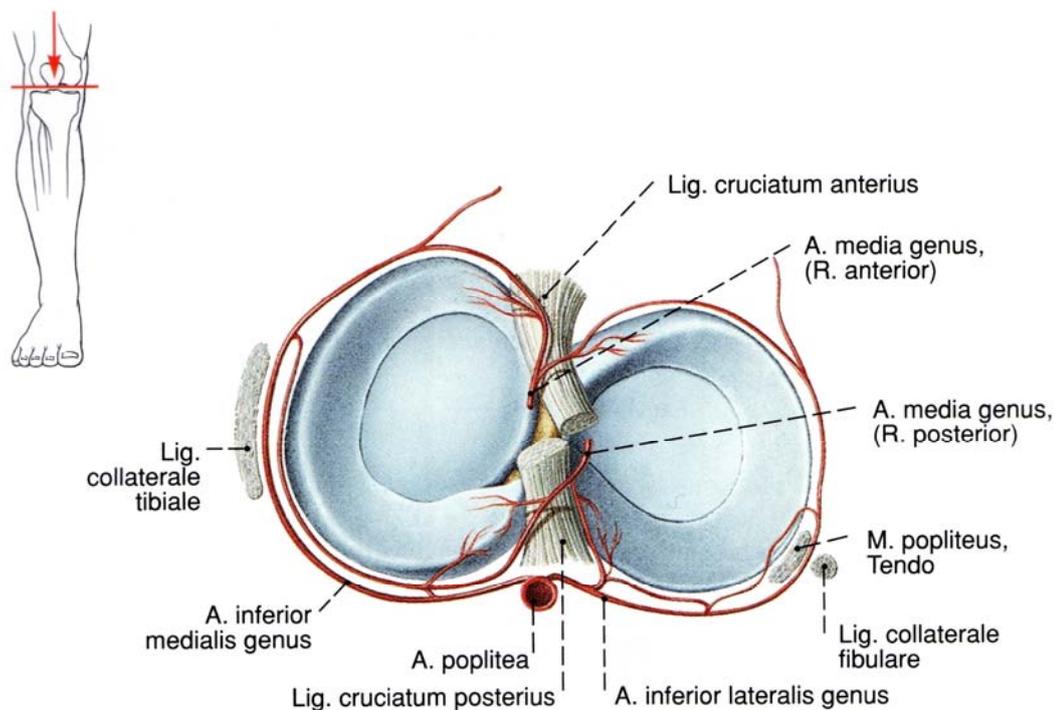


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des VKB [74].

1.2 Elektrochirurgie

1.2.1 Geschichtliche Entwicklung der Elektrochirurgie

Schon in der Antike wurde thermische Energie gezielt für chirurgische Zwecke genutzt. Schriftliche Überlieferungen belegen, dass bereits 3.000 v.Chr. die Ägypter Tumoren mittels Kauterisation behandelten und zum Glühen gebrachte Messer zur Erleichterung einer Amputation verwendeten. Aber erst die Erforschung und Durchdringung der Eigenschaften des elektrischen Stroms in der Neuzeit eröffnete neue und effektive Möglichkeiten, thermische Energie für medizinische Zwecke zu nutzen.

Die allgemeinen wissenschaftlichen Grundlagen der Elektrizitätslehre wurden von Wissenschaftlern wie Luigi Galvani (1737-1798) mit seinem bekannten Froschschenkelexperiment, von Alessandro Volt (1745-1827) mit der Entwicklung der galvanischen Zelle als Stromquelle sowie von Michael Faraday (1791-1867) und Joseph Henry (1797-1878) mit ihren Arbeiten zum Elektromagnetismus und zur Selbstinduktion gelegt. Diese neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse fanden nun auch in der Medizin Anwendung. So nutzte beispielsweise der Wiener Zahnarzt Moritz Heider ab 1845 thermische Energie zum Abtöten von Zahnwurzeln. Nach und nach begannen vornehmlich Ärzte in ganz Europa mit thermischer Energie zu arbeiten [114,120]. Weitere Möglichkeiten für den Einsatz von Wärmequellen in der chirurgischen Praxis eröffneten sich mit den Arbeiten von Nikola Tesla (1856-1943) und Jacques-Arsène d'Arsonval (1851-1940) zu den Problemen hochfrequenter Wechselströme. Voraussetzung für eine umfassende Nutzung dieser neuen Technik waren zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts die Entwicklung von Hochfrequenzgeneratoren, insbesondere die Entwicklung der Röhrengeneratoren in den 1920er Jahren. Das Zeitalter der HF-Chirurgie hatte begonnen. Dank dieser Erkenntnisse konnte Rivière in Paris über Erfolge bei der Funkenbehandlung von Geschwülsten und tuberkulösen Hauterkrankungen berichten. Pozzi bezeichnete dieses Verfahren als Fulguration (lat. Fulgur, Blitz); eine Bezeichnung, die für die quasi berührungslose Wärmeübertragung mittels elektrischen Stroms auf den Patienten gängig ist. In diesem Zusammenhang berichtete Eugène L. Doyen über ein bipolares Verfahren zur „Elektrokoagulation“ bösartiger Tumoren. Mit der dann einsetzenden Entwicklung spezieller Röhrengeneratoren durch George A. Wyeth und des

Amerikaners William T. Bovie wurde die elektrochirurgische Gewebedurchtrennung möglich [92,120,125].

In Deutschland erwarb sich insbesondere Hans von Seemen (1898-1972) mit seinem 1932 erschienen Buch „Allgemeine und spezielle Elektrochirurgie“ große Verdienste bei der Einführung der neuen Methode. Im Jahre 1955 wurde das erste vollelektronische, auf Röhrenbasis entwickelte Universalgerät für die HF-Chirurgie angeboten. Einen weiteren Qualitätssprung in der Geräteentwicklung ermöglichte die Nutzung der Halbleitertechnologie (Transistoren). Seit Anfang der 1990er Jahre werden mikroprozessorgesteuerte HF-Chirurgiegeräte eingesetzt. In der Regelungstechnik ergaben sich dadurch völlig neue Möglichkeiten.

Die Geräte der heutigen Zeit sind hinsichtlich ihrer Bedienung sehr komplex, dem trug die weitere Entwicklung der Bildschirm-Geräte mit menügeführten Bedienoberflächen weitgehend Rechnung.

1.2.2 Physikalische und technische Grundlagen

1.2.2.1 Bioelektrische Wirkung

Unter dem Begriff der Elektrochirurgie versteht man den Einsatz elektrischer Energie zur thermischen Veränderung oder Zerstörung von Gewebezellen mit dem Ziel einer Hämostase (Blutstillung), Gewebedurchtrennung oder -versiegelung.

Die HF-Chirurgie baut auf dem Joule'schen Gesetz auf. Jedes biologische Gewebe enthält eine mehr oder weniger hohe Konzentration an Elektrolyten, wodurch das jeweilige Gewebe leitfähig ist. Die pro Gewebevolumen V entstehende Wärmeleistung Q ist nach dem Joule'schen Gesetz direkt proportional zum spezifischen Widerstand ρ und dem Quadrat der Stromdichte j .

$$\Delta Q = \rho \times j^2 \times \Delta v \times \Delta t$$

Fließt elektrischer Strom durch biologisches Gewebe, treten je nach Stromart, Stromstärke und Frequenz drei unterschiedliche Effekte auf:

1. Elektrolytischer Effekt (Gleichstrom und niederfrequenter Wechselstrom)

Bei Gleichstrom und niederfrequenten Wechselströmen dominiert der elektrolytische Effekt, das heißt es kommt zu einer Ionenverschiebung im Gewebe. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die positiv geladenen Ionen (Kationen) zur Kathode, die negativ geladenen Ionen (Anionen) zur Anode. Dieser Effekt wird in der Medizin bei der Iontophorese genutzt, um bestimmte Medikamente in den Körper einzuschleusen. In der HF-Chirurgie ist dieser Effekt nicht erwünscht, da das Gewebe dadurch elektrolytisch geschädigt werden kann.

2. Faradayscher Effekt (Wechselstrom < 20Hz)

Fließten Wechselströme mit einer Frequenz von bis zu 20 Hz durch biologisches Gewebe, entsteht der faradaysche Effekt. Ströme innerhalb dieses Frequenzspektrums reizen Nerven- und Muskelzellen, sodass es zu Muskelkontraktionen kommen kann. Der faradaysche Effekt wird in der Reizstromdiagnostik und der Reizstromtherapie sinnvoll genutzt (zum Beispiel bei Muskellähmungen). In der HF-Chirurgie ist dieser Effekt nicht erwünscht, da Muskelkontraktionen für den Patienten unangenehm, sogar gefährlich, und für den Chirurgen hinderlich sein können.

3. Thermischer Effekt (Wechselstrom > 300kHz)

Mit hochfrequenten Wechselströmen werden im biologischen Gewebe sowohl der elektrolytische als auch der faradaysche Effekt weitgehend vermieden; es dominiert der thermische Effekt. Der hochfrequente Wechselstrom (bevorzugt 350 kHz bis 1 MHz) wird mittels geeigneter Instrumente in das zu behandelnde Gewebe geleitet. Aufgrund des bestehenden Gewebewiderstandes kommt es zu einer thermischen Gewebewechselwirkung, das heißt der in das jeweilige biologische Gewebe eingeleitete hochfrequente Wechselstrom versetzt die einzelnen Elektrolyte in Schwingungen, die daraus resultierende Reibung erzeugt die elektrische Widerstandswärme [26,99,102,105,144].

Die Erwärmung ist dabei vom spezifischen Widerstand des Gewebes, von der Stromdichte, der Elektrodengröße sowie der Einwirkungsdauer abhängig.

Der thermische Effekt wird hauptsächlich für zwei verschiedene Anwendungen genutzt: das Schneiden und das weitaus häufiger verwendete Koagulieren [92,125].

1.2.2.2 Hochfrequenzapplikationstechnik

In der Hochfrequenzchirurgie werden für die arthroskopische Anwendung folgende Formen unterschieden:

1. Monopolare Operationstechnik:

Bei der monopolaren Operationstechnik fließt der elektrische Strom von der kleinflächigen aktiven Elektrode zu der großflächigen passiven beziehungsweise neutralen Elektrode. Der Körper des Patienten ist dabei immer ein Teil eines geschlossenen Stromkreises. Die Gewebetrennung oder Koagulation erfolgt an der aktiven Elektrode. Die Kontaktfläche zwischen Neutralelektrode und der Haut des Patienten ist groß, damit die Stromdichte (Strom pro Fläche) relativ gering bleibt. Dagegen bietet die aktive Elektrode nur eine kleine Kontaktfläche, woraus eine sehr hohe Stromdichte resultiert. Nur aufgrund der hohen Stromdichte und des Gewebewiderstandes kann eine selektive Erwärmung, das heißt eine hohe Temperatur durch die aktive Elektrode im Gewebe entstehen [49,80].

2. Bipolare Operationstechnik:

Bei der bipolaren Operationstechnik fließt der Strom zwischen zwei je nach Anwendung (Schneiden oder Koagulation) flächenmäßig gleich oder unterschiedlich großen gepaarten Elektroden. Bei der Anwendung ist nur ein kleiner Teil des Gewebes zwischen den Elektroden in den Stromkreis eingeschlossen. Das bedeutet, dass der Strom nur in dem eng umschriebenen Gewebereich zwischen den beiden Elektrodenspitzen fließt [118].

1.2.3 Thermische Stabilität des Kollagens

Im vorderen Kreuzband verleihen intra- und intermolekulare Quervernetzungen den kollagenen Fasern thermische sowie biomechanische Stabilität und machen es resistent gegenüber körpereigenen Kollagenasen [149].

Der Vorgang der thermischen Kollagenverkürzung wurde bereits in einer Vielzahl von experimentellen Studien untersucht [3,37,41,51,66,146]. 1958 veröffentlichte Flory et al. erstmalig eine deskriptive Erläuterung über den Mechanismus der Kollagenverkürzung. Seiner Ansicht nach erfährt das Kollagen Typ I nach Applikation von thermischer Energie eine Umwandlung von einem Zustand hoher Ordnung, ähnlich dem Aufbau von Kristallen, in einen ungeordneten, amorphen Zustand. Nachweisen konnte er dies mit dem Verlust der Röntgenbeugung sowie der optischen Doppelbrechung des Kollagens [39]. Spätere Studien veranschaulichen, dass das Kollagen durch Wärmeapplikation eine irreversible Transformation eingeht. Bei der Applikation von thermischer Energie, unabhängig von der Art der Wärmequelle (HF-Energie, Laserenergie, Wärmebad), kommt es in einem für das native Kollagen „kritischen“ Temperaturbereich von ungefähr 65°C - 75°C zu einem Aufbrechen seiner hitzelabilen *intramolekularen* Wasserstoffbrückenbindungen, der so genannten Denaturierung oder Entwindung der Tripelhelix [22,23,51,66,97]. Im Gegensatz dazu bleiben die meisten *intermolekularen* Verbindungen zwischen den Helices erhalten [3,12,37,81,148] (Abb. 5).

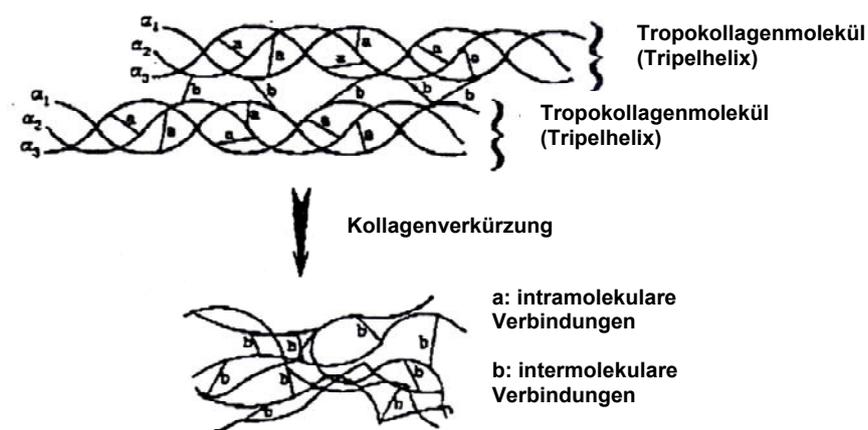


Abbildung 5: Molekularer Mechanismus der Kollagenverkürzung: Die intramolekularen Verbindungen innerhalb des Tropokollagenmoleküls brechen auf, hingegen bleiben die intermolekularen zwischen den einzelnen Tropokollagenmolekülen erhalten [9].

Haben sich ausreichend viele Tripelhelices entwunden, kann eine sichtbare Gewebeverkürzung verbunden mit einer gleichzeitigen Querschnittsausdehnung der Fasern beobachtet werden [39,84,148] (Abb. 6).

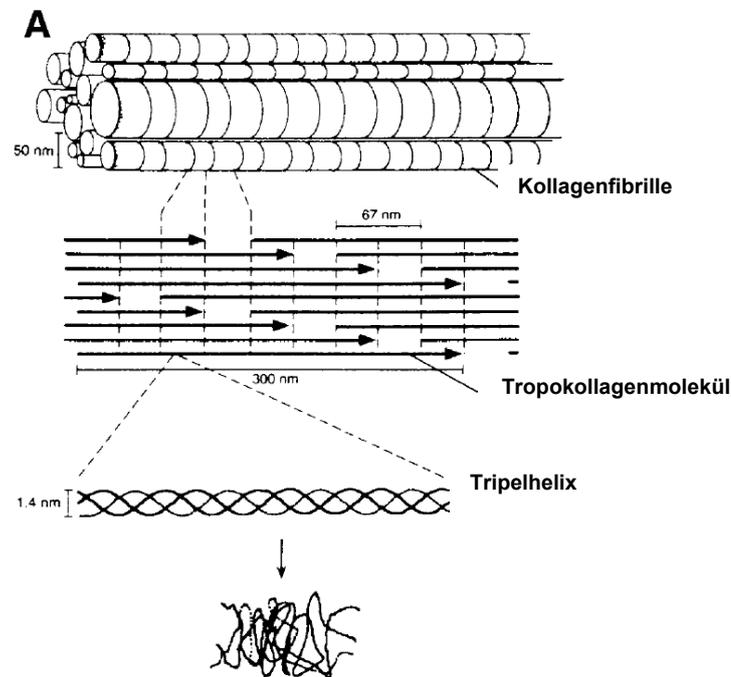


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kollagenverkürzung [149].

Das Ausmaß der Gewebeverkürzung von kollagenhaltigem Gewebe nach Applikation von thermischer Energie variiert je nach Art, Alter, pH- und Elektrolytwert, Konzentration- und Ausrichtung der Kollagenfasern sowie Wassergehalt des Gewebes [23,84]. Ebenso ist die Erwärmung der Gewebeprobe abhängig vom spezifischen Widerstand des Gewebes, von der Stromdichte, der Dauer der Applikation, vom Typ (monopolar oder bipolar), der Größe und Form der Elektrode sowie der mechanischen Belastung während der Applikation der thermischen Energie [9,45,55,148,157].

Bei einem gesteigerten Gehalt an kollagenen Fasern, einer strengen Bündelung und Ausrichtung der kollagenen Fasern sowie bei einer Zugbeanspruchung während der thermischen Applikation wird zur Gewebeverkürzung eine höhere Temperatur benötigt. Eine Erklärung sieht man in der Zunahme der Anzahl der hitzestabilen kovalenten Bindungen [22,39,66,132]. Die thermischen Eigenschaften der anderen Makromoleküle der EZM sind nicht genau bekannt, aber es hat sich gezeigt, dass gereinigtes Kollagen Typ I eine geringere Shrinkage-Temperatur benötigt (42°C-45°C).

In der Phase der Geweberegeneration haben sowohl die histomorphologischen als auch die ultrastrukturellen Veränderungen einen unmittelbaren Einfluss auf die Biomechanik des behandelten kollagenen Gewebes.

1.2.4 Gewebereaktion auf thermische Energie

Wärmeeinwirkung auf biologisches Gewebe führt nicht nur zu einer Veränderung der Ultrastruktur des Kollagens, sondern beeinflusst das gesamte histomorphologische Erscheinungsbild. Die Veränderungen von kollagenhaltigem Gewebe nach Applikation von HF-Energie lässt sich qualitativ einteilen:

Temperaturen von bis zu 45°C führen zu einer reversiblen Schädigung der zellulären Bestandteile in Abhängigkeit von der Dauer der thermischen Einwirkung [9]. Bei Temperaturen von über 45°C kommt es zu einer irreversiblen Zellschädigung. Der Effekt der Verkürzung des kollagenen Gewebes, das so genannte Shrinkage, lässt sich bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf zirka 65°C - 75°C beobachten [9,34,45,54,55,59,63]. Eine Dehydratation des Gewebes erfolgt bei 100°C. Mit einer Gewebekarbonisation ist bei einer Temperatur von 200°C zu rechnen (Tab.1).

Temperatur	Gewebereaktion
Bis ca. 40°C	Keine signifikanten Zellschädigungen
Ab ca. 40°C	Reversible Schädigungen abhängig von der Expositionsdauer
Ab ca. 45°C	Irreversible Zellschädigung
ab ca. 65 -70°C	Koagulation. Verkürzung kollagenen Gewebes – „Shrinkage“, Hämostase blutender Gefäße
ab ca. 100°C	Dehydratation/Desikkation (Austrocknung): Phasenübergang der intra- und extrazellulären Flüssigkeit von flüssig in gasförmig; Schrumpfung des Koagulates nach Dehydratation
ab ca. 200°C	Karbonisation und pathologische Verbrennungen 4.Grades

Tabelle 1: Übersicht der allgemeinen Gewebereaktion bei unterschiedlich applizierten Temperaturen.

Mitte der 1990er Jahre wurden zum Thema der Gewebeverkürzung durch HF-Energie eine Vielzahl von in vitro und in vivo Studien veröffentlicht [2,54,55,57,59-61,86,98,116,122].

1998 untersuchte Hecht et al. in einer der ersten in vivo Studien die histomorphologischen Veränderungen der glenohumoralen Gelenkkapsel nach arthroskopischer Applikation monopolarer HF-Energie am Schafsmodell [62]. Unmittelbar nach der Applikation ist das kollagenhaltige Gewebe durch eine diffuse Hyalinisierung in Form einer Koagulationsnekrose mit Pyknose der Fibroblasten- und Endothelzellkernen gekennzeichnet. In den tiefer gelegenen subsynovialen Schichten lassen sich thrombosierte Gefäße nachweisen.

Nachfolgende Studien konnten einen Regenerationsbeginn der hyalinisierten, azellulären Bezirke im Rahmen einer entzündlichen Gewebereaktion je nach Gewebeart und Versuchstier spätestens nach zwei bis vier Wochen nachweisen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Revaskularisierung von den HF unbehandelten Gewebebereichen ausgeht. Die neu einwandernden Fibroblasten nutzen das avitale „hyalinisierte“ Kollagen als ein Gerüst zur Migration und Synthese der neuen ECM [57]. Das avitale Gewebe wird durch zell- und gefäßreiches Bindegewebe ersetzt. Im weiteren Verlauf zeigt das behandelte Gewebe nach insgesamt zirka drei Monaten wieder seinen ursprünglichen laminaren Kollagenaufbau [52,62,86].

Innerhalb dieser Zeit der Regeneration, vor allem in den ersten zwei bis drei Wochen, nehmen die histologischen und auch ultrastrukturellen Veränderungen einen unmittelbaren Einfluss auf die Biomechanik des behandelten Gewebes [115,122,150]. Wallace et al. konnte in einer tierexperimentellen Studie zeigen, dass das artifiziiell elongierten medialen Kollateralbandes nach drei Wochen eine erhebliche biomechanische Schwächung erfährt [150]. Schaefer et al. berichtet nach einer Gewebeverkürzung von etwa 6% sowohl von einer Reduktion der Festigkeit um 19% als auch einer pathologischen Längenzunahme über das präoperative Maß hinaus.

1.2.5 Monopolare Hochfrequenzenergie in der Kniegelenkschirurgie

Elektrochirurgische Verfahren wurden anfänglich in der Urologie und Allgemeinchirurgie in Form von monopolarer Hochfrequenzenergie zur Blutstillung eingesetzt [121,127]. Heute kommt monopolare HF-Energie in der arthroskopischen Kniegelenkschirurgie zur Resektion von Menisken, Durchtrennung von Verwachsungen, Retinakulumspaltung, Plicaresektion, Abtragung von Vernarbungen sowie Meniskus- und Knorpelglättung zum Einsatz.

Mit dem Wissen aus der Schulterchirurgie, dass bei Schulterinstabilitäten die Verkürzung der Kapsel-Band-Strukturen mit Hilfe der HF-Energie ein erfolgreiches operatives Verfahren ist, wurde die Anwendung von HF-Energie in klinische Bereiche der Kreuzbandchirurgie eingeführt. Aufgrund der einfachen Handhabung und der allgemeinen Verfügbarkeit ist die monopolare HF-Energie ein ideales Instrument, durch das sich eine Kreuzbandrekonstruktionen vermeiden und das Kreuzband durch Verkürzung stabilisieren lässt, und zwar sowohl bei isolierter Kreuzbandelongation als auch bei unter Elongation verheilten Partialrupturen sowie an elongierten VKB-Transplantaten [29,33,138,160]. In der aktuellen Literatur zur Verwendung von HF-Energie am VKB finden sich hingegen sehr widersprüchliche klinische Ergebnisse.

1.3 Ziel der Untersuchung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die histomorphologischen Veränderungen des elongierten und klinisch insuffizienten vorderen Kreuzbandes nach Applikation von HF-Energie weiter aufzuklären.

Hierzu wurden Zellpopulation, Kollagentertiärstruktur - dem Kollagen-Crimp - sowie Gefäßstatus des nativen vorderen Kreuzband mit den Veränderungen nach je 24 Wochen Standzeit im rein elongierten (Gruppe A), sowie dem elongierten und thermisch behandelten VKB (Gruppe B) verglichen.

In vorangegangenen tierexperimentellen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe am Schafmodell zeigen, dass ein freies Sehnentransplantat als VKB-Ersatz nach 24 Wochen die histomorphologischen und die biomechanischen Eigenschaften des nativen VKB nahezu wieder erreicht hat [142,153-156]. Daher wurde die Standzeit der Tiere in der vorliegenden Untersuchung auf 24 Wochen festgelegt.

Die vorliegende Studie sollte somit aufklären, in wie weit die thermische Verkürzung des elongierten VKB mittels Hochfrequenzenergie klinisch als Alternative zum VKB-Ersatz angewendet werden kann. Die Wertigkeit dieses Verfahrens ist unter anderem daran zu messen, wie schnell sich das elongierte, HF-behandelte VKB im Vergleich zum VKB-Transplantat regeneriert, das heißt die histomorphologischen Eigenschaften des nativen VKB wieder erreicht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeiner experimenteller Aufbau

Im Rahmen der Studie wurden zur Simulation einer vorderen Kreuzbandelongation 16 weibliche ausgewachsene Merinoschafe mit einem mittleren Gewicht von 53,8 kg (\pm 8,5 kg) am linken Kniegelenk operiert (Abb. 7). Zur standardisierten Entwicklung dieses Tiermodells wurden im Vorfeld der Hauptversuche acht Tiere im Rahmen von Vorversuche operiert. Die Tiere wurden über einen eingetragenen Züchter¹ bezogen und befanden sich bei Aufnahme in einem guten physischen Zustand. Die Tiere wurden 2-3 Tage vor dem operativen Eingriff im institutionseigenen Schafstall untergebracht. Die Haltung erfolgte in einem Laufstall mit Stroheinstreu und jahreszeitlichem Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Fütterung bestand aus Heu und Wasser ad libitum.

Präoperativ erfolgte die radiologische Beurteilung der Wachstumsfuge des linken Kniegelenkes. Tiere mit erkennbarer Wachstumsfuge wurden aussortiert und gegen ausgewachsene Schafe ausgetauscht.



Abbildung 7: Versuchstiere in der tierexperimentellen Abteilung der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité, Campus Virchow.

Nach der Operation waren die Tiere bis zu 7 Tage in der tierexperimentellen Einrichtung untergebracht. Anschließend wurden sie für die verbleibende Zeit auf ein Außengelände der Charité transferiert. Postoperativ erfolgten nach standardisierten Protokollen röntgenologische Verlaufskontrollen (siehe 7.4).

Die tierexperimentelle Arbeit wurde mit behördlicher Genehmigung für Tierversuche (G 0208-99, 16.11.1999) durchgeführt.

¹ Schlacht -und Lohnbetrieb Johann Nesges; Liedekahle 22; 15936 Görsdorf

Während des gesamten Versuchszeitraumes befanden sich die Tiere unter tierärztlicher und tierpflegerischer Kontrolle der tierexperimentellen Abteilung der Charité / Campus-Virchow.

2.1.1 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei gleich große Gruppen zu je acht Tieren aufgeteilt. In beiden Gruppen wurde bei allen Tieren das linke Kniegelenk operiert. In der Gruppe A (VKB_{elongiert}) erfolgte die operative Elongation des VKB. In der Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}) wurde das VKB ebenfalls elongiert und darüber hinaus mit HF-Energie behandelt. Als Kontrollgruppe (VKB_{nativ}) dienten 8 native vordere VKB der Gegenseite. Weitere 8 native VKB (VKB_{nativ+HF}) der Gegenseite wurden für eine HF-Behandlung zum Zeitpunkt Null verwendet (Tab. 2). Zwischen den Gruppen bestanden weder signifikante Alters- noch Gewichts- oder Haltungsunterschiede.

	Kontrolle (VKB _{nativ})	Gruppe A (VKB _{elongiert})	Gruppe B (VKB _{elongiert+HF})	VKB _{nativ+HF}
Anzahl der Tiere	8	8	8	8
Elongation VKB	-	+	+	-
HF-Behandlung	-	-	+	+
Standzeit/Wochen	-	24	24	-

Tabelle 2: Gruppeneinteilung.

Die Tötung der Schafe erfolgte nach einer Standzeit von 24 Wochen. Nach der Tötung und der Explantation der Kniegelenke wurde die biomechanische Testung der Kreuzbänder durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss daran konnte das VKB vollständig entnommen werden und die histologische Aufarbeitung begann. Sie wird im Folgenden erläutert.

Von Mitdoktoranden wurden daneben spezielle Fragestellungen zur Biomechanik des elongierten VKB nach HF - Behandlung untersucht.

2.2 Operativer Ablauf

2.2.1 Präoperative Maßnahmen

Zur Sedierung wurden über eine Venenverweilkanüle² im Bereich des rechten Vorderlaufs zunächst 20mg/kg Thiopental-Natrium³ verabreicht. Die Tiere konnten daraufhin in rechter Seitenlage auf dem Operationstisch gelagert werden. Anschließend erfolgte das großflächige Rasieren des linken Hinterlaufs inklusive des Achillessehnenbereiches und das mehrfache Abwaschen des Operationsgebietes. Zur Unterscheidung in den einzelnen Gruppen erhielten die Tiere durch den Tierpfleger eine Ohrmarke.

Nach erneuter Gabe von 20mg/kg Thiopental-Natrium erfolgte die endotracheale Intubation durch direkte Laryngoskopie⁴. Ein Narkosegerät beatmete die Tiere mit einem durchschnittlichen Minutenvolumen von 7 Litern. Zur Aufrechterhaltung der Intubationsnarkose wurden das Inhalationsanästhetikum Isofluran (1,5 %) sowie ein Sauerstoff (1/3)-Lachgas (2/3)-Gemisch verwendet. Als kontinuierliche intraoperative Überwachungsmaßnahmen dienten neben dem EKG die nicht invasive Pulsoximetrie sowie die Kapnometrie. Nach erfolgreicher Intubation wurde allen Tieren zusätzlich eine Magensonde gelegt. Im Bereich der rechten Thoraxseite wurden die großflächige Neutralelektrode und die drei EKG Elektroden angelegt. Anschließend wurde der linke Hinterlauf mit Polyvidonjodlösung⁵ abgewaschen und steril abgedeckt. Zur perioperativen Antibioseprophylaxe wurden 2,2 g Augmentan®⁶ als Einmalgabe verabreicht.

2.2.2 Operative Eingriffe

Über einen zirka 10 cm longitudinalen Hautschnitt medial der Patella wurde nach Durchtrennung der einzelnen subkutanen Verschiebeschichten die Patellarsehne und der muskuläre Ansatz des M. vastus medialis freigelegt. Die Eröffnung und Darstellung des Gelenkraumes erfolgte nun durch eine partielle Durchtrennung des medialen Anteils des M. vastus medialis. Somit war eine Luxierung der Patella nach lateral möglich und gab den Blick auf den Hoffa-Fettkörper frei. Zur vollständigen

² Venflon 2®, BOC Ohmeda AB, Helsingborg Schweden

³ Trapanal® Byk Gulden Lomberg Chem. Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

⁴ Endotrachealtubus (Größe 7.0-8.0)

⁵ Braunol 2000, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

⁶ SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland

Freilegung des VKB war es erforderlich, den Fettkörper medial zu durchtrennen und die Plica synovialis zu entfernen. Anschließend erfolgte die Markierung der Sägeföhrung. Nun wurde der Ansatz des VKB aus der Area intercondylaris anterior unter sorgfältiger Schonung des HKB ausgesägt. Die Lockerung des herausgesägten Knochenblockes erfolgte durch einen kleinen Meißel. Zur proximalen Verschiebung des herausgesägten Knochenblockes und folglich Elongation des ansetzenden VKB wurde von dem anterioren Anteil des Knochenblockes ein Knochenstück (zirka 0,5 x 0,5 cm) abgesägt. Dieses wurde mit Hilfe eines Luers zu einem Blättchen (zirka 0,3 cm Dicke) zurechtmodelliert und unter den knöchernen Ansatz des VKB platziert. Der unterfütterte knöcherne Ansatz des VKB wurde mittels Kortikalisschraube und Unterlegscheibe fixiert (siehe 7.1 Spezielles Operationsinstrumentarium; Abb. 8).

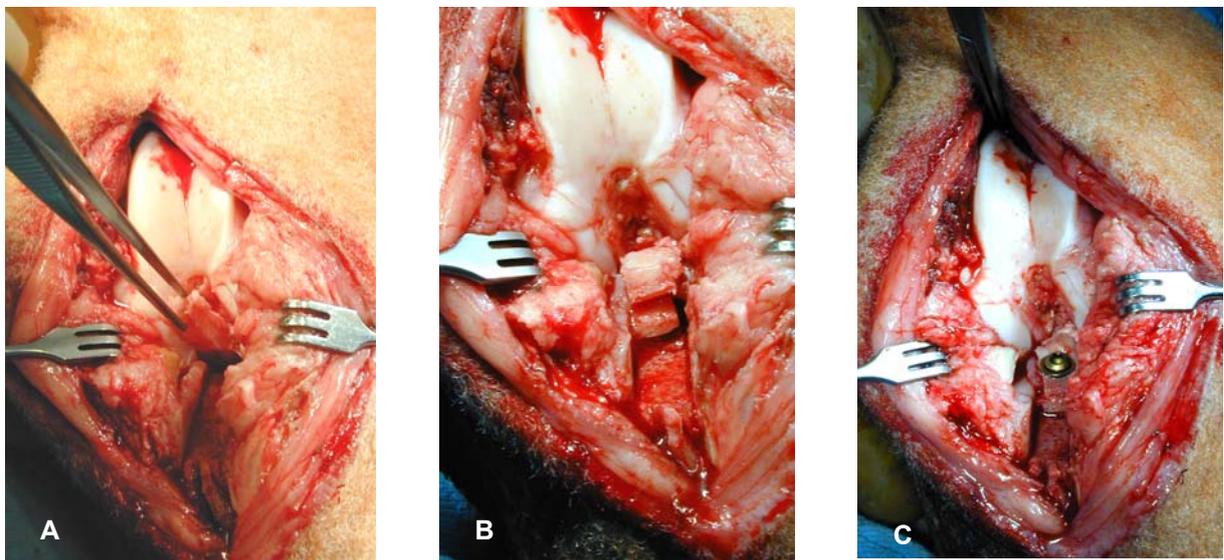


Abbildung 8: Darstellung der einzelnen Operationsschritte in vivo; **A:** Aussägen des Knochenblockes mit ansetzendem VKB; **B:** Knöcherner VKB Ansatz mit untergelegtem Knochenblättchen; **C:** Fixierung der beiden Knochenstücke mittels Kortikalisschraube.

Bei den Tieren der Gruppe A (VKB _{elongiert}) erfolgte ausschließlich die Elongation des VKB. Bei den Tieren der Gruppe B (VKB _{elongiert+HF}) wurde die thermische VKB-Verkürzung durchgeführt. Das elongierte VKB wurde mit einer monopolaren Kugelelektrode des HF-Instrumentariums mit einer vom Hersteller empfohlenen Leistung von 60 Watt behandelt (siehe 7.1 Spezielles Operationsinstrumentarium). Aus vorangegangenen physikalischen Testreihen war bekannt, dass diese aufgewendete Energie Temperaturen von 60° bis 70°C an der Oberfläche des VKB erzeugt. Die Applikation von HF-Energie erfolgte an der gesamten anterioren Zirkumferenz in einem kontinuierlichen vertikalen Bewegungsablauf. Der zentrale

Bereich des Bandes wurde zuerst behandelt, im zweiten Schritt erfolgte die Behandlung der Peripherie. Die Kugelelektrode wurde mit einer konstanten Geschwindigkeit über das VKB geführt, bis eine sichtbare Schrumpfsreaktion beobachtet wurde, mit der die ursprüngliche Stabilität des intakten Kniegelenkes wieder hergestellt wurde. Wiederholt durchgeführte vordere Schubladentests dienten als Kontrolluntersuchungen, um eine suffiziente VKB-Elongation und Schrumpfsreaktion nach HF-Applikation zu garantieren (vor/nach Elongation und nach VKB-Shrinkage). Zusätzlich wurde durch den Operateur mit Hilfe einer Overholt-Zange manuell die Spannung des VKB nach der HF-Applikation geprüft. Abschließend erfolgte der schichtweise Wundverschluss in üblicher Weise.

Zur Simulation einer umsichtigen postoperativen Rehabilitation sowie zur Vermeidung einer sofortigen Vollbelastung des operierten Kniegelenkes wurde bei jedem Tier eine Achillotenotomie am linken Hinterlauf vorgenommen. Dafür wurde über einen 3 cm langen anterolateralen longitudinalen Hautschnitt der gemeinsame Fersensehnenstrang (Tendo calcaneus communis) freigelegt. Das Peritendineum des M. flexor digitorum pedis wurde über einen 1 cm langen longitudinalen Schnitt eröffnet und die Achillessehne komplett durchtrennt. Die Wunde wurde abschließend schichtweise verschlossen.

2.2.3 Postoperative Maßnahmen

Zur Schmerzprophylaxe bekamen die Tiere postoperativ ein Gemisch aus 1250 mg Novaminsulfon⁷ und 50 mg Tramadol⁸ intramuskulär über drei Tage injiziert.

Um eine temporäre postoperative Immobilisation zu gewährleisten, wurde das Bewegungsausmaß der Tiere zusätzlich zur Achillotenotomie durch einen Laufstall auf 3m x 6m für drei Wochen begrenzt. Im Anschluss an die Wochen der eingeschränkten Mobilität konnten sich die Tiere in einem Freilaufgehege unbegrenzt bewegen. Das Gangbild der Tiere wurde in den ersten 14 Tagen täglich dokumentiert, anschließend bis zur Tötung zweimal wöchentlich. Es war als normal einzustufen, wenn keine offensichtlich nachweisbaren Auffälligkeiten beim Laufen oder Springen auftraten. Das Fadenmaterial konnte in den meisten Fällen nach 10-14 Tagen entfernt werden.

⁷ Novaminsulfon-ratiopharm® 2,5 Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

⁸ Tramal® 100 Injektionslösung, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland

2.2.3.1 Gewebeentnahme

Nach einer Standzeit von 24 Wochen erfolgte die Tötung aller Tiere. Zur Sedierung erhielten sie intravenös 20 mg/kg Thiopental-Natrium. Anschließend wurde ihnen eine 40-60 ml Kaliumchloridlösung⁹ intravenös verabreicht, woraufhin der Tod durch eine Kardioplegie mit Kreislaufstillstand eintrat. Im Anschluß kam es dann bei jedem Tier zur Explantation des linken und rechten Hinterlaufs. Daraufhin erfolgte die Präparation der Kniegelenke mit der Entfernung aller Weichteile. Mit der Eröffnung der Gelenkkapsel wurde der Kniegelenkinnenraum makroskopisch hinsichtlich Entzündungszeichen (Gefäßinjektionen der Synovialis, Gelenkerguss und Synovialhyperthrophie) sowie der Ausbildung einer neuen synovialen Hüllschicht um das VKB beurteilt und fotografisch dokumentiert. Im Anschluss wurden die femoralen und tibialen Knochenenden in Kunststoff¹⁰ eingebettet und die biomechanische Testung¹¹ durchgeführt.

Für die histologischen Untersuchungen wurden unmittelbar nach Abschluss der biomechanischen Testung die VKB der Kontrollgruppe (VKB_{nativ}), Gruppe A (VKB_{elongiert}) und Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}) eng am knöchernen Ansatz und Ursprung mit einem scharfen Messer reseziert. Zur Herstellung der histologischen Längs- und Querschnitte wurden die VKB dieser Tiere im mittleren Drittel zweigeteilt. Dabei dienten die medialen VKB-Hälften zur Herstellung der Längsschnitte, die lateralen VKB-Hälften wurden für die Querschnitte verwendet (Abb. 9).

Die Kniegelenke der nativen VKB, welche zum Zeitpunkt Null mit HF-Energie behandelt wurden, wurden einer biomechanischen Testung nicht unterzogen. Die HF-Behandlung erfolgte in situ und in gleicher Weise wie die intraoperative HF-Applikation der Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}).

⁹ Kaliumchlorid 7,45% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

¹⁰ Technovit 3040

¹¹ Materialprüfmaschine Zwick UPM 1455, Ulm, Deutschland

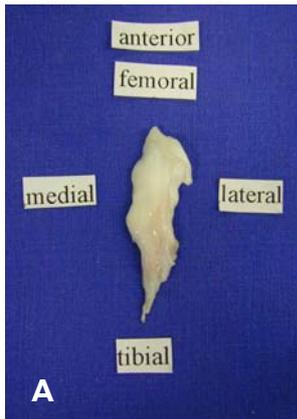


Abbildung 9: **A:** Fotodokumentation des in situ entnommenen VKB mit Beschriftung zur Erläuterung der Lage im Kniegelenk; **B:** Längsteilung des VKB im mittleren Drittel, medial = Längsschnitte, lateral = Querschnitte.

2.2.3.2 Gewebepreparation für die Lichtmikroskopie

A Fixierung

Die Fixierung tötet Zellen mit dem Ziel, ihre dynamischen Lebensprozesse so schnell wie möglich zu unterbinden und ihre Strukturen möglichst unverändert zu erhalten.

Zur Immersionsfixierung wurden die VKB-Präparate nach der Entnahme für 24 h in 5% Formaldehydlösung eingelegt.

B Einbettung und Schneiden

Da Präparate trotz Fixierung, die dem Gewebe eine gewisse Festigkeit verleiht, noch zu weich sind, müssen sie vor dem Schneiden in das Einbettungsmedium Paraffin gebracht werden.

Dazu wurden die VKB-Präparate in einer automatischen Entwässerungsreihe über einen Zeitraum von zirka 20 Stunden das Wasser entzogen (dehydriert); anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet. Um in der histologischen Auswertung die Veränderung nach HF-Applikation genau darstellen zu können, wurde im Rahmen des Einbettungsvorgangs streng darauf geachtet, dass das VKB entsprechend seiner korrekten anatomischen Lage eingebettet wurde. Vom eingebetteten Gewebe wurden dann mit einem Mikrotom¹² vier μm starke Serienschnitte angefertigt. Diese wurden für die konventionelle Lichtmikroskopie auf unbehandelte, für die immunhistologischen Färbungen auf silanisierte¹³ Objektträger¹⁴ aufgezogen und den Färbungen zugeführt.

¹² Leica RM 2035, Leica Instruments GmbH 69226 Nußloch

¹³ 3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH 82041 Deisenhofen

¹⁴ Super Frost®, Menzel-Gläser Deutschland

2.2.3.3 Färbung

2.2.3.3.1 Konventionelle Färbung

*Haematoxylin*¹⁵ / *Eosin*¹⁶ (H&E) und *Trichromfärbung nach Masson-Goldner* (MG)

Als Übersichtsfärbungen wurden die Färbung mit Haematoxylin und Eosin sowie die Trichromfärbung nach Masson-Goldner gewählt. Die Kombination von Haematoxylin und Eosin färbt Zellkernmaterial blau und stellt die meisten zytoplasmatischen Strukturen rosa dar. Die H&E-Färbung verdeutlicht also vor allem die Form und Ausdehnung der Zelle. Dagegen ermöglicht die Masson-Goldner Trichromfärbung die differenzierte Bindegewebsdarstellung. Die Zellkerne werden blauschwarz, Zytoplasma rot, Kollagen grün, Muskulatur hellrot gefärbt.

Zur Färbung müssen die Präparate entparaffiniert und rehydriert werden. Die Schnitte werden nach der Färbung erneut entwässert, in Xylol gewaschen und mit einem Tropfen durchsichtigem Eindeckmittel¹⁷ bedeckt. Das anschließend aufgelegte Deckglas glättet den Schnitt und liefert eine ebene Oberfläche, die bei der Arbeit im Mikroskop keine Lichtreflexe hervorruft (siehe 7.2 Histologische Untersuchungsmaterialien).

2.2.3.3.2 Immunhistologie

Immunhistochemische Färbung/ Faktor VIII (F VIII)

Mit Hilfe der Faktor VIII Färbung wird die Darstellung von kleinsten Gefäßen (Kapillaren) im VKB möglich. Durch einen spezifischen polyklonalen Antikörper erfolgt die gezielte Markierung des in den Endothelzellen vorkommenden F VIII (von-Willebrandt-Faktor) [141].

Der immunhistochemische Nachweis von F VIII wurde gewählt, um Aufschluss zu geben über die Revaskularisierung der mit thermischer Energie behandelten ligamentären Bereiche.

¹⁵ Harris Haemalaun

¹⁶ Eosin Y Solution Aqueous, Sigma Diagnostics St.Louis Missouri 63178 USA

¹⁷ Vitro-Clud, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

2.2.3.3.2.1 Grundlagen der Immunhistologie

Immunhistochemische Färbemethoden sind heute bereits so weit verbreitet, dass sie als eine von vielen speziellen Färbetechniken angesehen werden können.

Als ein zentrales Reagenz aller immunhistochemischer Färbungen dienen die Immunglobuline (Antikörper). Antikörperlösungen, die bei der immunhistochemischen Färbung eingesetzt werden, enthalten vorwiegend Antikörper vom Typ IgG, weniger die anderen Immunglobulinklassen [14].

Das Grundprinzip der Immunhistochemie beruht auf einer spezifischen Reaktion zwischen einem Antigen (Epitop) und einem Antikörper. Zur Darstellung dieses hoch spezifischen Antigen-Antikörperimmunkomplexes dient die Immunperoxidase-Färbemethode. Es gibt vier hauptsächliche Immunperoxidase-Färbemethoden, um zelluläre Antigene zu lokalisieren: die direkte, die indirekte, PAP- und Avidin-Biotin-Methode.

In der Studie wurde aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin und der damit einhergehenden höheren Empfindlichkeit die Avidin-Biotin-Methode angewendet.

2.2.3.3.2.2 Allgemeines Grundprinzip der Faktor VIII Färbung

Avidin-Biotin-Methode

Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Insgesamt werden drei Reagenzien gebraucht (Abb. 10):

- ein polyklonaler Primärantikörper (spezifisch gegen das zu bestimmende zelluläre Antigen, in der vorliegenden Arbeit F VIII)
- ein Sekundärantikörper (bindet an den Primärantikörper und ist mit Biotin konjugiert)
- ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex

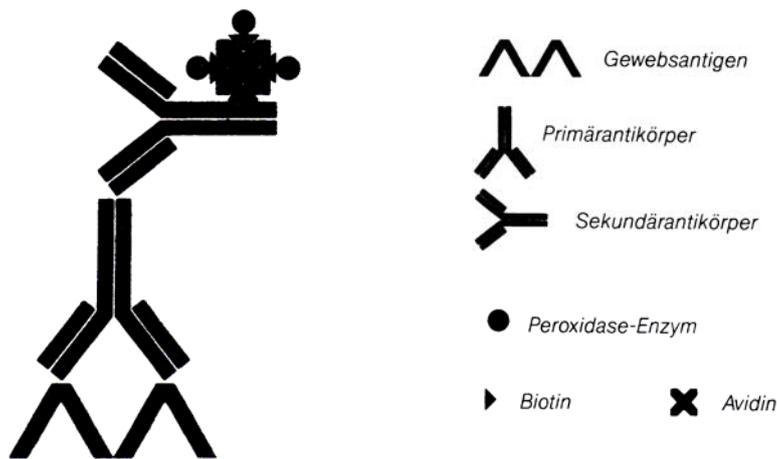


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplexes [14].

Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase – und das damit gesuchte zelluläre Antigen (F VIII) – wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht (siehe 7.2.3 Immunhistologie) [14].

2.3 Histologische Auswertung und Datenanalyse

Für die histologische Beurteilung wurden die Methoden der Durchlichtmikroskopie und der Polarisationsmikroskopie angewendet. Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte an einem konventionellen Lichtmikroskop¹⁸. Für die Durchlichtmikroskopie wurden die H&E und Masson-Goldner gefärbten Präparate mit 1,6-, 10-, 20- und 40facher Vergrößerung ausgewertet. Für eine Auswertung mittels Polarisationsmikroskopie wurden zwei weitere Polarisationsfilter in den Lichtgang zwischengeschaltet. Aufgrund der erhöhten Lichtabsorption kamen hier nur Objektive bis zur 20fachen Vergrößerung zur Anwendung. Die Dokumentation der histologischen Befunde der Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie erfolgte mit einem Belichtungsautomaten¹⁹ sowie über die Computer gestützte Bildanalyse.

Die Auswertung der nativen VKB nach Applikation von HF-Energie zum Zeitpunkt Null erfolgte lediglich in makroskopisch und mikroskopisch deskriptiver Form.

¹⁸ (Leica DMRB Mikroskop, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, 35530 Wetzlar)

¹⁹ Leitz Orthomat E System Wild, Leitz Mikroskope und Systeme GmbH, 6330 Weitzlar

2.3.1 Durchlichtmikroskopie

Zur Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes sowie zur Bestimmung der mittleren Zelldichte pro mm² wurden pro Tier zwei mit H&E gefärbte Längsschnitte zur Auswertung herangezogen. Verwendet wurde hierfür immer der mediale VKB-Anteil. Unter einer 20fachen Vergrößerung wurden zehn zufällig gewählte Gesichtsfelder im Zählraster pro Schnitt evaluiert und ausgezählt.

Die immunhistologische Analyse der Revaskularisierung wurde an den Querschnitten von zwei Präparaten pro Tier durchgeführt. Verwendet wurde in diesem Fall der laterale VKB-Anteil. Nach immunhistologischer Markierung des Gefäßendothels mit anti-v. Willebrandt-Faktor (F VIII) erfolgte eine Unterteilung des Querschnittes in eine subsynoviale (unmittelbar angrenzend an die synoviale Deckzellschicht), eine intermediäre und zentrale Schicht. Dazu wurde jeweils vom Mittelpunkt jedes Querschnittes die Strecke zwischen der Grenzschicht der Synovia und des Bandgewebe gedrittelt (Abb. 11).

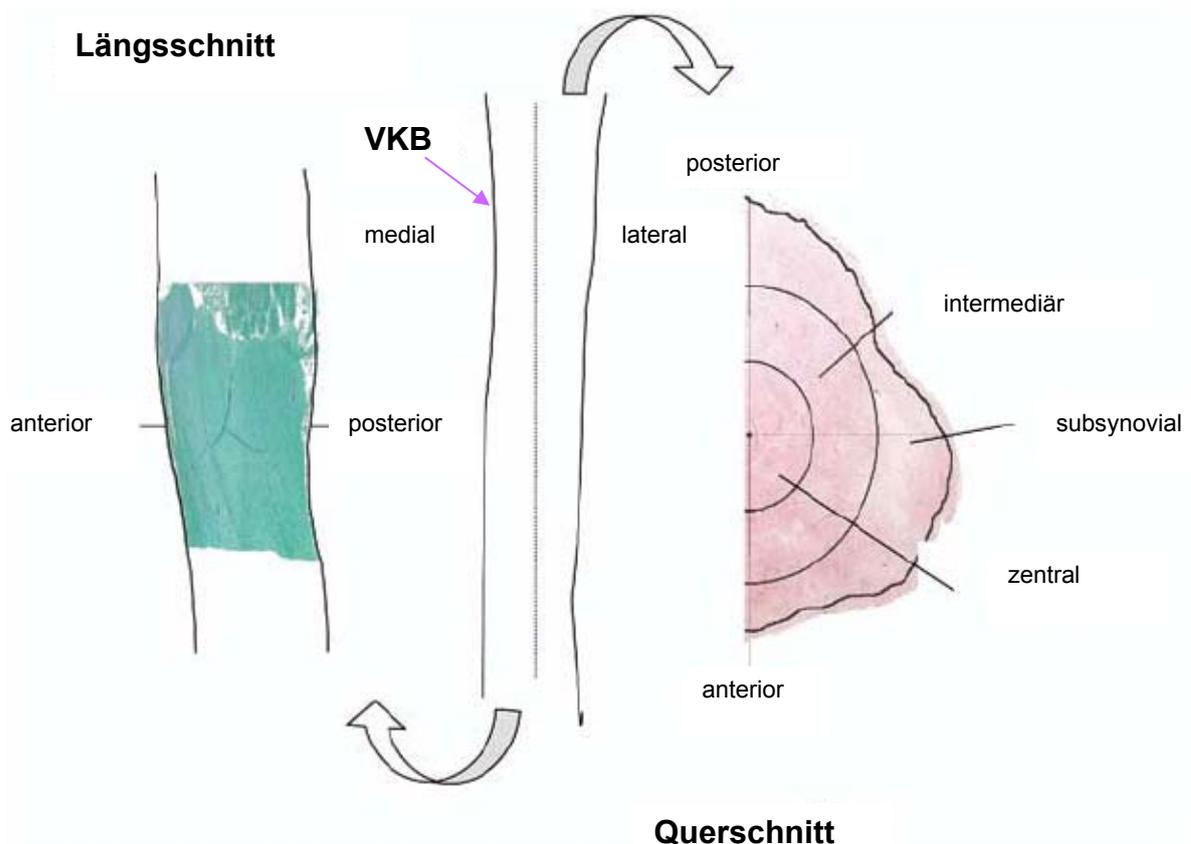


Abbildung 11: Längsteilung des VKB im mittleren Drittel; der **mediale VKB-Anteil** wurde für die Längsschnitte verwendet, diese dienten der Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes sowie zur Bestimmung der mittleren Zelldichte pro mm² und des Crimps; der **laterale VKB-Anteil** wurde für die Querschnitte zur Bestimmung der Gefäßdichte mittels F VIII herangezogen, die Unterteilung erfolgte in drei Regionen: subsynovial, intermediär und zentral [124].

In jedem Präparat wurden subsynovial fünf, intermediär drei, sowie zentral zwei Gesichtsfelder ausgewählt. Aus diesen Gesichtsfeldern wurde die Anzahl der Gefäßquerschnitte pro Gesichtsfeld (je 0,06 mm²) im Zählraster ermittelt und die mittlere Anzahl an Gefäßquerschnitten pro mm² errechnet.

2.3.2 Polarisationsmikroskopie

Mittels Polarisationsmikroskop wird polarisiertes, nur in einer Ebene schwingendes Licht von submikroskopisch gerichteter Struktur in zwei zueinander senkrecht schwingenden Anteilen zerlegt. Hiermit können Aussagen über die Kollagentertiärstruktur des VKB getroffen werden.

Zur Ermittlung der Kollagenfibrillenfrequenz, dem so genannten „Kollagencrimp“, wurden die Schnitte unter polarisiertem Licht mit einer kalibrierten Skala vermessen. Bei einer 20fachen Vergrößerung konnte in je zehn Gesichtsfeldern eines Präparates die mittlere Kollagenfibrillenfrequenz pro mm in den VKB-Längsschnitten errechnet werden.

2.3.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Er diente der Bestimmung auf Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen. Innerhalb der Gruppen diente der Mann-Whitney-Wilcoxon Test zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen. Das Signifikanzniveau wurde dabei bei $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit einem statistischen Softwarepaket, SPSS, Version 7,5 durchgeführt.

Alle histologischen Analysen und Zellzählungen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern überprüft. Die Variabilität der Ergebnisse eines Untersuchers lag bei 10,3 %, die zwischen den Untersuchern bei 11,7 %.

3. ERGEBNISSE

3.1 Allgemeines

3.1.1 Komplikationen

Für die vorliegende Studie wurden 22 Tiere operiert. Drei davon mussten wegen einer Lockerung des Knochenblocks aus dem Versuch ausgeschlossen werden. In der postoperativen Verlaufsphase kam es bei drei weiteren Schafen im Bereich des operierten Kniegelenks zu Wundinfektionen mit ausgeprägten Wundheilungsstörungen. Trotz intensiver Wundpflege und antibiotischer Abschirmung mussten die Tiere bei progredienter Verschlechterung des Allgemeinzustandes und zunehmender Immobilisation eingeschläfert werden. Zur Auswertung wurden demnach 16 der ursprünglich 22 Tiere in den Hauptversuch aufgenommen.

3.2 Postoperativer Verlauf

Die Schafe zeigten nach zirka drei Wochen eine reizlose Heilung der Arthrotomie- und Achillotenotomiewunden. Nach spätestens sechs Wochen konnte man bei allen Tieren eine Vollbelastung des operierten Hinterlaufs beobachten.

Zum Zeitpunkt der Tötung zeigten alle Tiere einen guten Allgemeinzustand und es fand sich außer einer leichten Einschränkung in der Flexion eine freie Beweglichkeit der operierten Hinterläufe.

3.3 Klinische Beurteilung der Kniestabilität

Zur klinischen Beurteilung der Kniestabilität wurden post mortem alle Kniegelenke einem vorderen Schubladentest (in 60° Flexion) unterzogen. Es wurden drei Schweregrade festgelegt (Schweregrad 1: gering; Schweregrad 2: mäßig; Schweregrad 3: stark).

In der Gruppe A (VKB _{elongiert}) zeigten ein Tier einen geringen, vier Tiere einen mäßigen und zwei Tiere einen stark positiven Schubladentest; lediglich ein Testergebnis war negativ. In der mit HF behandelten Gruppe (Gruppe B) zeigten zwei Tiere einen geringen, vier Tiere einen mäßig und ein Tier einen stark positiven Befund. Wieder nur bei einem Tier konnte ein negatives Schubladentestergebnis eruiert werden. Sowohl bei allen Tieren der Kontrollgruppe (VKB _{nativ}) als auch bei allen

nativen VKB nach HF-Energie Applikation waren ausschließlich negative Schubladentests zu verzeichnen (Tab. 3).

Schubladentest Schweregrad	Anzahl der Tiere			
	Kontrolle (VKB _{nativ})	Gruppe A (VKB _{elongiert})	Gruppe B (VKB _{elongiert} +HF)	VKB _{nativ} +HF
1 (gering)	0	1	2	0
2 (mäßig)	0	4	4	0
3 (stark)	0	2	1	0
negativ	8	1	1	8

Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse im Schubladentest von Kontrollgruppe, Gruppe A und B sowie VKB _{nativ}+HF post mortem.

3.4 Makroskopische Auswertung

Kontrollgruppe: natives vorderes Kreuzband (VKB _{nativ})

Die nativen vorderen Kreuzbänder der Kontrollgruppe zeigten makroskopisch eine gut vaskularisierte synoviale Hüllschicht. Es fanden sich bei keinem Knie Hinweise auf eine entzündliche Umgebungsreaktion oder einen Kniegelenkerguss (Abb. 12).



Abbildung 12: Makroskopische Kniegelenkaufnahme mit direkter Sicht auf das unbehandelte native VKB.

24 Wochen: Gruppe A (VKB _{elongiert})

24 Wochen postoperativ zeigten inspektorisch fünf Tiere aus der Gruppe der elongierten VKB unspezifische Entzündungszeichen in Form eines geringen Gelenkergusses, wohingegen das VKB sowie die Synovialis bei diesen Tieren makroskopisch unauffällig waren.

Bei den drei weiteren Tieren fanden sich deutliche Reizergüsse mit einer durch Gefäßinjektionen geröteten Synovialis. Das VKB zeigte hier einen hypertrophierten Synovialschlauch mit Gefäßinjektionen an der tibialen Ansatzstelle (Abb. 13). Die Synovia fand sich in allen Fällen klar, bei zwei Tieren mit ausgeprägtem bernsteinfarbenem Reizerguss.

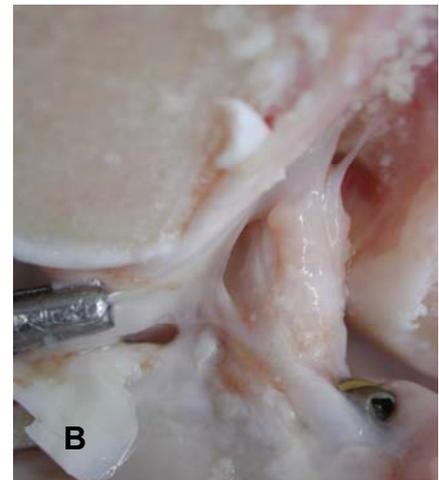


Abbildung 13: 24 Wochen postoperativ makroskopische Kniegelenkaufnahmen nach Elongation des VKB; Darstellung des VKB in situ; **A**: Gelenk mit deutlichem Reizerguss, hypertrophierter und vaskularisierter Synovialis; im Bereich der tibialen Ansatzstelle zeigte sich der ligamentäre synoviale Überzug mit deutlichen tibialen Gefäßinjektionen; **B**: VKB wurde von einem hypertrophierten Synovialschlauch eingehüllt.

24 Wochen: Gruppe **B** (VKB *elongiert*+HF)

Makroskopisch zeigten in der mit HF-Energie behandelten Gruppe alle acht Kniegelenke eine diskrete, unspezifische inflammatorische Veränderung mit geringen bis mäßigen serösen Ergüssen bei klarer Synovia. Zusätzlich fand sich bei zwei von acht Tieren eine hypertrophierte und gut vaskularisierte Synovialis. Das VKB war bei allen Tieren von einer hypertrophierten Synovialis umgeben (Abb. 14).



Abbildung 14: 24 Wochen nach HF-Behandlung des VKB zeigte sich ein makroskopisch unauffälliges VKB mit hypertrophierter Synovialis.

Natives vorderes Kreuzband + HF (VKB_{nativ} + HF)

Das native VKB wurde bei acht Tieren mit einer HF-Energie von 60 Watt behandelt. Mit der Applikation durch die Koagulationselektrode kam es zu einer sofortigen Schrumpfung des VKB. Darüber hinaus zeigte sich eine Farbveränderung der synovialen Oberfläche von einer weißen zu einer beige-hyalinen Farbe (Abb. 15).

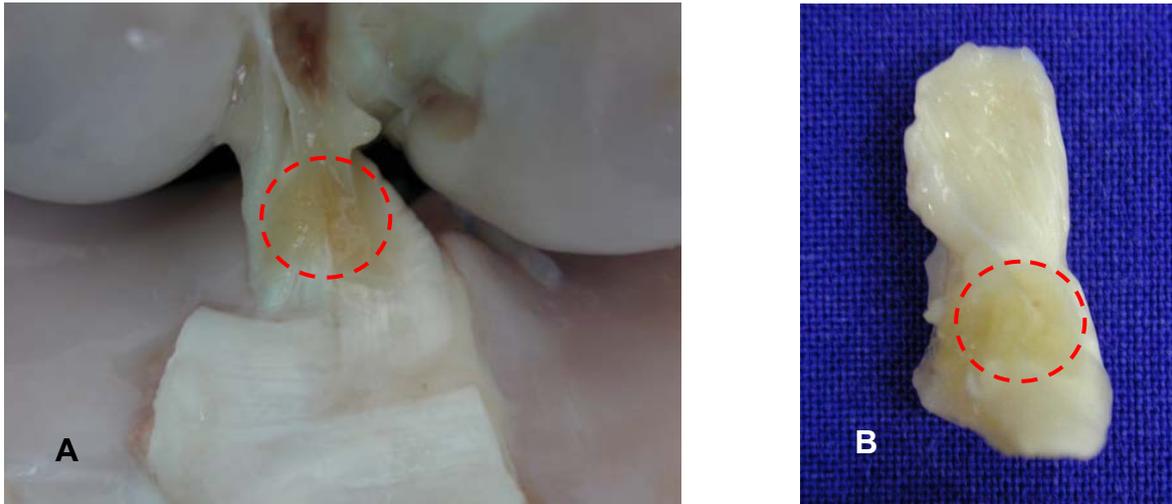


Abbildung 15: **A:** Natives VKB zum Zeitpunkt Null nach HF-Applikation in situ; **B:** Dasselbe VKB wie in A, vollständig entnommen; in A und B ist der Applikationsbereich der Hochfrequenzenergie deutlich zu erkennen (roter Kreis).

3.5 Mikroskopische Auswertung

3.5.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

3.5.1.1 Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild

Kontrollgruppe: natives vorderes Kreuzband (VKB nativ)

Im nativen vorderen Kreuzband (VKB nativ) wurde eine Gesamtzellzahl von 739 /mm² gezählt. In allen drei Regionen (subsynovial, intermediär, zentral) fand sich eine homogene Verteilung der Fibroblasten. Die Zellkerne imponierten überwiegend spindelförmig und zu geringerem Anteil ovoid und richteten sich zwischen dem gewellten Kollagenfaserbündel in Längsrichtung des Bandes aus. In den Übersichtsfärbungen H&E und MG präsentierten die kollagenen Fasern des nativen VKB die typische lamellenartige Anordnung. Vereinzelt wurde der Faserverlauf durchbrochen von bindegewebigen Septen, in denen sich die Gefäße erkennen ließen. Alle Präparate wiesen das gleiche homogene Färbeverhalten auf (Abb. 16).

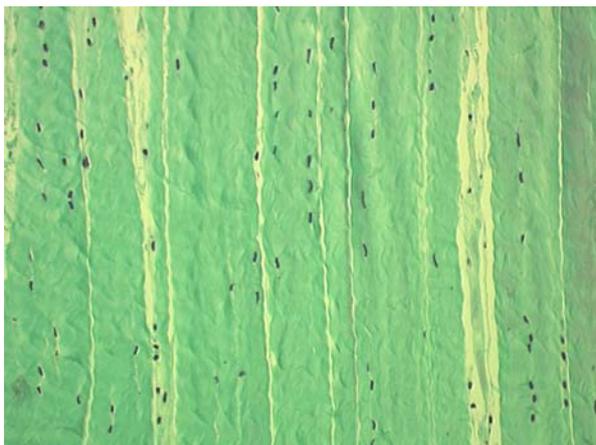


Abbildung 16: VKB nativ mit spindelförmigen und ovoiden Fibroblastenzellkernen (MG, Längsschnitte, 20fache Vergrößerung).

24 Wochen: Gruppe A (VKB elongiert)

24 Wochen postoperativ zeigte sich bei den elongierten VKB eine deutliche Hyperzellularität gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zum nativen VKB weist das elongierte VKB (Gruppe A) mit durchschnittlich 1064/mm² eine signifikant höhere Gesamtzellzahl ($p < 0,05$) auf. Bei den angefärbten Kernen handelte es sich nicht ausschließlich um immigrierende proliferierende Fibroblasten, sondern auch zu einem geringen Teil um Entzündungszellen. Das homogene Reihenmuster der Fibroblasten entlang dem Faserverlauf ließ sich in allen drei Regionen lediglich erahnen. Es imponierten vor allem hyperzelluläre Bereiche mit meist stabförmigen Zellkernen. Es

fanden sich aber auch zellärmere Bereiche mit runden bis ovoiden Zellkernen, insgesamt zeigte sich ein sehr polymorphes Bild.

Die kollagenen Fasern werden vereinzelt durchzogen von hyperzellulären Bindegewebssträngen, in welchen sich kleinste Gefäße nachweisen ließen.

Das VKB war von einer 3-4lagigen synovialen Deckschicht umgeben (Abb. 17).

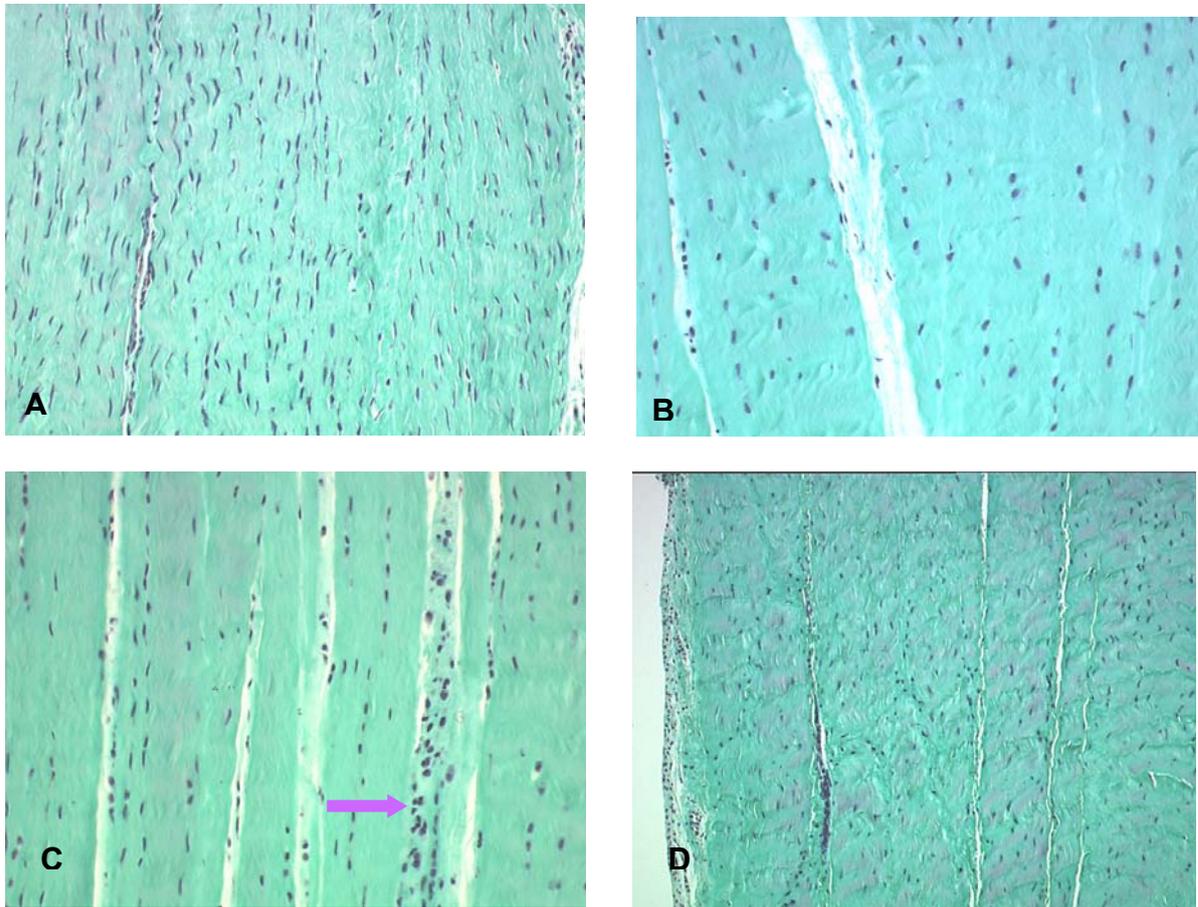


Abbildung 17: **A+B**: Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Zellverteilung im selben VKB; **A**: Region mit hyperzellulären Bereichen (MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung); **B**: zellärmerer Abschnitt im VKB (MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung); **C**: Peripher sind die Bänder durchzogen von hyperzellulärem Granulationsgewebe (MG, Längsschnitte, 20fache Vergrößerung); **D**: 3-4lagiger synoviale Überzug (MG, Längsschnitt, 10fache Vergrößerung).

24 Wochen: Gruppe **B** (VKB elongiert+HF)

Die Gesamtzellzahl des mit HF-Energie behandelten VKB war nach 24 Wochen mit durchschnittlich 1731 Zellen/ mm² signifikant erhöht gegenüber dem nativen VKB ($p < 0,05$) sowie dem elongierten VKB ($p < 0,05$). Histomorphologisch zeigte sich bei dem mit HF behandelten VKB eine ebenso inhomogene Zellverteilung wie bei dem elongierten VKB. Im Bereich der anterioren VKB-Seite, an der die HF-Applikation erfolgte, fand sich eine deutliche Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zum elongierten

VKB. Das Verteilungsmuster der Zellen ist in diesem Bereich gleichmäßig mit überwiegend spindelförmig dominierenden Kernvarianten. An der posterioren Bandseite zeigte sich im Vergleich zum elongierten VKB keine Unterschiede.

Eine deutliche Kollagenbündelbildung wie beim nativen Kreuzband ist nach thermischer Behandlung nicht zu erkennen, hingegen zeigt sich ein hoher Grad der Zellorganisation mit Ausrichtung der Zellen entlang der Kollagenfibrillen (Abb. 18).

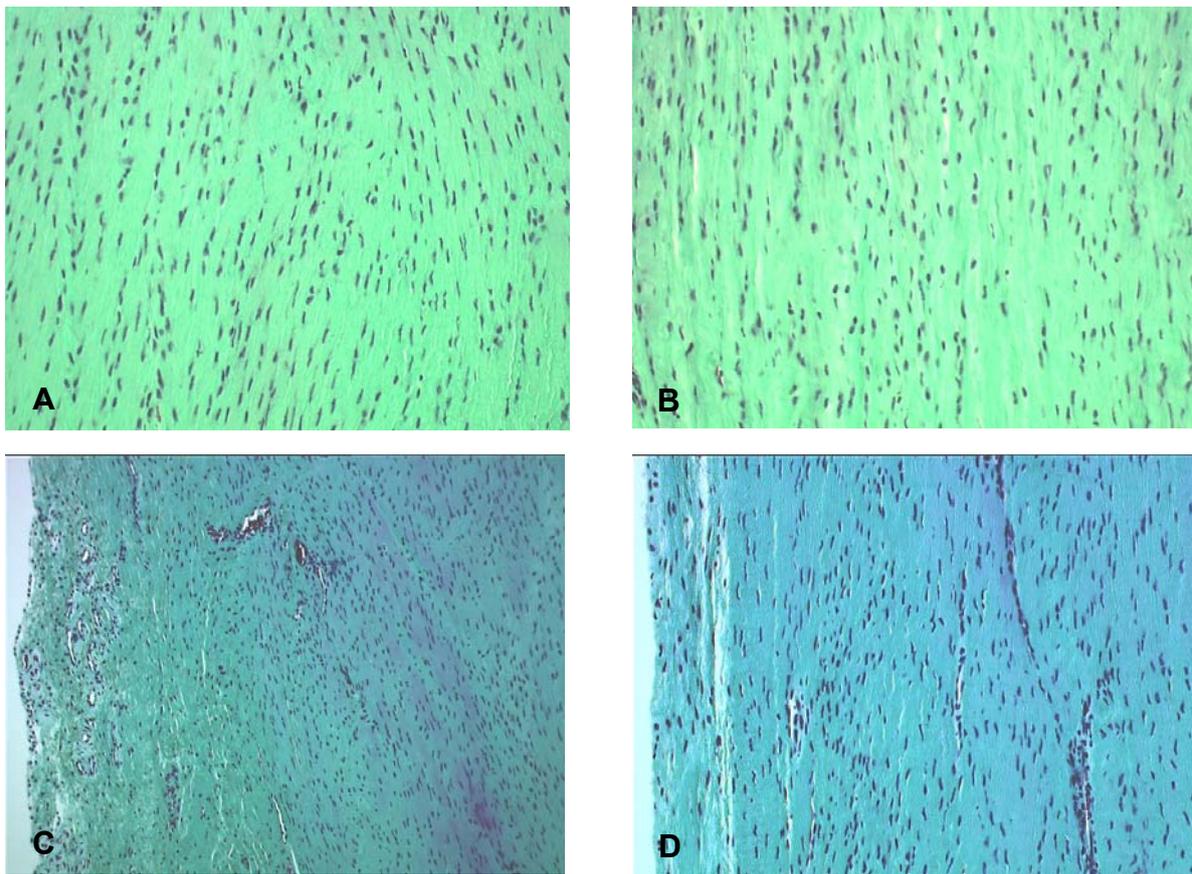


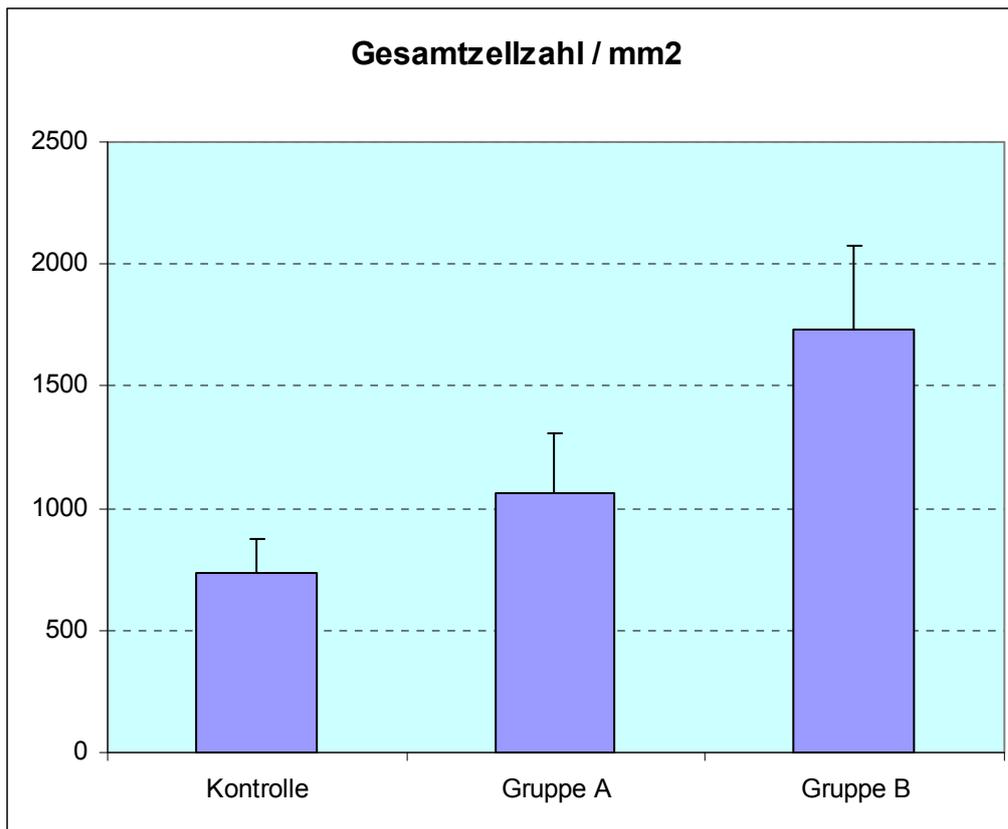
Abbildung 18: **A+B**: Hoher Grad der Zellorganisation mit Ausrichtung der Zellen entlang der Kollagenfibrillen (MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung); **C+D**: An der anterioren VKB-Seite findet sich eine deutliche Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zum elongierten VKB (C: MG, Längsschnitt, 10fache Vergrößerung); (D: MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung).

	Kontrolle (VKB nativ)	Gruppe A (VKB elongiert)	Gruppe B (VKB elongiert+HF)
Gesamtzellzahl /mm ²	739 ± 132 ●	1064 ± 240 ■	1731 ± 346

■ signifikant kleiner gegenüber Gruppe B, p < 0,05

● signifikant kleiner gegenüber Gruppe A und B, p < 0,05

Tabelle 4: Übersicht über Gesamtzellzahl/mm² im VKB nativ, VKB elongiert, VKB elongiert+HF.



Grafik 1: Übersicht über Gesamtzellzahl/ mm² im VKB nativ sowie den Studiengruppen A und B nach 24 Wochen Standzeit.

Natives vorderes Kreuzband + HF (VKB nativ+HF)

Nach der Behandlung mit HF-Energie ließ sich in den Bereichen des nativen VKB, die direkten Kontakt mit der Koagulationselektrode hatten, ein kompletter Verlust der ursprünglichen ligamentären Konfiguration der Kollagenstruktur feststellen. In den Übersichtsaufnahmen konnte zwischen den mit HF-Energie behandelten und den tiefer gelegenen Geweberegionen eine deutliche Trennlinie gezogen werden. Die kollagenen Fasern erschienen homogen wächsern und miteinander verschmolzen im Sinne einer Kollagenhyalinisierung. Es zeigte sich das morphologische Korrelat einer Koagulationsnekrose. Die Fibroblastenzellkerne waren weiterhin entlang des Faserverlaufs ausgerichtet, hatten aber ihre ursprüngliche spindelförmige Erscheinung verloren und wiesen nach der Wärmeapplikation überwiegend eine wellige und unregelmäßige Kernkontur im Sinne einer Kernpyknose auf (Abb. 19).

In den Bandbereichen, die direkt mit HF-Energie behandelt wurden, ließ sich eine Änderung der Anfärbung des Kollagens verzeichnen. Nach Wärmeapplikation färben

sich die kollagenen Fasern in der MG-Färbung nicht mehr grün, sondern rot - violett an (Abb. 19 C).

Diese Veränderung des Färbeverhaltens der kollagenen Strukturen wurde bereits in den Arbeiten von Hecht et al. beschrieben [62].

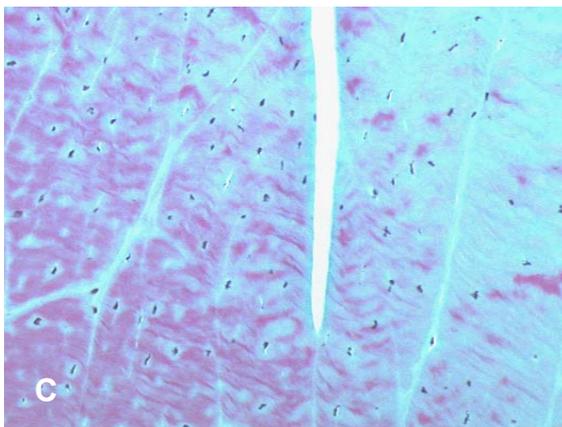
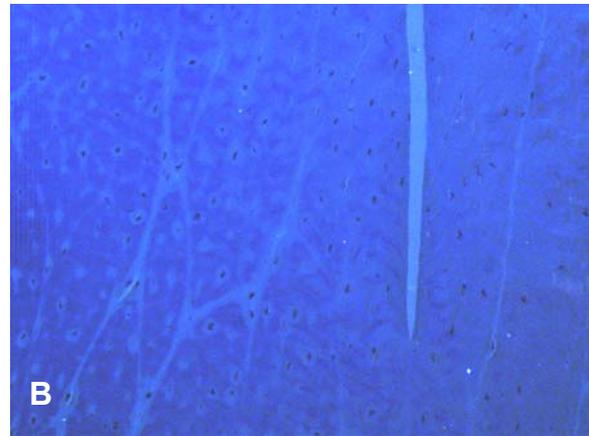
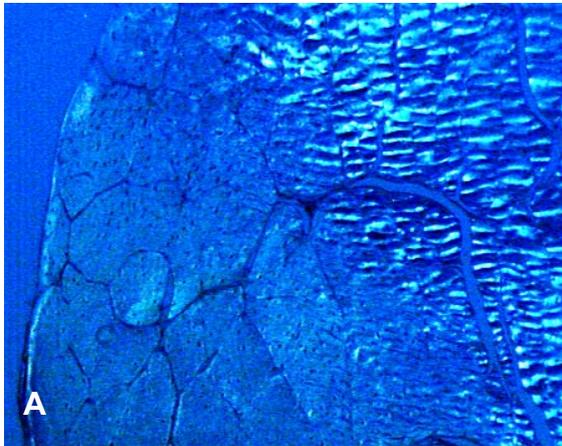


Abbildung 19: **A**: Deutliche Trennung zwischen HF behandeltem Bereich und unbehandelten VKB-Abschnitten (polarisiertes Licht 10fache Vergrößerung); **B**: 20fache Vergrößerung von mit HF-Energie behandelten VKB-Bereich (polarisiertes Licht); **C**: deutlich zu erkennen die welligen und unregelmäßigen Kernkonturen der Fibroblasten im Sinne einer Kernpyknose (MG, Längsschnitte, 20fache Vergrößerung). Nach Wärmeapplikation färben sich die kollagenen Fasern in der MG-Färbung nicht mehr grün, sondern rot - violett an.

3.5.1.2 Kollagenwellenlänge (Crimp)

Kontrollgruppe: natives vorderes Kreuzband (VKB_{nativ})

Im nativen vorderen Kreuzband wurde eine Kollagenwellenlänge von $26 \pm 6 \mu\text{m}$ gemessen. Diese war signifikant größer gegenüber den mit HF-Energie behandelten VKB (Gruppe B; $17 \pm 4 \mu\text{m}$; $p < 0,05$) und kleiner gegenüber den elongierten VKB (Gruppe A; $48 \pm 20 \mu\text{m}$; $p < 0,05$) (Tab. 5).

24 Wochen: Gruppe A (VKB_{elongiert})

In der Auswertung der Gruppe A fand sich eine Kollagenwellenlänge von $48 \pm 20 \mu\text{m}$. Diese war signifikant größer gegenüber den mit HF behandelten VKB (Gruppe B; $17 \pm 4 \mu\text{m}$; $p < 0,05$). Auffällig war jedoch eine große Standardabweichung ($SD = 20$), welche die große Vielfalt der Wellenlängen in den verschiedenen Präparaten zu diesem Zeitpunkt abbildete (Abb. 20).

24 Wochen: Gruppe B (VKB_{elongiert+HF})

Nach 24 Wochen wurde in der Gruppe B ein hochfrequenter Wellenabstand von $17 \pm 4 \mu\text{m}$ beobachtet. Die Kollagenwellenlänge war signifikant kürzer im Vergleich zum elongierten VKB der Gruppe A (VKB_{elongiert}) und dem intakten VKB ($p < 0,05$) (Abb. 20, Tab. 5).

Natives vorderes Kreuzband + HF (VKB_{nativ+HF})

Im anterioren Bandbereich, in dem die Koagulationselektrode direkt mit dem Kreuzbandgewebe Kontakt hatte, zeigte das native VKB einen kompletten Verlust der Crimpstruktur (Abb. 20, Tab. 5).

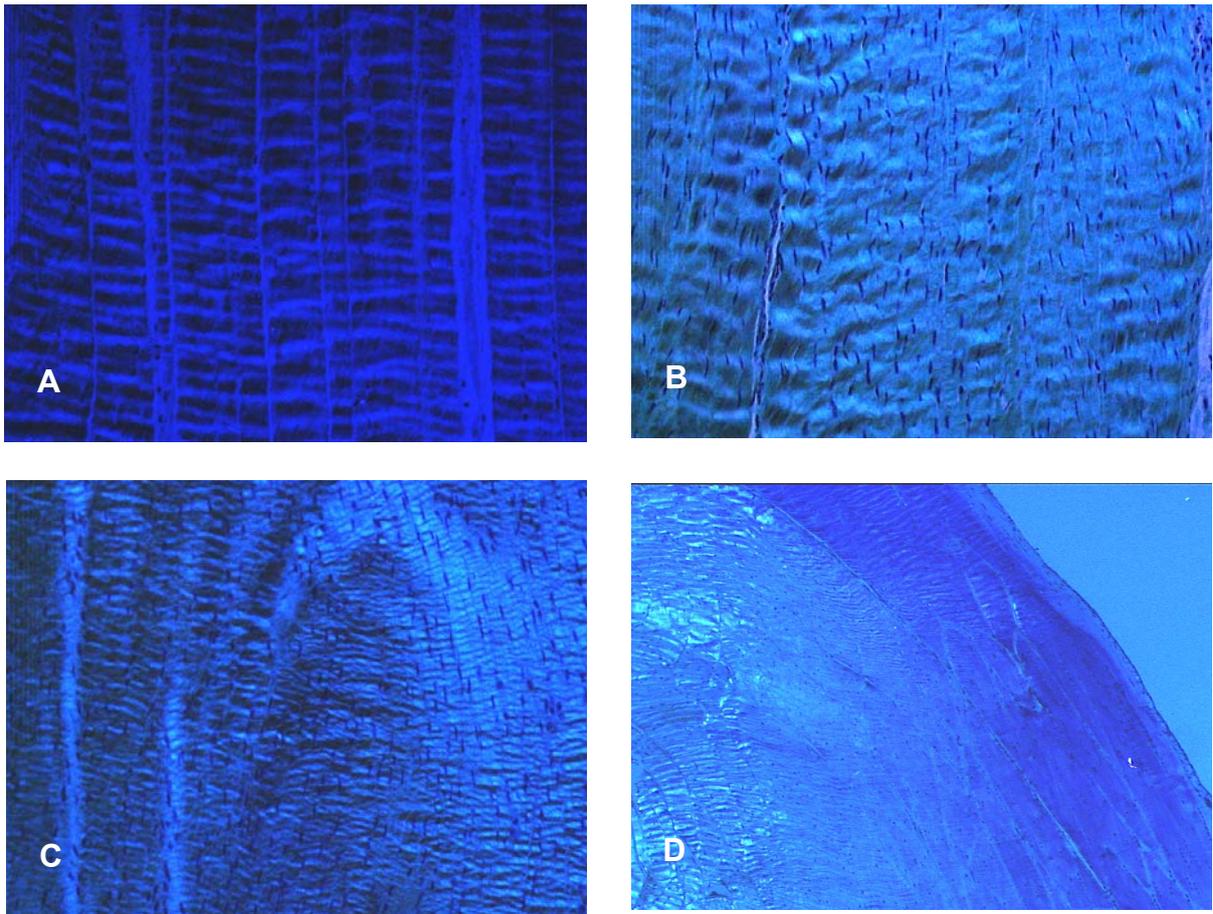


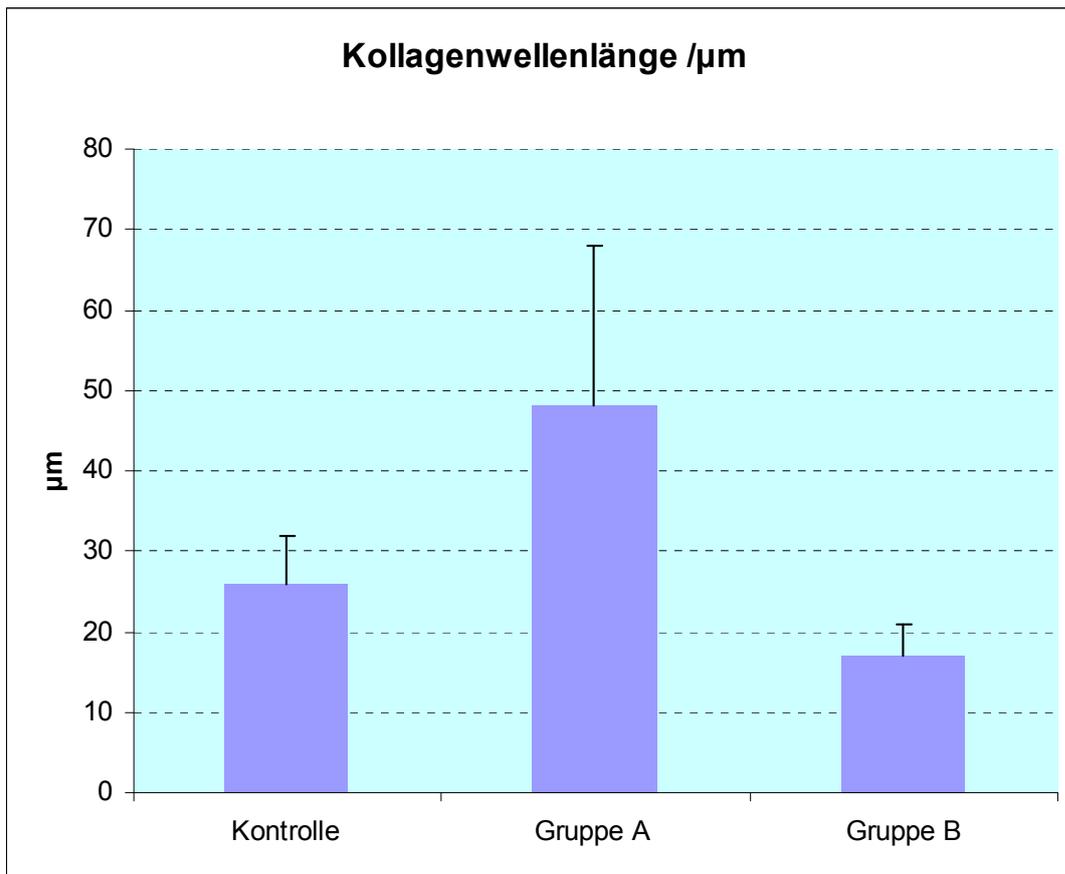
Abbildung 20: **A:** Kontrollgruppe: natives vorderes Kreuzband (VKB nativ) (MG; 20fache Vergrößerung); **B:** 24 Wochen: Gruppe A (VKB elongiert) (MG; 20fache Vergrößerung) **C:** 24 Wochen: Gruppe B (VKB elongiert+HF) (MG; 20fache Vergrößerung); **D:** Natives vorderes Kreuzband (VKB nativ+HF) nach Applikation von HF-Energie (MG; 10fache Vergrößerung).

	Kontrolle (VKB nativ)	Gruppe A (VKB elongiert)	Gruppe B (VKB elongiert+HF)
Kollagenwellenlänge /μm	26 ± 6 ¥	48 ± 20 §	17 ± 4

§ signifikant größer gegenüber Gruppe B, $p < 0,05$

¥ signifikant größer gegenüber Gruppe B und kleiner gegenüber Gruppe A, $p < 0,05$

Tabelle 5: Übersicht über die Kollagenwellenlänge/ μm von VKB nativ und Studiengruppe A und B.



Grafik 2: Übersicht über Kollagenwellenlänge/ μm im VKB nativ sowie in den beiden Studiengruppen A und B nach 24 Wochen Standzeit.

3.5.2 Immunhistologie

3.5.2.1 Vaskularisierung/ Faktor VIII

Kontrollgruppe: natives vorderes Kreuzband (VKB_{nativ})

In der immunhistologischen Färbung mit Faktor VIII ließ sich im nativen vorderen Kreuzband ein kontinuierlicher Rückgang der Gefäßanschnitte/ mm² von subsynovial (77 ± 33 mm²) über intermediär (54 ± 38 mm²) in Richtung zentral (31 ± 35 mm²) nachweisen, wobei die mittlere Anzahl der Gefäße der Subsynovialzone signifikant höher lag als in der Zentralzone ($p < 0,05$). Sowohl in der subsynovialen als auch in der intermediären Region ließen sich zwischen der Kontrollgruppe (VKB_{nativ}) und der Gruppe A (VKB_{elongiert}) und B (VKB_{elongiert+HF}) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gefäßverteilung feststellen. Grundsätzlich ist zu bemerken, dass sich alle Aussagen über die Gefäßdichte immer auf den Mittelwert \pm SD beziehen (Tab. 6).

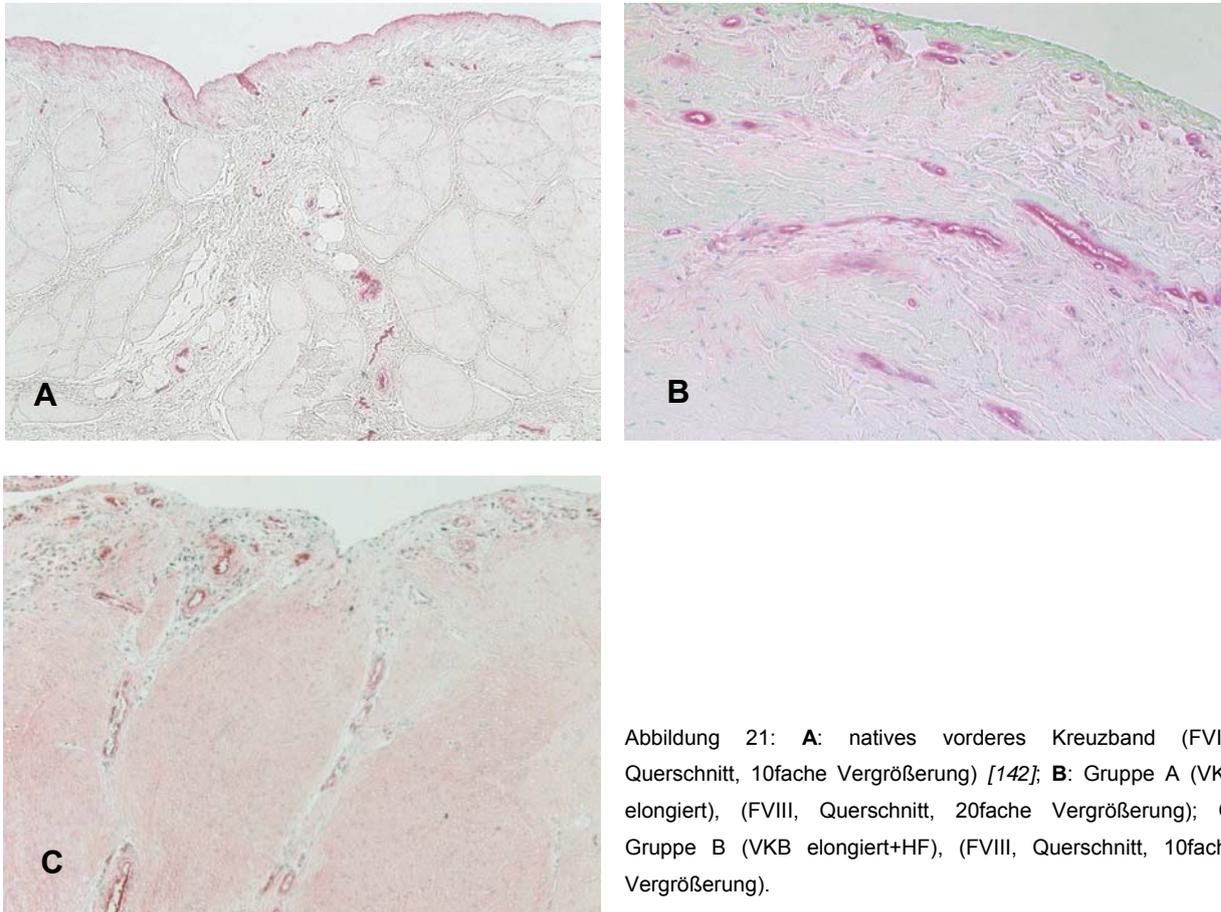
24 Wochen: Gruppe A (VKB_{elongiert})

Immunhistologisch zeigte das elongierte VKB im Vergleich zum nativen VKB in der subsynovialen und intermediären Zone eine tendenzielle Zunahme der Gefäßdichte. Wie auch beim nativen VKB zeigte Gruppe A (VKB_{elongiert}) einen nicht signifikanten Rückgang der Gefäße von der subsynovialen (105 ± 77 mm²) zur intermediären Region (77 ± 52 mm²). Jedoch in der zentralen Zone ließ sich für das elongierte VKB (135 ± 54 mm²) eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen im Vergleich zum HF behandelten VKB (Gruppe B; 35 ± 16 mm²) und dem nativen VKB (31 ± 35 mm²) nachweisen ($p < 0,05$) (Tab. 6).

24 Wochen: Gruppe B (VKB_{elongiert+HF})

Wie in Gruppe A (VKB_{elongiert}) fand sich in der mit HF-Energie behandelten Gruppe B im Vergleich zum nativen VKB in der subsynovialen und der intermediären Zone ein tendenzieller Anstieg der Gefäßdichte. Vergleicht man die drei definierten Zonen der einzelnen Studiengruppen miteinander, so ist festzustellen, dass in der Gruppe B ein kontinuierlicher Rückgang der Gefäßanschnitte/ mm² in Richtung zentral zu verzeichnen war. Es fand sich eine signifikant geringere Anzahl an Gefäßanschnitten zentral (35 ± 16 mm²) als in der subsynovialen (111 ± 48 mm²) und intermediären Region (85 ± 65 mm²) ($p < 0,05$).

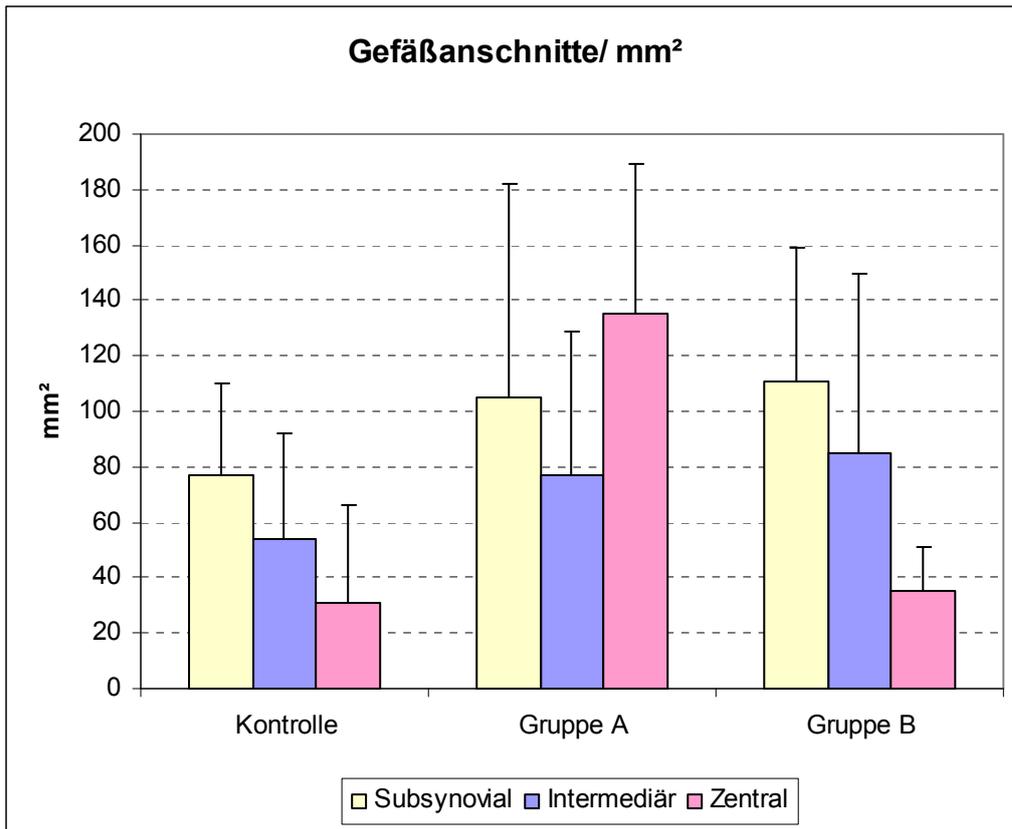
Zusätzlich zeigte sich in der deskriptiven Analyse der subsynovialen und der intermediären Zone der Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}) vor allem im Bereich der HF-Applikation der vorderen (anterioren) VKB-Seite ein vermehrte Vaskularisierung im Vergleich zu unbehandelten hinteren Bandanteilen.



Region	Kontrolle (VKB _{nativ})	Gruppe A (VKB _{elongiert})	Gruppe B (VKB _{elongiert+HF})
Subsynovial	77 ± 33	105 ± 77	111 ± 48
Intermediär	54 ± 38	77 ± 52	85 ± 65
Zentral	31 ± 35	135 ± 54■	35 ± 16

■ signifikant größer gegenüber Gruppe B und intaktem VKB, p < 0,05

Tabelle 6: Übersicht über die Gefäßanschnitte/ mm² in den Regionen subsynovial, intermediär und zentral der drei Studiengruppen A, B und VKB_{nativ}.



Grafik 3: Grafischer Überblick über die Gefäßanschnitte in den subsynovialen, intermediären und zentralen VKB-Abschnitten der Studiengruppen A, B und VKB nativ.

4. DISKUSSION

Die ersten klinischen Ergebnisse nach Anwendung von HF-Energie in der Schulterchirurgie waren viel versprechend und führten nachweislich in den späten 1990er Jahren zur raschen und weit verbreiteten Verwendung der HF-Energie in der Kreuzbandchirurgie [21,35,50,70,83,110,126,131,134,139]. Da vor allem in ca. 10-28% aller Kreuzbandinsuffizienzen keine komplette Kreuzbandruptur sondern lediglich eine Partialruptur mit Elongation des VKB vorliegt und die Zahl der revisionsbedürftigen, weil elongierten und insuffizienten Kreuzbandtransplantaten nach VKB-Ersatz nach wie vor signifikant ist, wurde die Methode der thermischen Gewebeverkürzung als eine sinnvolle Therapiealternative gesehen [37,83].

Erste klinische Studien berichten jedoch von einem vorzeitigen Versagen des VKB nach Applikation von HF-Energie. In zwei Fallberichten wurden jeweils eine Spontanruptur sowie eine Autodigestionen 10 und 15 Wochen nach Applikation von elektrothermischer Energie bei elongierten Kreuzbändern beschrieben [110,131]. Eine weitere Studie mit 18 Patienten, bei denen entweder eine akute oder chronische Kreuzbandelongation vorlag, zeigte ein Versagen des VKB in den ersten vier Monaten in 61% der Fälle [21]. Eine Langzeitstudie mit 14 Patienten musste nach fünf Jahren bei 85% der Patienten ein komplettes Versagen des VKB feststellen [50]. Eine weitere Multicenterstudie mit 61 Patienten konnte bereits nach zwei Jahren eine Versagensrate von über 50% ermitteln. Hier zeigten die HF behandelten elongierten VKB-Transplantate mit 79% eine deutlich höhere Versagensrate als die nativen elongierten Kreuzbänder [131].

Andererseits findet sich in vier weiteren Studien, in bis zu 96% der Fälle nach einer HF-Applikation auf das elongierte native VKB zwei Jahre postoperativ, ein gutes klinisches Ergebnis [35,70,83,119]. Auffällig war hier lediglich das deutlich schlechtere Outcome (im IKDC- und Tegner Score) der VKB-Transplantate nach HF-Applikation im Vergleich zu den HF behandelten nativen VKB [35,119].

Mit der hier vorliegenden Studie war es möglich, ein Tiermodell zu entwickeln, das die typisch klinisch messbare Instabilität eines insuffizienten elongierten vorderen Kreuzbandes aufweist.

Die Entscheidung für die Wahl auf das Schaf als Tiermodell, begründet sich in den anatomischen und funktionellen Ähnlichkeiten und der damit einhergehenden guten

Vergleichbarkeit zum menschlichen Kniegelenk [4,117]. Ebenso waren die leichte Verfügbarkeit und Handhabbarkeit der Schafe ein positives Auswahlkriterium.

In der Literatur werden in verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche operative Methoden zur VKB-Elongation beschrieben [20,76]. In einer Arbeit von Keira et al. wurde ein Knochenzylinder mit der Insertionsstelle des VKB von tibial retrograd mittels Hohlfräse ausgesägt und standardisiert nach proximal verschoben. Der Knochenzylinder wurde mit einer Kortikalisschraube fixiert [76].

In der vorliegenden Studie wurde eine modifizierte Operationstechnik nach Keira et al. verwendet [76]. Das VKB wurde direkt mit seiner tibialen Insertionsstelle gehoben, drei mm nach proximal versetzt und ebenfalls mit einer Schraube fixiert. Mit dieser modifizierten Technik war es möglich, unter kontrollierter Erhaltung der tibialen Insertionsstelle das VKB standardisiert und unabhängig vom Fräswinkel des bei Keira et al. herausgelösten Knochenzylinders zu elongieren.

Vorangegangene Studien, die versuchten eine „echte“ Elongation durch Partialrupturen des VKB durchzuführen, zeigten eine fehlende Standardisierbarkeit der Elongation des VKB [31,106,150]. Unter gleich bleibender zyklischer Belastung des VKB kam es zu unterschiedlich starker Schädigung der Bänder und damit zu einer hohen Variabilität der mechanischen Rahmenbedingungen zum Zeitpunkt der HF-Behandlung. Dies beeinträchtigte den Vergleich der Präparate im Laufe der verschiedenen Heilungsphasen.

Seit Mitte der 1990er Jahre hat sich eine Reihe von Studiengruppen mit der Frage der Veränderung von kollagenem Gewebe nach Applikation von thermischer Energie befasst. Zu Beginn wurde die Anwendung von Laserenergie (LACS - laser assisted capsular shrinkage) und später von Hochfrequenzenergie (ETACS – electro-thermally assisted capsular shrinkage) insbesondere auf das kollagene Kapsel-Band-Gewebe in in-vitro sowie in-vivo Studien untersucht [22,52-63,86,90,103,122,128,129,143,148].

Histologische Untersuchungen nach Applikation von HF-Energie auf das VKB zum Zeitpunkt Null sind in der Vergangenheit mehrfach durchgeführt worden, jedoch ist die histomorphologische und biomechanische Transformation des VKB nach HF-Behandlung über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten hinaus unbekannt [31,78,79,91,106].

In der deskriptiven Analyse der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie zeigte sich unmittelbar nach HF-Behandlung des nativen VKB zum Zeitpunkt Null eine Aufhebung der regelmäßigen Kollagenstruktur des VKB. Die behandelten und die nicht behandelten Gewebereiche waren deutlich voneinander zu unterscheiden. Die Bereiche, die der HF-Energie direkt ausgesetzt waren, zeigten eine komplette Zelldestruktion und stellten sich avital dar. Die Zellkerne imponierten überwiegend pyknotisch und in der Polarisationsmikroskopie fand sich ein vollständiger Verlust des Kollagenkrimps in den HF behandelten VKB-Regionen. Die Kollagenfaserbündel erschienen homogen miteinander verschmolzen und imponierten wächsern. Es zeigte sich das typische Bild einer Koagulationsnekrose mit Karyorrhexis und Karyopyknose der Fibroblasten sowie das Bild einer Kollagenhyalinisierung.

Die in dieser Studie nachgewiesenen Gewebeerkrankungen des nativen VKB stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer veröffentlichter in-vitro Tierstudien zum Zeitpunkt Null [31,78,91].

Unserer Ansicht nach ist davon auszugehen, dass sich die einsetzenden Heilungsbeziehungsweise Regenerationsprozesse nach HF-Applikation am elongierten VKB im Verlauf ähnlich darstellen wie das Einheilverhalten eines freien Sehnentransplantates nach VKB-Ersatz. Im Rahmen vorangegangener Studien unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass das initial avitale Transplantat nach VKB-Ersatz einen Remodelingprozess durchläuft, bis es nach zirka 24 Wochen zu einer zumindest teilweisen Wiederherstellung der histomorphologischen und biomechanischen Eigenschaften des nativen VKB kommt [142,155].

1993 postulierten Bosch et al. für den autologen VKB-Ersatz drei fließend ineinander übergehende Heilungsphasen, welche als sogenanntes Bandremodeling bezeichnet wurden [15]. In der initialen Phase, die geprägt ist von Zellnekrose und Gewebedegradation, wächst zunehmend hyperzelluläres und hypervaskuläres Bindegewebe ein. In der Revitalisierungsphase wird das avitale Transplantat durch zell- und gefäßreiches Bindegewebe ersetzt. In dieser Phase lässt sich biomechanisch die geringste Zugfestigkeit und Elastizität des VKB-Ersatzes feststellen [140,162]. In der letzten, eigentlichen Remodelingphase, organisiert sich die Extrazellulärmatrix bis zur 24. Woche postoperativ zunehmend, Zell- und Gefäßdichte nehmen ab und normalisieren sich.

Diese verschiedenen Phasen werden analog in tierexperimentellen Studien zur Auswirkung der HF-Applikation auf extraartikuläres kollagenes Gewebe beschrieben [2,54,55,57,59-62,86,98,116,122]. So fanden Hecht et al. zwei Wochen nach HF-Anwendung auf das Kapselgewebe von Schafsknien weiterhin hyalinisierte Bereiche, deren Grenzen von proliferierenden Fibroblasten und Kapillaren infiltriert wurden. Nach einer Rekonvaleszenz von sechs Wochen waren die azellulären Bereiche fast vollständig durch hyperzelluläres Bindegewebe ersetzt. Die normale wellig-lamelläre Anordnung der Kollagenfaserbündel zeigte sich in dieser Studie nach 12 Wochen [62]. In einer Studie von Hayashi et al. konnte drei Monate nach dem Eingriff kein hyalinisiertes Kollagen mehr nachgewiesen werden. Dies wird damit erklärt, dass die neu einwachsenden Fibroblasten das azelluläre hyalinisierte Kollagen als ein Gerüst zur Migration und Synthese der neuen Extrazellulärmatrix nutzen [59].

Bezüglich der Auswirkung von HF-Energie auf das VKB findet sich in der Literatur lediglich eine Studie. In dieser untersuchten Kondo et al. die Gewebereaktion 6 und 12 Wochen nach Applikation von bipolarer HF-Energie auf das posterolaterale (PL-) VKB-Bündel des Kaninchens. Sie wiesen im behandelten Bereich des PL-Bündels einwachsendes Granulationsgewebe mit zahlreichen runden Fibroblasten und Entzündungszellen nach. Die kollagenen Fasern zeigten sich bei aufgehobener Crimpstruktur locker miteinander verwoben [78]. Eine weitere Studie von Lopez et al. an Hunden musste vorzeitig abgebrochen werden, da es etwa um den 55. postoperativen Tag bei allen Tieren zu einer Kreuzbandruptur kam. Tierexperimentelle Studien über den Regenerationsprozess des VKB mehr als drei Monaten nach HF-Applikation sind in der Literatur nicht zu finden [89].

Mit der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals das Heilungsverhalten des elongierten, HF behandelten VKB über den Zeitraum von mehr als drei Monaten abgebildet werden. Es wurde der Zeitraum von 24 Wochen gewählt, da die thermische Verkürzung des VKB als Alternative zum VKB-Ersatz des elongierten VKB betrachtet wird und daher mit dem Remodelingverlauf des Kreuzbandtransplantates, das im Schafmodell nach 24 Wochen weitgehend die Eigenschaften des nativen VKB wieder erreicht hat, verglichen werden sollte [142, 154].

In der biomechanischen Analyse unserer Studie konnte zum Zeitpunkt Null nach HF-Applikation eine gute Reduktion der AP-Laxizität erzielt werden. Hingegen konnte dieses Ergebnis über die Zeit nicht beibehalten werden. Das elongierte und mit HF-

Energie verkürzte VKB hat nach 24 Wochen die biomechanischen Eigenschaften des nativen VKB noch nicht wieder erreicht. Es zeigt sich eine signifikant geringere Ausrissfestigkeit und Steifigkeit bei signifikant erhöhter AP-Laxizität im Vergleich zum nativen VKB.

Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus der histologischen Analyse der Gruppe B (VKB *elongiert+HF*), die einen Prozess intensiver Geweberepopulation und -reorganisation zeigt, mit Zellzahlen, die signifikant höher waren als in der unbehandelten Gruppe A (VKB *elongiert*) und der Kontrollgruppe (VKB *nativ*). Es ist anzunehmen, dass die Ausbildung der Koagulationsnekrose mit Hyalinisierung des Gewebes den Regenerationsprozess deutlich verzögert. Daher ist es wahrscheinlich, dass nach 24 Wochen der Nachweis von stark hyperzellulärem Bindegewebe im ehemals avitalen Gewebe anzeigt, dass der eingesetzte Regenerationsprozess noch nicht abgeschlossen und damit die Verhältnisse des nativen VKB, anders als beim VKB-Transplantat, noch nicht erreicht sind. Diese Annahme wird durch die Tatsache bekräftigt, dass in Gruppe B (VKB *elongiert+HF*) im Bereich der anterioren VKB-Seite, an der die HF-Applikation erfolgt, eine deutlich höhere Zellzahl im Vergleich zum elongierten VKB (Gruppe A) besteht. An der posterioren VKB-seite (thermisch nicht beeinflusst) zeigt sich hingegen die Zellzahl vergleichbar mit der des elongierten VKB (Gruppe A). Desweiteren ist aus vorangegangenen biomechanischen Studien bekannt, dass eine massive Zellproliferation als Folge der Gewebsnekrose die mechanischen Eigenschaften des Transplantates im Vergleich zum nativen Band signifikant reduziert [140,162].

Nach 24 Wochen zeigten die HF behandelten Kreuzbänder noch einen signifikant verkürzten Kollagencrimp im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Ihre Erscheinung glich der einer adhäsiven Kapsulitis oder eines M. Dupuytren mit stark ungeordneten Kollagenfasern und kurzer Frequenz, Erkrankungen die mit einer starken Gewebeverkürzung und hoher Zellpopulation einhergehen [44]. In Verbindung mit der zuvor geschilderten stark erhöhten Zellzahl des HF behandelten VKB (Gruppe B) signalisiert dies eine noch nicht abgeschlossene Neubildung der Extrazellulärmatrix nach initialer Azellularität und Verlust der Kollagentertiärstruktur.

Die Gefäßdichte der HF behandelten Präparate war nach 24 Wochen in der subsynovialen und intermediären Region tendenziell höher als im nativen VKB. Da die Gefäßdichte des HF behandelten VKB in der vorliegenden Studie als ein Mittelwert der Gefäßdichte aus verschiedenen Gesichtsfeldern, das heißt sowohl von verkürztem als auch nicht verkürztem Gewebe dargestellt wurde, waren statistisch signifikante

Differenzen nicht herauszuarbeiten. Dennoch konnte insbesondere in den anterioren Regionen der Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}) (direkter Kontakt der HF-Elektrode) eine konstant erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zum nativen VKB gezeigt werden.

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte ein kontinuierliches Einwachsen von Kapillaren nach VKB-Ersatz in das avaskuläre Transplantatgewebe von peripher nach zentral nachgewiesen werden [142]. So fand sich die höchste Gefäßdichte 6 und 9 Wochen nach Transplantation; nach 24 Wochen zeigte sich bis auf den zentralen Bereich bereits wieder ein Gefäßstatus vergleichbar mit dem nativen VKB. Diese Beobachtungen korrelierten mit den biomechanischen Ergebnissen. So wies das Transplantat bezüglich AP-Laxizität und Ausreißkraft nach 6 und 9 Wochen seine geringste Widerstandskraft auf. Bei abnehmender Gefäßdichte zeigte das Transplantat im Laufe der Zeit eine zunehmende Ausrissfestigkeit [154].

Weitere Studien konnten ebenfalls eine Korrelation zwischen Gefäßdichte und mechanischer Festigkeit nachweisen. Petersen et al. zeigten, dass die Expression des Angiogenesefaktors vascular endothelial growth factor (VEGF) und seiner Rezeptoren während der ersten 12 Wochen des Remodelingprozesses am höchsten ist. Im weiteren Verlauf verringerte sich die Expression und war somit ebenfalls korrelierend mit der Gefäßdichte und der Ausrisskraft des Transplantates [112].

Somit kann die erhöhte Gefäßdichte wie im anterioren, HF behandelten Bereich nachgewiesen, ebenfalls für die in der vorliegenden Studie erhobenen reduzierten biomechanischen Eigenschaften der Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}) verantwortlich sein.

Die Zellzahl und die Gefäßdichte im zentralen Bereich des rein elongierten VKB (Gruppe A) lagen nach 24 Wochen Standzeit ebenfalls signifikant über der des nativen VKB. Auch die biomechanischen Ergebnisse der maximalen Ausrisskraft unserer Studie zeigten nach 24 Wochen deutlich geringere Werte als das native VKB.

Eine Studie von Tohyama et al. konnte belegen, dass die Vorspannung eines Kreuzbandtransplantates bei der Implantation einen entscheidenden Effekt auf das Remodelingverhalten des Transplantates hat. Sie konnten in einem in-situ Gefriermodell am Kaninchen nachweisen, dass eine fehlende Belastung des Transplantates genauso wie eine Überlastung die mechanischen Eigenschaften des Transplantates signifikant reduzieren [141].

Demzufolge ist davon auszugehen, dass in der vorliegenden Studie schon allein durch Aufhebung der physiologischen Grundspannung, durch eine Proximalisierung der

tibialen Insertionsstelle des VKB und die partielle Verletzung der synovialen Hülle am tibialen Ansatz, ein Remodelingprozess mit Fibroblastenrepopulation und Revaskularisierung des Bandes initiiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Regenerationsprozesse im elongierten und HF behandelten VKB im Gegensatz zum VKB-Transplantat nach 24 Wochen die histomorphologischen wie auch biomechanischen Eigenschaften des nativen VKB nicht erreicht haben. Als Ursache hierfür sind die noch signifikant erhöhte Zellzahl, die ungeordnete Kollagentertiärstruktur und die vermehrte Gefäßdichte des Bandes zu sehen.

Einige Besonderheiten der vorliegenden Studie sollten berücksichtigt werden:

Zwischen den auf dem Markt erhältlichen HF-Geräten gibt es große Unterschiede bezüglich ihrer Einstellungsmöglichkeiten. Das HF-Gerät, welches in der vorliegenden Studie verwendet wurde, war monopolar und erlaubte nur die in der Studie verwendete Einstellung der zu applizierenden Energie. Intraoperative Temperaturmessungen an der Elektrodenspitze des HF-Gerätes waren nicht möglich. Es konnte jedoch in einer vorangegangenen Versuchsreihe nachgewiesen werden, dass am Übergang zwischen Bandgewebe und Elektrodenspitze eine Temperaturschwankung von $\pm 7^{\circ}\text{C}$ bestand. Das HF-Instrumentarium der neuesten Generation ist temperaturgesteuert und bipolar, was Temperaturschwankungen weiter reduzieren kann [128, 129].

In der vorliegenden Studie wurde die HF-Applikation exakt so durchgeführt, wie es im klinischen Alltag die Regel ist. Die Dauer der HF-Applikation wurde somit nicht standardisiert, da die Kreuzbänder der einzelnen Tiere unterschiedlich lange Applikationszeiten benötigten, um die AP-Laxizität aufzuheben. Eine erfolgreiche Gewebeverkürzung nach der Behandlung mit HF-Energie wurde anhand von Stabilitätsprüfungen mittels Schubladentest und durch einen Spannungstest des VKB durch ein und denselben erfahrenen Operateur durchgeführt.

Die Ergebnisse der Studie sind weiterhin abhängig von der Applikationstechnik. In der vorliegenden Studie wurden die Kreuzbänder durch kontinuierliches Entlangstreichen an der gesamten anterioren Zirkumferenz des Kreuzbandes mit konstanter Geschwindigkeit behandelt. Die Heilung des Gewebes zeigt sich abhängig von der

Applikationsform (Paintbrush/ gleichmäßig vertikal oder grid/ rasterförmig) [90]. Eine von Lu et al. durchgeführte Studie befasste sich mit dem zeitlichen Vergleich der Verläufe nach rasterförmiger und gleichmäßiger vertikaler Applikation.

Des Weiteren wird angenommen, dass eine zu frühe Belastung des HF-behandelten Bandes die Heilung beeinträchtigt [115]. Es herrscht jedoch keine Einigkeit darüber, welches Nachbehandlungsprotokoll am geeignetsten ist. In der vorliegenden Studie konnten die Tiere schmerzadaptiert voll belasten. Um ein zu frühes exzessives Belasten zu vermeiden, wurde eine Achillotenotomie durchgeführt. Ein zu frühes, aber auch ein sehr spätes Erreichen der Vollbelastung könnte Einfluss auf die Heilung des HF behandelten VKB nehmen.

Für die Kontrollgruppe des intakten VKB wurden die kontralateralen Kreuzbänder der 24 Wochen Tiere verwendet. Bis zur Erreichung der normalen Belastung der operierten Seite wurden diese Kreuzbänder deutlich stärker belastet. Es kann angenommen werden, dass die mechanischen Eigenschaften dieser VKB höher einzustufen sind als im Normalfall. Dieser Fehler ist jedoch als systematisch anzunehmen und wird in anderen Studien ebenfalls so durchgeführt.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass der Heilungsprozess des elongierten und HF verkürzten VKB nach 24 Wochen noch nicht abgeschlossen ist und somit auch die biomechanischen Eigenschaften des nativen VKB noch nicht wieder erreicht wurden. Die zum Zeitpunkt Null nach HF-Applikation erzielte gute Reduktion der AP-Laxizität konnte über die Zeit nicht beibehalten werden, was im Vergleich zur VKB-Rekonstruktion mit unbehandelten Sehnen zu erwarten gewesen wäre.

Nachfolgende Studien sollten zeigen, ob und zu welchem Zeitpunkt das HF behandelte VKB sich den histomorphologischen Eigenschaften des nativen VKB wieder annähert und eine entsprechende höhere biomechanische Belastbarkeit erzielt werden kann.

Der Einfluss verschiedener Einstellungen von aktuellen HF-Geräten auf die strukturellen Veränderungen des VKB ist zu analysieren. Dies würde es ermöglichen, eine optimierte und damit sicherere Einstellung zu finden, die auch bei optimaler Gewebeverkürzung so wenig wie möglich vitales Gewebe zerstört, um eine möglicherweise schnellere Wiederherstellung der VKB Stabilität zu erzielen. Des Weiteren müssen Nachbehandlungsprotokolle erstellt werden, die die verzögerte

Heilung und verminderten mechanischen Eigenschaften des HF behandelten Bandgewebes berücksichtigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die thermische Verkürzung des elongierten vorderen Kreuzbandes und seiner Transplantate mittels HF-Energie findet als eine Alternative zum VKB-Ersatz in der Kniegelenkschirurgie zunehmend eine breite Anwendung. Dennoch sind in der Literatur bislang sehr widersprüchliche Ergebnisse nach Verwendung von HF-Energie am VKB dokumentiert. Die vorliegende Arbeit sollte demnach die biologische Antwort der thermisch stimulierten Kollagenfasern histologisch und immunhistologisch analysieren. Des Weiteren sollte anhand des Heilungsverhaltens des VKB nach elektrochirurgischer Raffung im Schafsknie der Frage nachgegangen werden, ob durch die thermische Bandraffung mittels HF-Koagulation eine dauerhafte Stabilisierung einer Bandelongation erreicht werden kann und inwieweit klinische Ergebnisse mit der Histologie und der Biomechanik korrelierbar sind. Die Erfassung der Zellzahl, des Crimps und die Anzahl der Gefäße in Bezug auf das intakte VKB zum Zeitpunkt Null sowie nach 24 Wochen standen hierbei im Vordergrund.

Bei 16 weiblichen Merinoschafen wurde durch Anheben der tibialen VKB-Insertion eine chronische VKB-Elongation simuliert. Die Tiere wurden in 2 Gruppen unterteilt. Die Gruppe A erhielt keine weitere Therapie, während in Gruppe B mittels HF-Energie das elongierte VKB wieder verkürzt wurde.

In der deskriptiven Analyse unserer Studie zeigte sich unmittelbar nach HF-Behandlung des nativen VKB zum Zeitpunkt Null eine Aufhebung der regelmäßigen Kollagenstruktur des VKB. Die Bereiche die der HF-Energie direkt ausgesetzt waren, zeigten eine komplette Zerstörung und stellten sich avital dar. Es konnte das typische Bild einer Koagulationsnekrose mit Karyorrhesis und Karyopyknose der Fibroblasten sowie einer Kollagenhyalinisierung nachgewiesen werden.

24 Wochen postoperativ zeigte sich in Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}) eine signifikante Hyperzellularität gegenüber dem rein elongierten VKB (Gruppe A) sowie der Kontrollgruppe (VKB_{nativ}). Zusätzlich war die Gefäßdichte der HF behandelten Präparate nach 24 Wochen in der subsynovialen und intermediären Region tendenziell höher als im nativen VKB. Dennoch konnten wir vor allem in den anterioren Regionen der Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}) (direkter Kontakt der HF-Elektrode) eine konstant erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zum nativen VKB zeigen.

Biomechanisch erreichte das elongierte und mit HF-Energie verkürzte VKB nach 24 Wochen (Gruppe B) noch nicht die Eigenschaften des nativen VKB wieder. Es zeigte sich eine signifikant geringere Ausrissfestigkeit und Steifigkeit bei signifikant erhöhter AP-Laxizität im Vergleich zum nativen VKB. Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus der histologischen Analyse der Gruppe B (VKB_{elongiert+HF}), welche einen Prozess intensiver Geweberepopulation und -reorganisation zeigte, mit Zellzahlen, die signifikant höher waren als in der unbehandelten Gruppe A (VKB_{elongiert}) und der Kontrollgruppe (VKB_{nativ}).

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die Regenerationsprozesse im elongierten und HF behandelten VKB im Gegensatz zum VKB-Transplantat nach 24 Wochen noch nicht abgeschlossen sind. Sowohl die histomorphologischen als auch die biomechanischen Eigenschaften des nativen VKB wurden nicht erreicht. Als Ursache hierfür sind die noch signifikant erhöhte Zellzahl, die ungeordnete Kollagentertiärstruktur und die vermehrte Gefäßdichte des Bandes zu sehen.

Nachfolgende Studien sollten zeigen, ob und zu welchem Zeitpunkt das HF behandelte VKB sich den histomorphologischen Eigenschaften des nativen VKB wieder annähert und eine entsprechende höhere biomechanische Belastbarkeit erzielt werden kann.

6. LITERATUR

1. Abbot LC, Saunders JB, Bost FC: Injuries to the ligaments of the knee joint. *J Bone Joint Surg Am* 26A: 503-521, 1944
2. Abelow SP: Laser capsulorrhaphy for multidirectional instability of the shoulder. *Oper Tech Sports Med* 5: 244-248, 1997
3. Allain JC, Le Lous M, Cohen-Solal L, Bazin S, Marotreaux P: Isometric tension developed during the thermal swelling of rat skin. *Connect Tissue Res* 7: 127-133, 1980
4. Allen MJ, Houlton JE; Adams SB and Rushton N: The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg* 27(6): 596-605, 1998
5. Alm A, Stromberg B.: Vascular anatomy of the patellar and cruciate ligaments. A microangiographic and histologic investigation in the dog. *Acta Chirurgica Scandinavica –Suppl* 445: 25-35, 1974
6. Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akenson W: Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* 1: 257-265, 1984
7. Amis AA, Dawkins GP: A functional anatomy of the anterior cruciate ligament: fiber bundle actions related to ligament replacement and injuries. *J Bone Joint Surg Br* 73: 260-267, 1991
8. Arnoczky SP: Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*:19-25, 1983
9. Arnoczky SP: Thermal modification of connective tissues: Basic science considerations and clinical implications. *J Am Acad Orthop Surg* 5: 305-313, 2000

10. Bable W: Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer. *Chemie in unserer Zeit* 2: 86-95, 1989
11. Barrack RL, Bruckner JD, Kneisl J: The outcome of nonoperatively treated complete tears of the anterior cruciate ligament in active young adults. *Clin Orthop*: 192-199, 1990
12. Batman JF, Lemand SR, Ramshaw JM: Collagen superfamily. Editor: Comper WD: *Extracellular matrix. Vol 2. Molecular components and interaction.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 22-67, 1996
13. Boden BP, Feagin JA Jr: Natural history of the ACL-deficient knee. *Sports Med Arthrosc Rev* 5: 20–28, 1997
14. Boenisch T: Antikörper. *Handbuch immunchemischer Färbemethoden II* 3:9-15, 2002
15. Bosch U, Kasperczyk WJ: The healing process after cruciate ligament repair in the sheep model. *Orthop* 22: 366-371, 1993
16. Brand J, Weiler A, Caborn DN, Brown CH, Johnson DL: Graft fixation in cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 28: 761-774, 2000
17. Bray DF, Frank CB, Bray RC: Cytochemical evidence for a proteoglycan-associated filamentous network in ligament extracellular matrix. *J Orthop Res* 8:1-12, 1990
18. Buchwalter JA, Cooper RR: The cells and matrices of skeletal connective tissues skeletal fibrous tissue. IN: Albringht JA, Brand RA. *The scientific basic of orthopedics.* Appleton and Lange. 1-29, 1987

19. Buchwalter JA, Maynard JA, Vailas AC: Skeletal fibrous tissue: tendon, joint capsule and ligament. In: Albringht JA, Brand RA. The scientific basic of orthopedics. Appleton and Lange, 1987
20. Bush-Joseph CA, Cummings JF, Buseck M, Bylski-Austrow DI, Butler DL, Noyes FR, Grood ES: Effect of tibial attachment location on the healing of the anterior cruciate ligament freeze model. J Orthop Res 14(4): 534-541, 1996
21. Carter TR, Bailie DS, Edinger S: Radiofrequency electrothermal shrinkage of the anterior cruciate ligament. Am J Sports Med 30(2): 221-226, 2002
22. Chen SS, Wright NT, Humphrey JD: Heat-induced changes in the mechanics of a collagenous tissue: isothermal free shrinkage. J Biomech Eng 119: 372-378, 1997
23. Chvapil M, Jensovsky L: The shrinkage temperature if collagen fibres isolated from the tail tendons of rats of various ages and from different places of the same tendon. Gerontologia 1: 18-29, 1963
24. Clancy WG, Nelson DA, Reider B, Narechania RG: Anterior cruciate reconstruction using one third of the patella ligament augmented by extraarticular tendon transfer. J Bone Surg 64: 352-359, 1982
25. Corry IS, Webb JM, Clingeffer AJ, Pinczewski L A: Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. A comparison of patellar tendon autograft and four-strang hamstring tendon autograft. Am J Sports Med 27: 444-454, 1999
26. Crumay HM: Electrosurgery. Author Coldschmidt. Physical modalities in dermatologic therapy. New York, Springer Verlag, 1978

27. Daniel DM, Stone ML, Dobson BE, Fithian DC, Rossman DJ, Kaufman KR: The fate of the ACL injured patient. A prospective outcome study. *Am J Sports Med*: 22: 632-644, 1994
28. D'Alessandro DF, Bradley JP, Fleischli JE, Connor PM: Prospective evaluation of thermal capsulorrhaphy for shoulder instability: indications and results, two- to five-year follow-up. *Am J Sports Med* 32: 21-33, 2004
29. Dillingham M: Arthroscopic electrothermal surgery of the knee. *Oper Tech Sports Med* 6: 154–156, 1998
30. Dodds JA, Arnoczky SP: Anatomy of the cruciate ligament: a blueprint for repair and reconstruction. *Arthroscopy* 10 (2): 132-139, 1994
31. Dodds SD, Panjabi MM, Daigneault JP: Radiofrequency probe treatment for subfailure ligament injury. A biomechanical study of a rabbit ACL. *Clin Biomech* 19: 175-185, 2004
32. Dye SF, Cannon WD, Jr. Anatomy and biomechanics of the anterior cruciate ligament. *Clinics in Sports Medicine* 7: 715-25, 1988
33. Eberhardt C, Welsch F, Kurth A, Zichner L, Jäger A: Osteoarthritis and knee stability in revision anterior cruciate ligament reconstruction. Midterm results using autogenous patellar tendon graft. *Aktuelle Traumatol* 30: 163–167, 2000
34. Fanton GS: Arthroscopic electrothermal surgery in the shoulder. *Oper Tech Sports Mes* 6(3): 139-146, 1998
35. Farnig E, Hunt S, Rose DJ, Sherman OH: Anterior cruciate ligament radiofrequency thermal shrinkage: a short follow-up. *Arthroscopy* 21: 1027-1033, 2005

36. Feagin JA Jr, Curl WW: Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study. *Clin Orthop Relat Res* 325: 4-9, 1996
37. Finch A, Ledward DA: Shrinkage of collagen fibers: A differential scanning calorimetric study. *Biochem Biophys Acta* 278: 433-439, 1972
38. Fink C, Hoser C, Benedetto KP: Arthroseentwicklung nach Ruptur des vorderen Kreuzbands. Ein Vergleich operativer und konservativer Therapie. *Unfallchirurg* 97: 357-361, 1994
39. Flory PJ, Garrett RR: Phase transition in collagen and gelatin systems. *J Am Chem Soc* 80: 4836-4845, 1958
40. Frank C, McDonald D, Bray R, Rangayyan R, Chimich D, Shirve N: Collagen fibril diameters in the healing adult rabbit medial collateral ligament. *Connect Tiss Res* 27: 251-263, 1992
41. Frank CB, Jackson DW: The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 79: 1556-1576, 1996
42. Frank CB, Woo SL, Andriacchi T: Normal ligament: structure, function and composition. *A Acad Orthop Surg*: 45-101, 1988
43. Fu FH, Bennet CH, Ma B: Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part II: Operative procedures and clinical correlations. *Am J Sports Med* 28: 124-130, 2000
44. Gabbiani G, Majno G: Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66:131-146, 1972

45. Gerber A, Warner J: Thermal Capsulorrhaphy to treat shoulder instability. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 400: 105-116, 2002
46. Gillquist J, Messner K: Anterior cruciate ligament reconstruction and the long-term incidence of gonarthrosis. *Sports Med* 27: 143-156, 1999
47. Girgis FG, Marshall JL, AL Monajem ARS: The cruciate ligaments of the knee joint. *Clinic Orthop* 106: 216-231, 1975
48. Griffin LY, Agel J, Albohm MJ: Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies. *J Am Acad Orthop Surg* 3: 141-150, 2000
49. Haag R, Cuschieri A: Recent advances in high-frequency electrosurgery: development of automated Systems. *J R Coll Surg Edinb* 38: 354-364, 1993
50. Halbrecht J: Long-term failure of thermal shrinkage for laxity of anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* 33: 990-995, 2005
51. Haly AR, Snaith JW: Calorimetry of rat tail tendon collagen before and after denaturation: the heat of fusion of its absorbed water. *Biopolymers* 10: 1681-1699, 1971
52. Hayashi K, Hecht P, Thabit G, III, Peters DM, Vanderby R, Jr., Cooley AJ, Fanton GS, Orwin JF, Markel MD: The biologic response to laser thermal modification in an in vivo sheep model. *Clin Orthop* 265-276, 2000
53. Hayashi K, Markel MD: Thermal capsulorrhaphy treatment of shoulder instability: basic science. *Clin Orthop* 59-72, 2001
54. Hayashi K, Markel MD: Thermal modification of joint capsule and ligamentous tissues. *Oper Tech Sports Med* 6: 120-125, 1998

55. Hayashi K, Markel MD, Thabit G: The effect of nonablative laser energy on joint capsular properties: An in vitro mechanical study using a rabbit model. *Am J Sports Med* 23: 482-487, 1995
56. Hayashi K, Massa KL, Thabit G, III, Fanton GS, Dillingham MF, Gilchrist KW, Markel MD: Histologic evaluation of the glenohumeral joint capsule after the laser-assisted capsular shift procedure for glenohumeral instability. *Am J Sports Med* 27: 162-167, 1999
57. Hayashi K, Nieckarz JA, Thabit G, III, Bogdanske JJ, Cooley AJ, Markel MD: Effect of nonablative laser energy on the joint capsule: an in vivo rabbit study using a holmium:YAG laser. *Lasers Surg Med* 20: 164-171, 1997
58. Hayashi K, Peters DM, Thabit G III: The mechanism of joint capsule thermal modification in an in-vitro sheep model. *Clin Orthop* 370: 236-249, 2000
59. Hayashi K; Thabit G III, Bogdanske JJ: The effect of thermal heating on the length and histologic properties of the glenohumeral joint capsule. *Am J Sports Med* 24: 640-646, 1997
60. Hayashi K; Thabit G III, Bogdanske JJ, Thielke RJ: The effect of nonablative laser energy on joint capsular properties. An in vitro mechanical study using a rabbit model. *Am J Sports Med* 23(4): 482-7, 1995
61. Hayashi K, Thabit G III, Bogdanske JJ, Mascio LN, Markel MD: The effect of nonablative laser energy on the ultrastructure of joint capsular collagen. *Arthroscopy* 12(4): 474-81, 1996
62. Hecht P, Hayashi K, Cooley AJ, Lu Y, Fanton GS, Thabit G III, Markel MD: The thermal effect of monopolar radiofrequency energy on the properties of joint

- capsule. An in vivo histologic study using a sheep model. Am J Sports Med 26: 808-814, 1998
63. Hecht P, Hayashi K, Lu Y, Fanton GS, Thabit G III, Vanderby R, Markel MD: Monopolar radiofrequency energy effects on joint capsular tissue: potential treatment for joint instability. An in vivo mechanical, morphological, and biochemical study using an ovine model. Am J Sports Med 27(6): 761-71, 1999
 64. Hertel P: Technik der offenen Ersatzplastik des vorderen Kreuzbandes mit autologer Patellarsehne. Anatomische Rekonstruktion in der schraubenfreien Press-fit-Technik. Arthroskopie 10: 240-245, 1997
 65. Hofmann E: Medizinische Biochemie-systematisch. Uni-Med Verlag AG, S. 672, 1996
 66. Horgan DJ, King NL, Kurth LB, Kuypers R: Collagen crosslinks and their relationship to the thermal properties of calf tendons. Arch Bioch Biophys 281: 21-26, 1990
 67. Imhoff A: Die arthroskopische vordere Kreuzbandplastik mit selbstverblockendem freien Lig. patellae-Transplantat -Erste Ergebnisse. Arthroskopie 6: 153-163, 1993
 68. Imhoff A, Martinek V, Öttl G: Revisionschirurgie bei chronischer Knieinstabilität. In: Kohn D (Hrsg) Das Knie. Thieme, Stuttgart New York, S. 174-179, 2000
 69. Imhoff A, Papandreu A, Rodriguez M: Vier-Jahresresultate nach vorderer Kreuzbandplastik nach Insall. Z Orthop 127: 152-162, 1989
 70. Indelli PF, Dillingham MF, Fanton GS, Schurman DJ: Monopolar thermal treatment of symptomatic anterior cruciate ligament instability. Clin Orthop (407): 139-47, 2003

71. Jakob R, Stäubli H: The knee and the cruciate ligaments anatomy. Biomechanics Clinical Aspects, Reconstruction, Complications, Rehabilitation, Springer Verlag: S.75 , 1992
72. Jomha NM, Borton DC, Clingeleffer AJ: Long-term osteoarthritic changes in anterior cruciate ligament reconstructed knees. Clinical Orthopaedics & Related Research 188-193, 1999
73. Junqueira LC: Histologie, Springer Verlag, Berlin. S. 61, 2002
74. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W: Taschenatlas der Anatomie- für Studium und Praxis, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. S.205, 1991
75. Kannus P, Jarvinen M: Posttraumatic anterior cruciate ligament insufficiency as a cause of osteoarthritis in a knee joint. Clinical Rheumatology 8:251-260, 1989
76. Keira M, Yasuda K, Kaneda K, Yamamoto N, Hayashi K: Mechanical properties of the anterior cruciate ligament chronically relaxed by elevation of the tibial insertion. J Orthop Res 14(1): 157-66, 1996
77. Kielich TC, Klein W: Revision anterior cruciate ligament surgery with the quadruple semitendinosus tendon. Arthroscopy 13:155-158, 2000
78. Kondo E, Yasuda K, Kitamura N, Kudoh T, Minami A, Tohyama H: The effect of electrothermal shrinkage on biomechanical properties of the anterior cruciate ligament. An experimental study. Arthroscopy 21: 448-456, 2005
79. Kondo E, Yasuda K, Tohyama H: In vivo effects of partial electrothermal shrinkage on mechanical properties of the anterior cruciate ligament in rabbits. Clin Biomech 22: 1037-1044, 2007

80. Kramme R: Medizintechnik-Verfahren, Systeme, Informationsverarbeitung. Hochfrequenzchirurgie. Springer Verlag: 515-538
81. Kronick P, Maleeff B, Carroll R: The locations of collagen with different thermal stabilities in fibrils of bovine reticular dermis. *Connect Tissue Res* 18(2): 123-134, 1988
82. Krüger-Franke M, Buchner M, Rosemeyer B: Mid-term results after operative reconstruction of ACL-reruptures. *Unfallchirurg* 100: 274-279, 1997
83. Lamar DS, Bartolozzi AR, Freedman KB, Nagda SH, Fawcett C. Thermal modification of partial tear of the anterior cruciate ligament. *Arthroscopy* 21: 809-814, 2005
84. Le Lous M, Cohen-Solal I, Allain JC, Bonaventure J, Maroteaux P: Age related evolution of stable collagen reticulation in human skin. *Connect Tissue Res* 13: 145-155, 1985
85. Levy O, Wilson M, Williams H, Bruguera JA, Dodenhoff R, Sforza G, Copeland, S: Thermal capsular shrinkage for shoulder instability. Mid-term longitudinal outcome study. *J Bone Joint Surg Br* 83(5): 640-645, 2001
86. Lopez MJ, Hayashi K, Fanton GS, Thabit G, Markel MD: The effect of radiofrequency energy on the ultrastructure of joint capsular collagen. *Arthroscopy* 14: 495-500, 1998
87. Lopez MJ, Hayashi K, Vanderby R: Effect of monopolar radiofrequency energy on ovine joint capsular mechanical properties. *Clin Orthop* 374: 286-297, 2000
88. Lopez MJ, Kunz D, Vanderby R, Heisey D, Bogdanske J, Markel MD: A comparison of joint stability between anterior cruciate intact and deficient knees:

- a new canine model of anterior cruciate ligament disruption. *J Orthop Res*, 21(2): 224-230, 2003
89. Lopez MJ, Markel MD: Anterior cruciate ligament rupture after thermal treatment in a canine model. *American Orth Soc Sports Med* 31: 164-167, 2003
 90. Lu Y, Hayashi K, Edwards R: The effect of monopolar radiofrequency treatment pattern on joint capsular healing: In vitro and in vivo study using an ovine model. *Am J Sports Med* 28: 711-719, 2000
 91. Ma HL, Jiae WJ, Huang CH, Wang ST, Chen TH, Cheng CK, Hung SC: Thermal effects after anterior cruciate ligament shrinkage using radiofrequency technology: a porcine cadaver study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 13: 619-624, 2005
 92. Massarweh NN, Cosgriff N, Slakey DP: Electrosurgery: history, principles and current and future uses. *J American Coll surg* 202: 520-530, 2006
 93. Miyasaka KC, Daniel DM, Stone ML: The incidence of knee ligament injuries in the general population. *Am J Knee Surg* 4:3-8, 1991
 94. Müller W: *The Knee: Form, Function and Ligament Reconstruction*. First Edition ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1983
 95. Muir H: Proteoglycans as organizer of the extracellular matrix. *Biochem Soc Trans* 11: 613-622, 1983
 96. Mutschler W, Haas N: *Praxis der Unfallchirurgie; Ligamentäre Kniegelenksverletzungen und Meniskusläsionen*. Thieme Verlag Stuttgart, S 466, 1999

97. Nagy IZ, Toth VN, Verzar F: High-resolution electron microscopy of thermal collagen denaturation in tail tendons of young, adult and old rats. *Connect tiss Res* 2: 265-272, 1974
98. Naseef G, Forster T, Tauner K: The capsular thermal properties of the bovine joint capsule. *Am J Sports Med* 25: 670-674, 1997
99. Nath S, DiMarco JP, Haines DE: Basic aspect of radiofrequency catheter ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5:863-876, 1994
100. Nimni ME, Harkness RD: Molecular structure and function of collagen. IN Nimni ME: *Collagen; biochemistry*, Cleveland: 77, 1988
101. Norwood LA, Cross MJ: Anterior cruciate ligament: functional anatomy of its bundles in rotatory instabilities. *Am J Sports Med* 7: 23-26, 1979
102. O'Connor J, Bloom DA: William T Bovie and electrosurgery. *Surg* 119: 390-396, 1996
103. Obrzut SL, Hecht P, Hayashi K, Fanton GS, Thabit G, Markel MD: The effect of radiofrequency energy on the length and temperature properties of the glenohumeral joint capsule. *Arthroscopy* 14: 395-400, 1998
104. Oetl G, Imhoff AB: Revisionschirurgie bei fehlgeschlagener vorderer Kreuzbandplastik. *Zentralbl Chir* 123: 1033-1039, 1998
105. Organ, LW: Electrophysiological principles of radiofrequency lesion making. *Appl Neurophysiol* 39: 69-76, 1996
106. Ozenci AM, Panjabi MM: Injured rabbit ACL treated by radiofrequency. Effects of cyclic loading. *Clin Biomech* 20: 1079-1084, 2005

107. Palmer I: On the injuries of the ligaments of the knee joint. *Acta Chir Scand* 91: 282, 1938
108. Panni AS, Milano G, Tartarone M, Demontis A, Fabbriciani C: Clinical and radiographic result of ACL reconstruction: a 5- to 7 year follow-up study of outside-in versus inside-out reconstruction techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2: 77-85, 2001
109. Parry D.: The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys Chem*: 29: 195- 209, 1988
110. Perry JJ, Higgins LD: Anterior and posterior cruciate ligament rupture after thermal treatment. *Arthroscopy* 16(7): 732-736, 2000
111. Petersen W, Tillmann: Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes. *Orthopäde* 31: 710-718, 2002
112. Petersen W, Unterhauser FN, Pufe T, Zantop T, Sudkamp N, Weiler A: The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 123:168-174, 2003
113. Petersen W, Zantop T Anatomy of the anterior cruciate ligament with regard to its two bundles, *Clinical Orthopaedics & Related Research*: 35-47, 2007
114. Pollack SV: The history of electrosurgery. *Derm Surg* 26: 904-908, 2000
115. Potzl W; Witt KA, Hackenberg L, Heusner T, Steinbeck J: Influence of postoperative immobilization on tendon length after radiofrequency-induced shrinkage: an in vivo rabbit study. *Am J Sports Med* 31(1): 36-40, 2003

116. Pullin, JG, Collier MA, Johnson LL, De Bault LE, Walls RC: Holmium: YAG laser-assisted capsular shift in a canine model: intraartikulär pressure and histologic observation. *J should and elb surg* 6: 272-285, 1997
117. Radford WJP, Amis AA, Stead AC: The ovine stifle as a model for human cruciate ligament surgery. *Vet Comp Orthop Traumatol* 9: 134-139, 1996
118. Reidenbach, HD: Fundamentals of bipolar high-frequency surgery. Thieme Verlag 1: 85-90, 1993
119. Roach R, Roberts S, Rees D: The potential benefit of thermal shrinkage for lax anterior cruciate ligaments. *Acta Orthop Belg* 70: 247-752, 2004
120. Sachs M, Sudermann H: Aus der Geschichte des chirurgischen Instrumentariums: 7. Das erste elektrochirurgische Instrumentarium: Galvanokauter und elektrische Schneideschlinge (1854). *Zentralbl Chir* 123: 950-954, 1998
121. Schachar RA: Radial thermokeratoplasty. *Int Ophtalmol Clin* 31: 181-186, 1974
122. Schaefer SL, Ciarelli MJ, Arnoczky SP, Ross HE: Tissue shrinkage with the Holmium: Yttrium Aluminium Garnet laser: a postoperative assessment of tissue length, stiffness and structure. *Am J Sports Med* 25: 841-848, 1997
123. Scheffler SU, Dustmann M, Gangéy I: The biological healing and restoration of the mechanical properties of free soft-tissue allografts lag behind autologous ACL reconstruction in the sheep model. *Trans Orthop Res*, abstract#0236, Washington, DC, 2005

124. Scheffler SU, Schönfelder V, Hunt P, Chwastek H, Südkamp N, Weiler A: Mechanical and histological analysis of the chronically relaxed ACL after thermal radiofrequency shrinkage in a sheep model. *Arthroscopy* 19: 47-48, 2003
125. Schön F: *Elektrochirurgie in der Zahnheilkunde*. Quintessenz Verlags-GmbH:134-163, 1980
126. Sekiya JK, Golladay GJ; Wojtys EM: Autodigestion of a hamstring anterior cruciate ligament autograft following thermal shrinkage. A case report and sentinel of concern. *J Bone Joint Surg Am* 82-A(10): 1454-1457, 2000
127. Shaw EL, Gassett AR: Thermokeratoplasty (TKP) temperature profile. *Ophthalmology* 13: 181-186, 1974
128. Shellock FG: Radiofrequency energy-induced heating of bovine capsular tissue: Temperature changes produced by bipolar versus monopolar electrodes. *Arthroscopy* 17(2): 124-31, 2001
129. Shellock FG, Shields CL: Temperature changes associated with radiofrequency energy-induced heating of bovine capsular tissues: Evaluation of bipolar electrodes. *Arthroscopy* 16: 348-358, 2000
130. Sherk HH, Vangsness CT, Thabit G III, Jackson RW: Electromagnetic surgical devices in orthopaedics. *Lasers and radiofrequency*. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(4): 675-681, 2002
131. Smith DB, Carter TR, Johnson DH: High failure for electrothermal shrinkage of lax anterior cruciate ligament: a multicenter follow-up past 2 years. *J Arthroscopy and related surg* 24: 637-641, 2008

132. Smith SH, Judge MD: Relationship between pyridinoline concentration and thermal stability of bovine intramuscular collagen. *J Anim Sci* 1: 1989-1993, 1991
133. Sommerlath K, Lysholm J, Gillquist J: The long-term course after treatment of acute anterior cruciate ligament ruptures. A 9 to 16 year follow up. *Am J Sports Med* 19: 156-162, 1991
134. Spahn G, Schindler S: Tightening elongated ACL grafts by application of bipolar electromagnetic energy (ligament shrinkage). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 10(2): 66-72, 2002
135. Strocchi R, De Pasquale V, Gubellini P: The human anterior cruciate ligament: Histological and ultrastructural observations. *J Anat* 180: 515-519, 1992
136. Tackmann W: Das Binde und Stützgewebe. In: *Auxilium-Repetitorien der Histologie I* pp 58-89. Berlin, 1994
137. Takahashi M, Doi M, Abe M, Suzuki D, Nagano A: Anatomical Study of the femoral and tibial insertions of the anteromedial and posterolateral bundles of human anterior cruciate ligament. *A Orth Soc Sports Med* 34: 787-792, 2005
138. Tasto JP, Ash SA: Current uses of radiofrequency in arthroscopic knee surgery. *Am J Knee Surg* 12: 186-191, 1999
139. Thabit G III: The arthroscopic monopolar radiofrequency treatment of chronic anterior cruciate ligament instability. *Oper Tech Sports Med* 6: 157-160, 1998
140. Tohyama H, Yasuda K: Extrinsic cell infiltration and revascularization accelerate mechanical deterioration of the patellar tendon after fibroblast necrosis. *J Biomech Eng* 122: 594-599, 2000

141. Tohyama H, Yasuda K: Significance of graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 6: 30-31, 1998
142. Unterhauser FN, Bail HJ, Höher J, Haas NP, Weiler A: Endoligamentous revascularization of an anterior cruciate ligament graft. *Clin Orthop* 415, 2003
143. Vangsness CT, Mitchell W, Nimni M: Collagen shortening: An experimental approach with heat. *Clin Orthop* 337: 267-271, 1997
144. Van Haesendonck C, Sinnaeve A, Willems R, Vanderbulcke F, Stroobandt R: Biophysical and electrical aspect of radiofrequency catheter ablation. *Acta cardiol* 50: 105-115, 1995
145. Vergis A, Gillquist J: Graft failure in intra-articular anterior cruciate ligament reconstruction: a review of the literature. *Arthroscopy* 3: 312-321, 1995
146. Verzar F, Nagy IZ: Electronmicroscopic analysis of thermal collagen denaturation in rat tail tendons. *Gerontologia* 16: 77-82, 1970
147. Vorlat P, Verdonk R, Arnauw G: Long term results of tendon allografts for anterior cruciate ligament replacement in revision surgery and in cases of combined complex injuries. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 7: 318-322, 1999
148. Wall MS, Deng XH, Torzilli PA, Doty SB, O'Brien SH, Warren RF: Thermal modification of collagen. *L Shoulder Elbow Surg* 8: 339-344, 1999
149. Wallace AL, Hollinshead RM, Frank CB: The scientific basis of thermal capsular shrinkage. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 9: 354-360, 2000

150. Wallace AL, Hollinshead RM, Frank CB: Creep behavior of a rabbit model of ligament laxity after electrothermal shrinkage in vivo. *Am J Sports Med* 30(1): 98-102, 2002
151. Weber W: *Mechanik der menschlichen Gehwerkzeuge*. Göttingen: Dietrichsche Buchhandlung, 1836
152. Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ, Rehm O, Südkamp NP: Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 18(2): 124-135, 2002
153. Weiler A, Forster C, Hunt P: The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports med* 32: 881-891, 2004
154. Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A, Abel C, Südkamp NP, Hoffmann RF: Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 18(2): 113-123, 2002
155. Weiler A, Peters G, Maurer J, Unterhauser FN, Südkamp NP: Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep. *Am J Sports Med* 29(6): 751-761, 2001
156. Weiler A, Unterhauser FN, Bail HJ, Hüning M, Haas NP: Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *J Orthop Res* 20(2): 310-317, 2002

157. Weir C: Rate of shrinkage of tendon collagen-heat, free energy of activation of the shrinkage of untreated tendon: Effect of acid salt, pickle and tannage on activation of tendon collagen. J Am Leather Chem Assoc 44: 108-138, 1949
158. Wieneke H, Lobenhoffer P: Grundlagen radiochirurgischer Systeme und ihre Anwendungen in der Arthroskopie. Unfallchirurg 106: 1, 2003
159. Wirth CJ, Peters G: The dilemma with multiply reoperated knee instabilities. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 6:148-159, 1998
160. Wolf RS, Lemak LJ: Thermal capsulorrhaphy in the treatment of multidirectional instability of the shoulder. J South Orthop Assoc, 11: 102-109, 2000
161. Wong KL, Williams GR: Complications of thermal capsulorrhaphy of the shoulder. J Bone Joint Surg Am 83-A Suppl 2 Pt 2: 151-155, 2001
162. Yoshikawa T, Tohyama H, Katsura T: Local administration of VEGF enhances mechanical deterioration of the tendon grafted to reconstruct the ACL, although it accelerates angiogenesis and cellularity and infiltration: a sheep model study. In Trans Orthop Res: abstract#0320, Washington, DC, 2005
163. Zantop T, Petersen W: Die Nicht-Kontakt-Verletzung des vorderen Kreuzbandes: Epidemiologie, Unfallmechanismen und Prävention. Orthopädische Praxis 40 (1): 16-23, 2004

7. ANHANG

7.1 Spezielles Operationsinstrumentarium

7.1.1 Elektrochirurgisches Instrumentarium

Steuereinheit (Autocon 200²⁰): An dieser wurde die Stromstärke für den Koagulationsstrom eingestellt.

Handstück: Dies wurde über ein Kabel mit dem Steuergerät verbunden. Es wies zwei Tasten auf, mit denen der Koagulations- bzw. Schneidestrom freigegeben wurde.

Ansatz (Kugelansatz (Kugeldurchmesser 2,5 mm)): Der Ansatz wurde in das Handstück eingesteckt.

7.1.2 Operationsinstrumente

Säge (0,5 cm Sägeblatt), Flachmeißel (0,5 cm), Bohrer (0,2 cm), Bohrer (0,27 cm) Bohrkanal-Längenmesser, Schraubendreher, Hammer, Luere, Overhold

Haltefäden: Vicryl® CT 1/0 Faden²¹, Faszie: Vicryl® SH 1/0²², Subkutan: Vicryl® SH 3/0²³, Haut: Ethilon® II 3/0²⁴

7.2 Histologische Untersuchungsmaterialien

7.2.1 Materialien zur histologischen Aufarbeitung

Dehydrierung zur Einbettung und nach der Färbung/ Ansteigende Alkoholreihe

Da das Gewebe erst nach Entfernung seines Wassergehaltes eingebettet wurde, durchläuft es zuvor eine Serie wässriger Lösungen, die das Dehydrierungsmittel Alkohol in stufenweise ansteigender Konzentration enthielten.

Nach der Färbung wurde der Schnitt erneut entwässert, in Xylol gewaschen und eingedeckt (Tab. 7).

²⁰ (Modell 20522520) Karl Storz – Endoskopie, Karl Storz GmbH, Tuttlingen, Germany

²¹ Ethicon, Norderstedt, Deutschland

²² Ethicon, Norderstedt, Deutschland

²³ Ethicon, Norderstedt, Deutschland

²⁴ Ethicon, Norderstedt, Deutschland

Anzahl der Durchgänge	Dauer der Einwirkung	Lösung
1x	kurz durchspülen	Aqua dest.
1x	2 min	70% Alkohol
1x	2 min	80% Alkohol
1x	2 min	96% Alkohol
2x	2 min	100% Alkohol
2x	10 min	Xylol

Tabelle 7: Anleitung zur Verwendung der ansteigenden Alkoholreihe.

Rehydrierung zur Färbung/ Absteigende Alkoholreihe

Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden zur Färbung zunächst in Xylol entparaffiniert und durchliefen zur Wasseraufnahme eine Alkoholreihe sinkender Konzentration (Tab. 8).

Anzahl der Durchgänge	Dauer der Einwirkung	Lösung
2x	10 min	Xylol
2x	2 min	100% Alkohol
1x	2 min	96% Alkohol
1x	2 min	80% Alkohol
1x	2 min	70% Alkohol
1x	kurz durchspülen	Aqua dest.

Tabelle 8: Anleitung zur Verwendung der absteigenden Alkoholreihe.

Pufferlösung für die Immunhistologie

Substanzen und Mischungsverhältnisse der Grundsubstanzen für 1 Liter TBS-Spülpuffer, pH= 8,2:

Trisma HCLT 3253 – Sigma²⁵: 6,60g

Trisma t 1503 Base – Sigma²⁶: 0,90g

NaCl²⁷: 8,78g

²⁵ Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508 St. Louis, USA

²⁶ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

²⁷ Natriumchlorid p.-a., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Nach dem Vermischen der Grundsubstanzen wurde mit destilliertem Wasser die jeweilige Gesamtmenge aufgefüllt und der pH-Wert auf 8,2 titriert.

7.2.2 Übersichtsfärbungen

H&E - Färbung

1. Objektträger in Aqua dest..
2. Kernfärbung durch 5-6-maliges Eintauchen in saurem Hämalaun nach Mayer.
3. Spülung des Objektträgers in Aqua dest..
4. Differenzierung in 1% HCL-Alkohol.
5. Bläuen in reichlich warmen Wasser (Färbeüberprüfung durch Zwischenmikroskopie; gegebenenfalls erneute Kernfärbung).
6. 3- 4-maliges Eintauchen in Eosin²⁸.
7. Klärung des entwässerte Schnitt im organischen Lösungsmittel Xylol und Eindeckeln mit Deckglas.

Trichromfärbung nach Masson-Goldner (Eisenhämatoxilin / Säurefuchsin / Orange G / Lichtgrün)

1. Objektträger in Aqua dest..
2. Kernfärbung mit Eisenhämatoxilin²⁹ nach Weigert (5 min).
3. Bläuen unter Leitungswasser (15 min).
4. Färbung in Säurefuchsin-Ponceau³⁰ (5 min) (Spülung kurz in 1% Essigsäure)
5. Färbung in Phosphormolybdänsäure Orange G bis das Bindegewebe vollständig differenziert (15 - 30 min).
6. Spülung in 1% Essigsäure.
7. Färbung in Lichtgrün (5 min).
8. Spülung kurz in 1% Essigsäure.
9. Klärung des entwässerte Schnitt im organischen Lösungsmittel Xylol und Eindeckeln mit Deckglas.

²⁸ Eosin Y Solution Aqueous, Sigma Diagnostics St.Louis Missouri 63178 USA

²⁹ Eisen-Haematoxylin A (2E032) + Eisen-Haematoxylin B (2E052), Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH+Co 73257 Köngen/N

³⁰ Ponchaeu Fuchsin Masson (2C149), Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH+Co 73257 Köngen/N)Ponceau-de Xylidine-Säurefuchsin-Azophloxin

7.2.3 Immunhistologie

Faktor VIII/ von Willebrandt Faktor Färbung (Biotin-Avidin Technik)

1. Entparaffinierung und Rehydrierung eines 1µm dicker, eingebetteten Querschnitts (siehe Anhang 7.2.1).
2. Demaskierung der antigenen Epitope, 10-minütige Vorbehandlung mit 0,1% Proteinase-Lösung bei 37°C.
3. Spülung des Objektträgers in TBS-Pufferlösung (5 min) (siehe Anhang 7.2.1).
4. Entfernung des Objektträgers aus dem Bad und vorsichtiges Wegtupfen der überschüssigen Flüssigkeit um den Schnitt herum.
5. Flaches Ablegen des Objektträgers und 4-6 Tropfen Normalserum, zur Unterdrückung einer unspezifischen Hintergrundfärbung, applizieren, Inkubationszeit (20 min).
6. Abklopfen des Serums und Überschuß wegwischen.
7. Auftragen von Primärantikörper (Faktor VIII/ v. Willebrandt Antikörper) in einer Verdünnung 1:200 bei 4°C.
8. 12-stündige Inkubation, danach vorsichtiges 2-maliges Spülen in TBS-Pufferbad.
9. Flaches Hinlegen des Objektträgers und Zugabe von biotinkonjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur (30 min).
10. Spülung in TBS-Pufferbad
11. Entnehmen des Objektträgers aus dem Bad und Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit um den Schnitt herum.
12. Inkubation mit alkalischer Phosphatase/Meerrettichperoxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (50 min).
13. Zufügen der Substratlösung (Wasserstoffperoxid), Entstehung des gefärbten Endproduktes.
14. Gegenfärben der Zellkerne mit Methylengrün
15. Dehydratation der Schnitte und eindecken in Xylol-löslichem Einschlußmedium.

7.3 Arzneimittel

Narkose

Thiopental (Trapanal®³¹) zur Einleitung der Narkose

Distickstoffmonoxid (Lachgas) als Inhalationsnarkotikum

Isofluran (Forene®³²) als halogeniertes Inhalationsnarkotikum

Analgesie

Novaminsulfon (Novaminsulfon-ratiopharm® 2,5g/5ml Injektionslösung³³)

Tramadol (Tramal® 50mg/100mg Injektionslösung³⁴)

7.4 Röntgenverlaufskontrolle

Die Kniegelenke beider Hinterläufe wurden mittels eines mobilen Röntgengerätes³⁵ und mit speziellen Röntgenfilmen³⁶ im anterior-posterioren (Einstellung: 60kV/3,2mAs) und mediolateralen (Einstellung: 70kV/5,0mAs) Strahlengang geröntgt. Die Anfertigung des ersten Röntgenbildes erfolgte präoperativ. Diese seitliche Röntgenaufnahme diente der Beurteilung der gelenksnahen femoralen Wachstumsfuge des linken Hinterlaufes. Nur bei einem radiologisch gesicherten Verschluss der Wachstumsfuge wurde der linke Hinterlauf des Tieres ein weiteres Mal im a.p. Strahlengang aufgenommen. Im weiteren Verlauf wurden die operierten Tiere am 1. postoperativen Tag sowie in der 6. postoperativen Woche geröntgt. Beurteilt wurden zu diesem Zeitpunkt das postoperative chirurgische Ergebnis hinsichtlich des korrekten Sitzes des Knochenblocks und der fixierenden Knochenschraube.

³¹ Byk Gulden Lomberg Chem. Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

³² Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

³³ ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

³⁴ Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland

³⁵ ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

³⁶

7.5 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kreuzbänder im Kniegelenk; **A**: rechtes Kniegelenk, Kreuzbänder von vorn; **B**: Ansicht der Kreuzbänder von oben; 1: das vordere Kreuzband (Lig. cruciatum anterius); 2: das hintere Kreuzband (Lig. cruciatum posterius); 3: der mediale Meniskus; 4: Lig. collaterale tibiale mit den Ansatzstellen; 5: Crus anterius; 6: Crus posterius; 7: der laterale Meniskus; 8: Lig. collaterale fibulare; 9: Lig. meniscefemorale anterius; 10: Lig. meniscefemorale posterius; 11: Lig. transversum genus [74]. 11
- Abbildung 2: Die Strukturhierarchie des Kollagens von der Aminosäuresequenz bis zur Kollagenfibrille [65]. 14
- Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Kollagenfaserbündels [73]. 15
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des VKB [74]. 18
- Abbildung 5: Molekularer Mechanismus der Kollagenverkürzung: Die intramolekularen Verbindungen innerhalb des Tropokollagenmoleküls brechen auf, hingegen bleiben die intermolekularen zwischen den einzelnen Tropokollagenmolekülen erhalten [9]. 23
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kollagenverkürzung [148]. 24
- Abbildung 7: Versuchstiere in der tierexperimentellen Abteilung der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité, Campus Virchow. 29
- Abbildung 8: Darstellung der einzelnen Operationsschritte in vivo; **A**: Aussägen des Knochenblocks mit ansetzendem VKB; **B**: Knöcherner VKB Ansatz mit untergelegtem Knochenblättchen; **C**: Fixierung der beiden Knochenstücke mittels Kortikalisschraube. 32
- Abbildung 9: **A**: Fotodokumentation des in situ entnommenen VKB mit Beschriftung zur Erläuterung der Lage im Kniegelenk; **B**:

- Längsteilung des VKB im mittleren Drittel, medial = Längsschnitte, lateral = Querschnitte. 35
- Abbildung 10: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplexes [14]. 38
- Abbildung 11: Längsteilung des VKB im mittleren Drittel; der **mediale VKB-Anteil** wurde für die Längsschnitte verwendet, diese dienten der Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes sowie zur Bestimmung der mittleren Zelldichte pro mm² und des Crimps; der **laterale VKB-Anteil** wurde für die Querschnitte zur Bestimmung der Gefäßdichte mittels F VIII herangezogen, die Unterteilung erfolgte in drei Regionen: subsynovial, intermediär und zentral. 39
- Abbildung 12: Makroskopische Kniegelenkaufnahme mit direkter Sicht auf das unbehandelte native VKB. 42
- Abbildung 13: 24 Wochen postoperativ makroskopische Kniegelenkaufnahmen nach Elongation des VKB; Darstellung des VKB in situ; **A**: Gelenk mit deutlichem Reizerguss, hypertrophierter und vaskularisierter Synovialis; im Bereich der tibialen Ansatzstelle zeigte sich der ligamentäre synoviale Überzug mit deutlichen tibialen Gefäßinjektionen; **B**: VKB wurde von einem hypertrophierten Synovialschlauch eingehüllt. 43
- Abbildung 14: 24 Wochen nach HF-Behandlung des VKB zeigte sich ein makroskopisch unauffälliges VKB mit hypertrophierter Synovialis. 43
- Abbildung 15: **A**: Natives VKB zum Zeitpunkt Null nach HF-Applikation in situ; **B**: Dasselbe VKB wie in A, vollständig entnommen; in A und B ist der Applikationsbereich der Hochfrequenzenergie deutlich zu erkennen (roter Kreis). 44
- Abbildung 16: VKB nativ mit spindelförmigen und ovoiden Fibroblastenzellkernen (MG, Längsschnitte, 20fache Vergrößerung). 45

- Abbildung 17: **A+B**: Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Zellverteilung im selben VKB; **A**: Region mit hyperzellulären Bereichen (MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung); **B**: zellärmerer Abschnitt im VKB (MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung); **C**: Peripher sind die Bänder durchzogen von hyperzellulärem Granulationsgewebe (MG, Längsschnitte, 20fache Vergrößerung); **D**: 3-4lagiger synoviale Überzug (MG, Längsschnitt, 10fache Vergrößerung). 46
- Abbildung 18: **A+B**: Hoher Grad der Zellorganisation mit Ausrichtung der Zellen entlang der Kollagenfibrillen (MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung); **C+D**: An der anterioren VKB-Seite findet sich eine deutliche Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zum elongierten VKB (C: MG, Längsschnitt, 10fache Vergrößerung); (D: MG, Längsschnitt, 20fache Vergrößerung). 47
- Abbildung 19: **A**: Deutliche Trennung zwischen HF behandeltem Bereich und unbehandelten VKB-Abschnitten (polarisiertes Licht 10fache Vergrößerung); **B**: 20fache Vergrößerung von mit HF-Energie behandelten VKB-Bereich (polarisiertes Licht); **C**: deutlich zu erkennen die welligen und unregelmäßigen Kernkonturen der Fibroblasten im Sinne einer Kernpyknose (MG, Längsschnitte, 20fache Vergrößerung). Nach Wärmeapplikation färben sich die kollagenen Fasern in der MG-Färbung nicht mehr grün, sondern rot - violett an. 49
- Abbildung 20: **A**: Kontrollgruppe: natives vorderes Kreuzband (VKB nativ) (MG; 20fache Vergrößerung); **B**: 24 Wochen: Gruppe A (VKB elongiert) (MG; 20fache Vergrößerung) **C**: 24 Wochen: Gruppe B (VKB elongiert+HF) (MG; 20fache Vergrößerung); **D**: Natives vorderes Kreuzband (VKB nativ+HF) nach Applikation von HF-Energie (MG; 10fache Vergrößerung). 51
- Abbildung 21: **A**: natives vorderes Kreuzband (FVIII, Querschnitt, 10fache Vergrößerung); **B**: Gruppe A (VKB elongiert), (FVIII, Querschnitt,

20fache Vergrößerung); **C**: Gruppe B (VKB elongiert+HF), (FVIII, Querschnitt, 10fache Vergrößerung). 54

7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der allgemeinen Gewebereaktion bei unterschiedlich applizierten Temperaturen.	25
Tabelle 2: Gruppeneinteilung.	30
Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse im Schubladentest von Kontrollgruppe, Gruppe A und B sowie VKB nativ+HF post mortem.	42
Tabelle 4: Übersicht über Gesamtzellzahl/mm ² im VKB nativ, VKB elongiert, VKB elongiert+HF.	47
Tabelle 5: Übersicht über die Kollagenwellenlänge/ μm von VKB nativ und Studiengruppe A und B.	51
Tabelle 6: Übersicht über die Gefäßanschnitte/ mm ² in den Regionen subsynovial, intermediär und zentral der drei Studiengruppen A, B und VKB nativ.	54
Tabelle 7: Anleitung zur Verwendung der ansteigenden Alkoholreihe.	87
Tabelle 8: Anleitung zur Verwendung der absteigenden Alkoholreihe.	87

7.7 Graphikverzeichnis

Grafik 1: Übersicht über Gesamtzellzahl/ mm ² im VKB nativ sowie den Studiengruppen A und B nach 24 Wochen Standzeit.	48
Grafik 2: Übersicht über Kollagenwellenlänge/ μm im VKB nativ sowie in den beiden Studiengruppen A und B nach 24 Wochen Standzeit.	52
Grafik 3: Grafischer Überblick über die Gefäßanschnitte in den subsynovialen, intermediären und zentralen VKB-Abschnitten der Studiengruppen A, B und VKB nativ.	55

7.8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM	anteromedial
AO	Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese
a.p.	anterior-posterior
aqua dest.	Aqua destillata
EC	Elektrochirurgie
et al.	und andere (lateinisch: et alii)
F VIII	Faktor VIII
H&E	Hämatoxilin-Eosin
HF	Hochfrequenz
HKB	Hinteres Kreuzband
Lig.	Ligamentum
M.	Musculus
MG	Masson Goldner
n. s.	nicht signifikant
PL	posterolateral
SD	Standardabweichung (engl. Standard Deviation)
Tab.	Tabelle
n. Chr.	nach Christo, nach Christus
v. Chr.	vor Christo, vor Christus
VKB	Vorderes Kreuzband

7.9 Eidesstattlicher Erklärung

„Ich, Heike Unterhauser-Chwastek, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Thermische Kollagenverkürzung mittels monopolarer Hochfrequenzenergie zur Behandlung der vorderen Kreuzbandelongation – Histomorphometrische Untersuchung am Schaf“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 12.01.2012

CURRICULUM VITAE

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

VERÖFFENTLICHUNGEN

Scheffler SU, Schönfelder V, Hunt P, Chwastek H, Südkamp N, Weiler A:
Mechanical and histological analysis of the chronically relaxed ACL after thermal radiofrequency shrinkage in a sheep model. Arthroscopy 19: 47-48, 2003

Scheffler S, Chwastek H, Schönfelder V, Unterhauser F, Hunt P, Weiler A:
The impact of radiofrequency shrinkage on the mechanical and histologic properties of the elongated anterior cruciate ligament in a sheep model.
Arthroscopy, Aug; 21(8):923-33, 2005

Wissenschaftliche Preise:

First Place of John Joyce Award of the International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine for the best arthroscopy paper, received during the 4th Biennial ISAKOS Congress, Auckland New Zealand, March 2003

Scheffler S, Schönfelder V, Hunt P, Chwastek H, Südkamp N, Weiler A:
„Mechanical and Histological Analysis of the Chronically Relaxed ACL After Thermal Radio-Frequency Shrinkage in a Sheep Model“.

Gewinner der Preisträgersitzung: „Experimentelle Unfallchirurgie“

66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 2002 Berlin

Scheffler S, Schönfelder V, Hunt P, Chwastek H, Südkamp N, Weiler A:
Untersuchung des Langzeiteffektes von thermischer Schrumpfung (RF shrinkage) des chronisch laxierten vorderen Kreuzbandes am Schafsmodell.