

Aus dem Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin

der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Heike Walles

**Biomechanische und zellbiologische Untersuchung von augmentierten
Biomaterial-basierten Kreuzbandkonstrukten**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Klug

aus Höchberg

Würzburg, April 2016

Referent/Referentin: Prof. Dr. Heike Walles

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. med. Maximilian Rudert

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2016

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie gewidmet

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademischen Grade erworben noch versucht, solche zu erwerben.

Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ACL | Anterior Cruciate Ligament |
| AM | Anteromedial |
| B(P)TB | Bone-(Patella-)Tendon-Bone |
| bFGF | basic Fibroblast Growth Factor |
| BMP | Bone Morphogenic Protein |
| BMSCs | Bone Marrow Stromal Cells |
| cm | Zentimeter |
| CPRP | Collagen-Platelet-Rich-Plasma |
| DHT | Dihydrothermal |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTE | Desaminotyrosyltyrosinethyl |
| ECM | Extracellularmatrix |
| EDC | Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid |
| EDC/NHS | N-ethyl-N'-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide/N-hydroxy-succinimide |
| EGF | Epidermal Growth Faktor |
| GF | Growth Factor |
| HKB | Hinteres Kreuzband |
| HMDI | Hexamethylendiisocyanat |
| IGF | Insulin-like Growth Factor |
| IGF1 | Insulin-like Growth Factor 1 |
| KF | Kollagenfaser |
| LAD | Ligament Augmentation Device |
| LARS | Ligament Augmentation and Reconstruction System |
| LCA | Ligamentum cruciatum anterius |
| m | Meter |
| M. | Musculus |
| MES | N-Morpholinoethansulfonsäure |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |

| | |
|--------------------|---|
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| MPa | Megapascal |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MSCs | Mesenchymal Stem Cells |
| N | Newton |
| N/ mm ² | Newton pro Quadratmillimeter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NDGA | Nordihydroguaiaretic acid |
| NHS | N-Hydroxy-Succinimid |
| OA | Osteoarthritis |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCL | Polycaprolacton |
| PDGF | Plated Derived Growth Factor |
| PGA | Polyglycolic Acid |
| PL | posterolateral |
| PLA | Polylactic Acid |
| PLAGA | Polylactic-Acid-Co-Glycolic-Acid |
| PLCG | Polylactic-co-glycolide |
| PLLA | Poly-L-Lactic-Acid |
| PRP | Plateled-rich Plasma |
| RGD | Einbuchstabencode der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp |
| rpm | Rotation pro min |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TGF- α | Transforming Growth Factor α |
| TGF- β | Transforming Growth Factor β |
| TIMP | Tissue Inhibitor of Metalloproteinase |
| UTS | Ultimate Tensile Strength |
| UV | ultraviolett |
| VEGF | Vascular Epidermal Growth Factor |
| VKB | Vorderes Kreuzband |
| α -GAL | Alpha-Galaktose |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Epidemiologie der ACL-Ruptur..... | 1 |
| 1.2 Anatomie und Funktion des Kniegelenks | 3 |
| 1.2.1 Ossärer Apparat | 3 |
| 1.2.2 Ligamentärer Apparat..... | 5 |
| 1.2.3 Muskulärer Apparat | 9 |
| 1.3 Verletzungen der Kreuzbänder und ihre rekonstruktive Versorgung | 10 |
| 1.3.1 Pathomechanismen und Folgen einer ACL-Ruptur | 10 |
| 1.3.2 Physiologie der Heilung des ACL | 11 |
| 1.3.3 Operative Rekonstruktionsverfahren | 12 |
| 1.3.3.1 Autogener Ersatz..... | 12 |
| 1.3.3.1.1 Rekonstruktion mittels Lig. patellae | 12 |
| 1.3.3.1.2 Rekonstruktion mittels Hamstrings-Sehnenplastik | 13 |
| 1.3.3.1.3 Ersatz mittels Quadrizepssehnenplantat | 13 |
| 1.3.3.2 Allogener und xenogener Ersatz | 14 |
| 1.4 Fragestellung..... | 16 |
| 2 Material und Methoden | 17 |
| 2.1 Isolation und Aufreinigung der Kollagenfasern | 17 |
| 2.2 Qualitätskontrolle der Fasern | 17 |
| 2.3 Herstellung der Konstrukte | 18 |
| 2.4 Crosslinking | 20 |
| 2.4.1 Crosslinking mittels Glukose | 20 |
| 2.4.2 Crosslinking mittels EDC und NHS im MES-Puffer | 20 |
| 2.4.3 Crosslinking mittels 10 % HDMI | 21 |
| 2.4.4 Crosslinking mittels Genipin | 21 |
| 2.5 Gammasterilisation von Fasern und Konstrukten..... | 22 |
| 2.6 Biomechanische Messungen..... | 22 |
| 2.7 Messungen zur Biokompatibilität..... | 24 |
| 2.7.1 Proteinbestimmung mit dem DC Protein Assay..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7.2 Proliferationsmessung mittels CellTiterGlo® | 26 |
| 2.8 Kollagenaseexpositionsversuch | 27 |
| 2.9 Der Tierversuch..... | 28 |
| 2.9.1 OP-Technik des Tierversuchs | 28 |
| 2.9.2 Histologische Aufarbeitung..... | 30 |
| 2.9.2.1 Fixierung, Einbettung und Färben der Proben..... | 30 |
| 2.9.2.2 Deskriptive Aufarbeitung in der Durchlichtmikroskopie..... | 32 |
| 2.10 Lösungen und Medikamente | 32 |
| 2.11 Verwendete Geräte | 34 |
| 3 Ergebnisse | 38 |
| 3.1 Biomechanische Ergebnisse der Einzel-Kollagenfaser | 38 |
| 3.2 Biomechanik der Minikonstrukte..... | 40 |
| 3.3 Elastizitätsmodul und Steifigkeit | 42 |
| 3.4. Vergleich der Crosslinker Glukose, 0,5 % Genipin, 10 % HMDI..... | 43 |
| 3.5 Einfluss der Genipinkonzentration auf die Biomechanik..... | 44 |
| 3.6 Ergebnisse der Biokompatibilitätsmessungen | 46 |
| 3.6.1 Cell Titer Glo | 46 |
| 3.6.2 DC Protein Assay | 50 |
| 3.6.3 Zellzählung und Zellmorphologie..... | 51 |
| 3.7 Kollagenaseexpositionsversuch | 52 |
| 3.8 Einfluss des Knotentyps auf das Kollagenkonstrukt..... | 54 |
| 3.9 Ergebnisse des Tierversuchs | 56 |
| 3.9.1. Biomechanik und Makroskopie..... | 56 |
| 3.9.2. Histologische Beurteilung | 59 |
| 4 Diskussion der Ergebnisse..... | 63 |
| 4.1 Wahl eines geeigneten Crosslinkers | 64 |
| 4.2 Einfluss von Abbauenzymen auf die Ergebnisse..... | 70 |
| 4.3 Das Biokompatibilitätsmessverfahren | 72 |
| 4.4 Der Tierversuch im Vergleich zu anderen Methoden | 75 |
| 4.4.1 Der Tierversuch..... | 75 |
| 4.4.2 Abgrenzung zu anderen Produkten/Materialien | 79 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.2.1 Autogene und allogene Transplantate | 79 |
| 4.4.2.2 Xenogene Materialien..... | 81 |
| 4.4.2.2.1 Synthetische Materialien | 82 |
| 4.4.2.2.2 Tissue Engineering..... | 86 |
| 4.4.2.2.3 Xenografts | 91 |
| 4.4.3 Ausblick | 92 |
| 5 Zusammenfassung | 94 |
| 6 Literaturverzeichnis | 96 |
| 7 Anhang | 119 |
| 7.1 Verwendete Entwässerungsprotokolle | 119 |
| 7.2 Verwendete Färbeprotokolle | 120 |

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der ACL-Ruptur

Das Kniegelenk ist aufgrund seiner exponierten Lage das am häufigsten verletzte Gelenk des menschlichen Körpers. Wie Abb. 1 und Abb. 2 zeigen, spielen Bandverletzungen dabei mit insgesamt 40 % aller Knieverletzungen die größte Rolle [1]. Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes stellt innerhalb dieser Gruppe mit etwa 46 % den größten Anteil dar. Erst danach folgt der Riss des medialen Kollateralbandes mit 29 %. Verletzungen des hinteren Kreuzbandes spielen mit 4 % nur eine eher untergeordnete Rolle (s. Abb. 1 und 2).

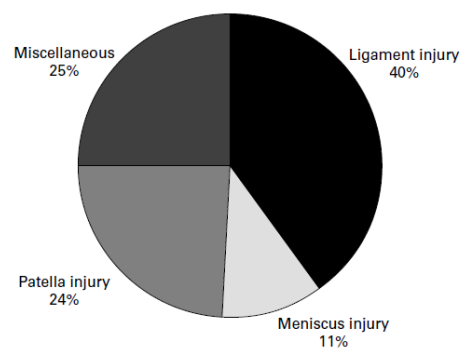


Abb. 1: Verletzungsmuster des Kniegelenks (aus: Bollen S. Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage. *Br J Sports Med* 34. 2000, S. 227-228).

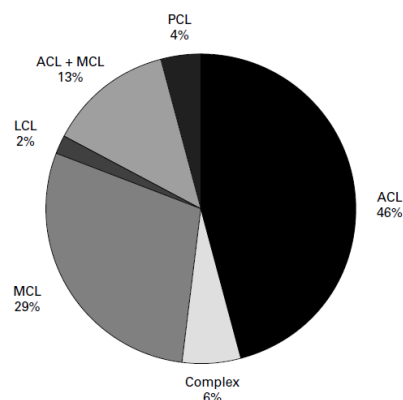


Abb. 2: Bandverletzungen des Kniegelenks (aus: Bollen S. Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage. *Br J Sports Med* 34. 2000, S. 227-228).

Je nach Statistik reißt das vordere Kreuzband also zwischen 10 und 14 Mal so häufig wie sein hinteres Pendant. Aufgrund verbesserter Diagnostik hat die Zahl der erkannten vorderen Kreuzbandläsionen in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen, wobei man aktuell von ca. 80.000 Verletzungen pro Jahr in Deutschland ausgehen muss. Das statistische Bundesamt spricht sogar von bis zu 100.000 Neuverletzungen pro Jahr [2], wobei sich die jährlichen Kosten in deutschen Krankenhäusern mit der Diagnose M23 „Binnenschädigung des Kniegelenks“ 2008 auf fast 400 Millionen Euro beliefen [3]. In den USA ist die vordere Kreuzbandruptur mit 100.000 bis 200.000 Diagnosen sogar die häufigste Bandverletzung überhaupt [4]. Die Prävalenz liegt bei etwa 0,55 bis 1 vorderen Kreuzbandruptur pro 1000 Bundesbürgern [5, 6].

Hauptursache für Verletzungen des vorderen Kreuzbandes stellen nach wie vor Unfälle im sportlichen Bereich dar. Dabei ist in Deutschland vor allem in Kontaktsportarten wie Fußball, Handball, Basketball das Verletzungsrisiko sehr hoch [7] (s. Abb. 3 und 4). In den alpinen Regionen spielen vor allem Unfälle beim Skifahren oder Snowboarden eine wesentliche Rolle für derartige Verletzungsmuster.

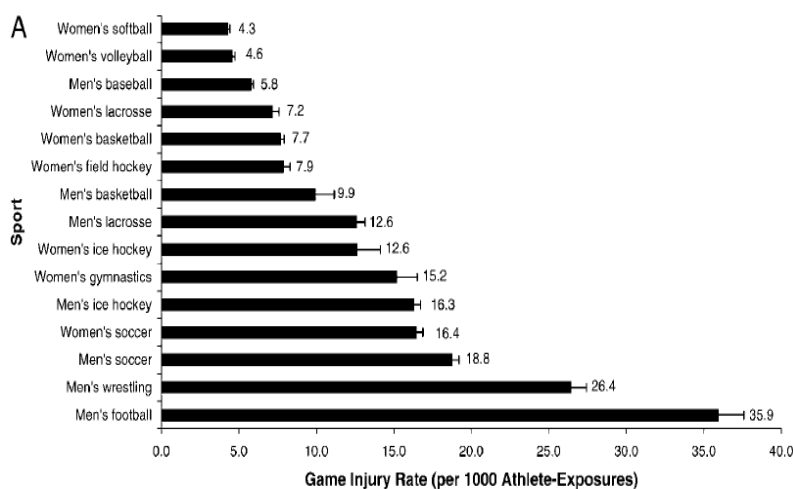


Abb. 3: Verletzungsrate während des Spiels nach Sportart zwischen 1988 und 2004, NCAA (aus: Hootman JM et al. Epidemiology of Collegiate Injuries for 15 Sports: Summary and Recommendations for Injury Prevention Initiatives, *Journal of Athletic Training* 2007;42(2):311–319).

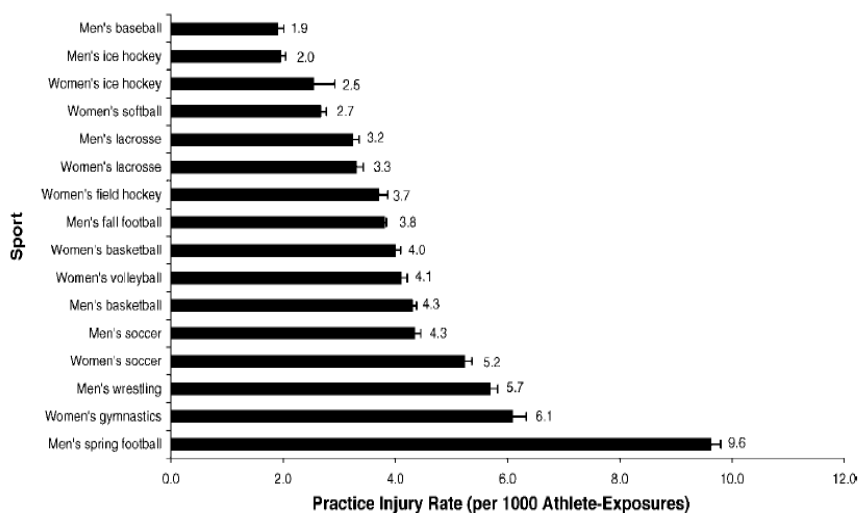


Abb. 4: Verletzungsrate während des Trainings nach Sportart zwischen 1988 und 2004, NCAA (aus: Hootman JM et al. Epidemiology of Collegiate Injuries for 15 Sports: Summary and Recommendations for Injury Prevention Initiatives, *Journal of Athletic Training* 2007; 42(2):311–319).

Mechanisch entstehen nach einer Studie des Department of Orthopaedics and Traumatology, Wales, bis zu 70 % der vorderen Kreuzbandläsionen ohne gegnerische Einwirkung, vor allem bei Landungen nach einem Sprung, Abbremsbewegungen oder Richtungsänderungen [8].

Der Rupturmechanismus ist in den meisten Fällen eine unerwartete Rotation des Femurs gegen einen fixierten Unterschenkel, wodurch der mechanische Stress auf das vordere Kreuzband derart erhöht wird, dass es unwillkürlich nachgibt und reißt. Frauen sind dabei mit einem relativen Risiko von 3,96 überdurchschnittlich häufiger betroffen als Männer [4].

1.2 Anatomie und Funktion des Kniegelenks

1.2.1 Ossärer Apparat

Das Kniegelenk gilt als bikondyläres Gelenk. In ihm artikulieren drei Gelenkpartner, das Femur mit seinen beiden Condylae femoris, mit den entsprechenden Tibiakondylen, sowie das Os patellae mit der Femurvorderseite im femoropatellaren Anteil. Aufgrund dieser anatomischen Besonderheit wird das Knie deshalb in zwei über eine gemeinsame Gelenkkapsel verbundene Einzelgelenke gegliedert, die sog. Articulatio femorotibialis und die Articulatio femoropatellaris. Während ersteres die Gelenkverbindung zwischen den beiden Femurkondylen und

dem entsprechenden Pendant der Tibia bildet, beschreibt das Art. femoropatellaris die gelenkige Verbindung zwischen einem in die Quadrizepssehne eingelagerten Sesambeins - der Patella - mit den Vorderflächen der Oberschenkelkondylen. Funktionell bildet das Kniegelenk somit ein Roll-/Gleitgelenk, in dem Tibia und Femur um eine wandernde transversale Achse Flexions- und Rotationsbewegungen durchführen können (s. Abb. 5).

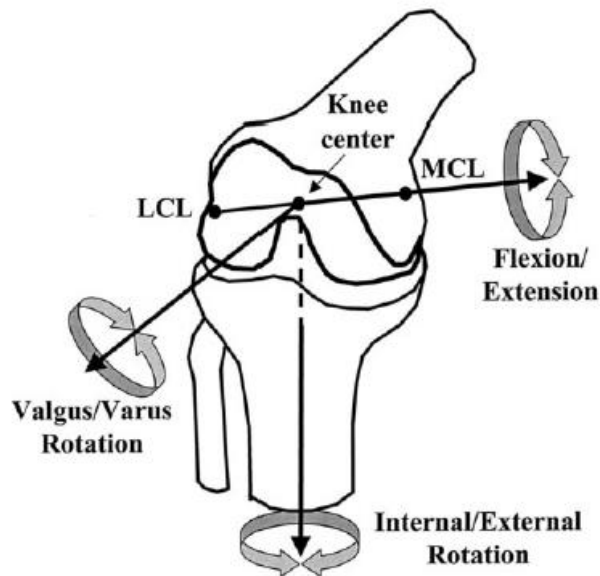


Abb. 5: Bewegungsachsen des Kniegelenks (aus: Gill JG, DeFrate LE et al. The Biomechanical Effect of Posterior Cruciate Ligament Reconstruction on Knee Joint Function: Kinematic Response to Simulated Muscle Loads. *Am J Sports Med* 31. 2003, S. 530-536).

Als wichtigste Unterstützung dienen hierbei die beiden Menisken. Diese annähernd C-förmig, aus Faserknorpel bestehenden Strukturen, liegen jeweils am äußeren Randbereich der Facies articularis superior medialis und lateralis an und stellen somit eine verformbare Ergänzung der tibialen Gelenkfläche dar. Gleichzeitig vergrößern sie damit in allen Kniegelenksstellungen das Berührungsfeld der Gelenkpartner des femorotibialen Gelenkanteils um bis zu 75 %. Gesichert werden sie über Bandstrukturen im Bereich der Interkondylarregion (Lig. meniscotib. ant/post, Lig. transversum genus, Lig. meniscofem.), sowie über Verwachsungen mit der Gelenkkapsel. Der mediale Meniskus haftet zudem fest am medialen Kollateralband an [9, 10].

1.2.2 Ligamentärer Apparat

Neben den Menisken spielt für die Beweglichkeit und Stabilität des Kniegelenks vor allem der Bandapparat eine bedeutende Rolle. Auf Grund ihrer Lage zum Gelenk wird hierbei zwischen Seitenbändern und Binnenbändern differenziert. Letztere tragen wegen ihrer Position untereinander auch den Namen Kreuzbänder.

Während die beiden Seitenbänder, Lig. collaterale mediale (LCM) und laterale (LCL) die Kniegelenkscapsel zwiebelschalenartig umgeben und peripher stabilisieren, präsentieren sich die beiden Kreuzbänder als zentrale Hauptstabilisatoren innerhalb des Kniegelenks. Wichtigste Funktion der beiden Seitenbänder, die jeweils vom entsprechenden Epicondylus des Femurs zur Medialseite der Tibia bzw. zum Fibulaköpfchen ziehen, ist das Verhindern der Aufklappbarkeit des Kniegelenks, sowie die Stabilisation gegenüber Valgus- bzw. Varuskräften [9, 10].

Die beiden Ligg. cruciata genus bilden die Grundsäulen der Kniegelenksstabilität. Sie liegen intrakapsulär, aber extrasynovial, und werden in ein vorderes (VKB; synonym LCA: Lig. cruciatum anterius oder ACL: Anterior cruciate ligament) und ein hinteres Kreuzband (HKB; synonym LCP: Lig. cruciatum posterius oder PCL: Posterior cruciate ligament) gegliedert.

Das ACL hat seinen Ursprung an der hinteren Wand der lateralen Fossa intercondylaris und verläuft schräg nach ventral zu seinem Ansatz im medialen Teil der Area intercondylaris anterior. Anatomisch werden ein anteromediales (AM-Bündel) und ein posterolaterales Bündel (PL-Bündel) unterschieden, die auch funktionell unterschiedliche Aufgaben übernehmen [11]. Die Querschnittsfläche eines humanen ACL beträgt ca. 36 mm² bei Frauen und ca. 47 mm² bei Männern [12].

Das hintere Kreuzband ist an der inneren Fläche des medialen Femurkondylus befestigt und inseriert schräg hinten in der Area intercondylaris posterior. Durch diesen besonderen Verlauf überkreuzen sich beide Bänder. Dies führt dazu, dass in jeder Stellung des Kniegelenks immer ein - wenn auch kleiner - Anteil ihrer Fasern angespannt ist.

Funktionell sichern die Kreuzbänder das Kniegelenk somit

- in der Beugung, wobei hier besonders das ACL das Herausgleiten der Kondylen nach hinten verhindert
- in der Streckung, hier der vordere Anteil des ACL, auch anteromediales Faserbündel genannt und der hintere Teil des HKB
- gegen Rotation, wobei hier insbesondere das posterolaterale Bündel des ACL die Hauptstabilisation übernimmt [13, 14].

Histologisch bestehen die Kreuzbänder aus straffem Bindegewebe, dessen Hauptbestandteil Kollagen Typ I ist, das von einer Schicht aus Synoviozyten und Kollagen Typ III, sowie Subsynovialgewebe umgeben ist. Insgesamt besteht es dabei zu ca. 88 % aus Typ-I-, sowie ca. 12 % aus Typ-III-Kollagen (s. Abb. 6) [15].

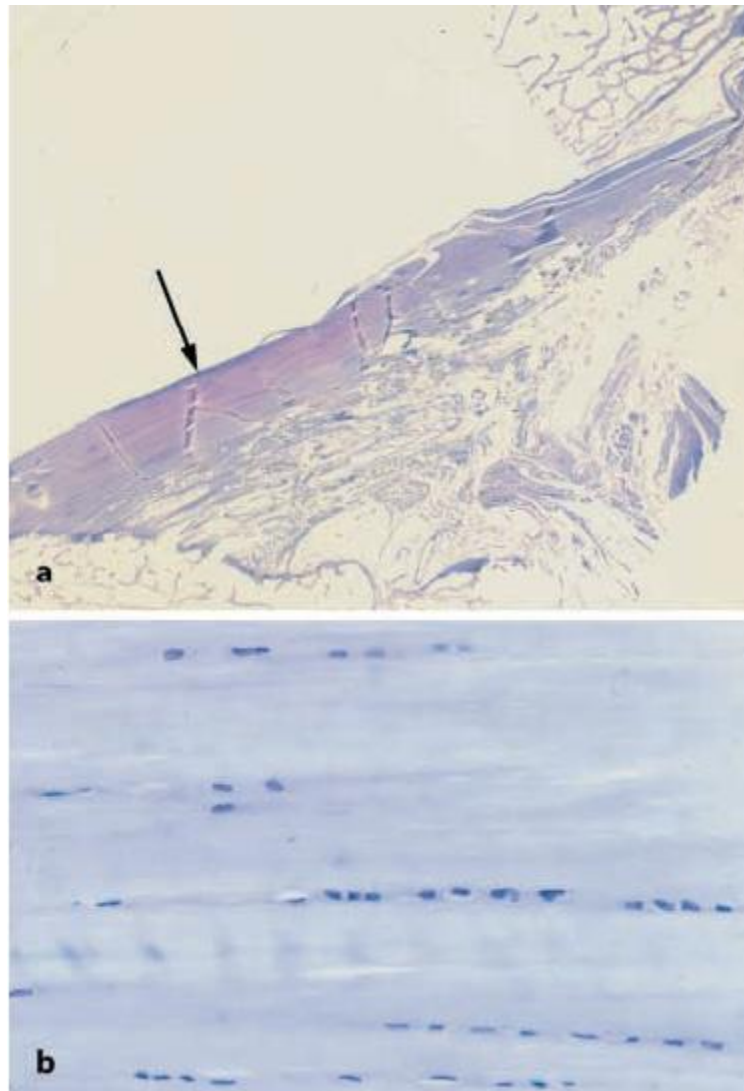


Abb. 6: a) Längsschnitt durch ein ACL. Dieses besteht hauptsächlich aus straffem Bindegewebe (Toulinblaufärbung, MG x4) b) Vergrößerung aus dem distalen Drittel mit der typischen Anordnung von KF und Zellen (Toulinblau, MG x40). Aus: Petersen, W. and B. Tillmann, *Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes*. *Der Orthopäde*, 2002. 31(8): p. 710-718.

Das Kollagen bildet ultrastrukturell sog. Triple Helices, die sich zu Mikrofibrillen arrangieren, deren Breite zwischen 25 und 150 nm variiert [15]. Diese wiederum formieren Faszikel und schließlich das vollständige Ligament (s. Abb. 7).

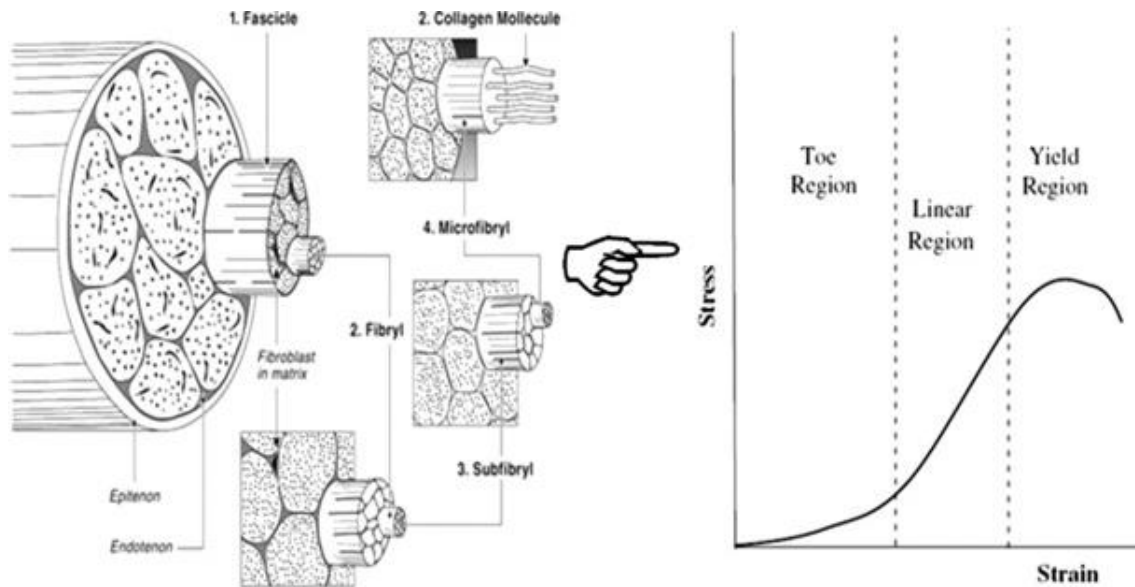


Abb. 7: Mikrostruktureller Aufbau von Sehnen und Bändern (aus: Viera AC, Guedes RM, Tita V. Constitutive models for biodegradable thermoplastic ropes for ligament repair. *Composite Structures* 94(11). 2012, S. 3149-3159).

Aufgrund der Anordnung der Kollagenfasern besitzt ein humanes ACL eine max. Reißfestigkeit von etwa $2160 \text{ N} \pm 157 \text{ N}$ [16, 17], sowie eine Steifheit von ca. $242 \pm 28 \text{ N/mm}$. Seine Stress-Strain Kurve (Kraft-Dehnungsdiagramm) zeigt dabei einen sigmoidalen Verlauf (s. Abb. 7 rechts). Hier repräsentiert der lineare Bereich die elastische Verformung der Bänder, die vollständig reversibel abläuft. Bei 25-30 % Dehnung geht er in die Phase einer plastischen Verformung über, die mit Mikrofaserkollagenrupturen und irreversiblen Verlängerungen der Kollagenfasern einhergeht. Man bezeichnet sie auch als „Verletzungsphase“ oder „yield region“ [18].

Begleitet wird das ACL von vielen Nervenfasern, die neben Mechanorezeptoren wie Ruffini-Körper, Golgi-Organen sowie freien Nervenendigungen [19] auch Propriozeptoren führen, die für die aktive Stabilisierung des Kniegelenks wichtig sind [10]. Seine Blutgefäßversorgung erfolgt proximal über Äste der A. genus media, sowie distal über die Aa. genus inferiores med. et lat., die im Bereich der Synovialscheide periligamentär Netze bilden von denen ausgehend ebenfalls ein intraligamentäres Gefäßnetz formiert wird (s. Abb. 8) [11].

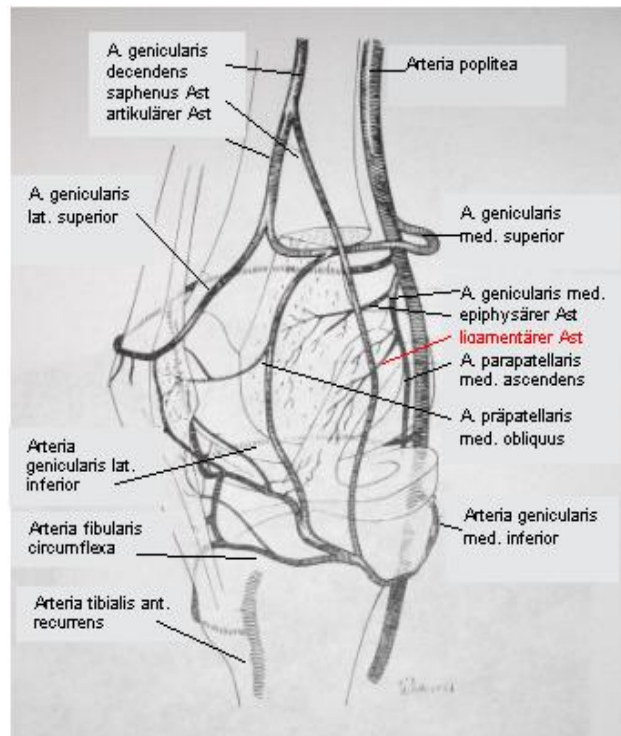


Abb. 8: Blutversorgung der Kniegelenksstrukturen (aus: Arnoczky SP. Blood supply to the anterior cruciate ligament and supporting structures. *Orthop Clin North Am* 16. 1985. Modifiziert nach: Unterhauser FN. Revascularisierung und Nachweis von Myofibroblasten im freien Sehnentransplantat nach vorderem Kreuzbandersatz -Histologische 2-Jahres Untersuchung am Schaf-, Berlin, 2004).

1.2.3 Muskulärer Apparat

Das Kniegelenk wird nicht nur von einem starken Kapselbandapparat, sondern auch von zahlreichen Muskeln umgeben und stabilisiert. Neben dem M. quadriceps femoris spielt in diesem Zusammenhang vor allem die ischiocrurale Muskulatur eine große Rolle, die im englischen Sprachraum auch als „Hamstrings“ bezeichnet wird. Ihr kommt im Rahmen dieser Arbeit eine genauere Betrachtung zu, da sie als Synergist zum ACL fungiert [20].

Zu den „Hamstrings“ zählen neben dem M. semitendinosus und dem M. semimembranosus auch der M. biceps femoris. Während diese in Extension das Kniegelenk stabilisieren, sichern sie bei zunehmender Beugung die Tibia gegenüber einer ventralen Translation, ähnlich dem ACL. Neben ihren physiologischen Eigenschaften zur Sicherung des Kniegelenks haben sie auch in der rekonstruktiven Versorgung des ACL nach Bandruptur eine sehr große Bedeutung.

1.3 Verletzungen der Kreuzbänder und ihre rekonstruktive Versorgung

1.3.1 Pathomechanismen und Folgen einer ACL-Ruptur

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, sind ACL-Risse häufig diagnostizierte Verletzungen im Bereich des Kniegelenks. Als Verletzungsmechanismus werden meist unerwartete Rotationsbewegungen des Femurs gegen einen fixierten Unterschenkel beschrieben, die vor allem in den oben bereits erwähnten Risikosportarten auftreten.

Neben einer isolierten ACL-Ruptur entstehen aufgrund der Komplexität und Organisation des Kniegelenks jedoch nicht selten auch Läsionen im übrigen Kapsel-/Bandapparat. Sie werden beispielsweise bei einer Ruptur des ACL, des medialen Kollateralbandes, sowie des Innenmeniskus als „unhappy triad“ bezeichnet [21] und sind mit einer hohen Inzidenz behaftet. Je nach Mechanismus sind aber auch isolierte Verletzungen der einzelnen ACL-Bündel möglich [22].

Grundsätzlich steht man bei der weiteren Behandlung einer ACL-Ruptur vor der Entscheidung zwischen konservativer oder operativer Therapie. Bei der Entscheidungsfindung sollten dabei neben dem Alter und dem Aktivitätslevel auch das Ausmaß der primären Laxität die sog. Tibiatranslation, sowie Kollateralbandverletzungen und meniskale Läsionen in Betracht gezogen werden [23].

Die konservative Therapie legt dabei ihr Hauptaugenmerk auf das Training der „Hamstring“-Muskulatur, die wie in Kapitel 1.3 erwähnt, als funktioneller Synergist zum ACL wirkt. Obwohl dadurch das Auftreten einer vorderen Schublade und die sog. „Giving-way“-Symptomatik verbessert werden kann, bleibt die Problematik einer Knorpelschädigung aufgrund der andauernden passiven Instabilität bestehen [24]. Generell scheint die konservative Therapie dem operativen Verfahren unterlegen, da neben einem höheren Osteoarthrose-Risiko auch das subjektive Outcome schlechter ist [25–28]. Bei jungen und aktiven Patienten wird daher die operative Rekonstruktion des ACL bevorzugt [4, 29–31]. Im letzten Jahrhundert wurden dafür über 250 Operationsmethoden entwickelt, die neben dem Einsatz von autogenem und allogenen Transplantatmaterial auch die Verwendung von xenogenem Material beinhalten [32–38].

Heutzutage werden vor allem autologe Transplantate verwendet, während allogene Materialien in Deutschland aktuell noch kaum eine Rolle spielen. Synthetische Materialien (Gore-Tex, Kohlefaserimplantate, etc.) hingegen kommen ähnlich wie xenogene Materialien kaum noch zum Einsatz.

1.3.2 Physiologie der Heilung des ACL

Eine vollständige Heilung einer vorderen Kreuzbandruptur wird im Gegensatz zu einer Heilung nach einer Innenbandruptur relativ selten beobachtet [39, 40]. Dabei durchläuft die Heilung von Bändern je nach Autor drei bis vier Phasen [40]. Die erste ‚hämorrhagische‘ Phase ist gekennzeichnet durch Einblutungen aufgrund des stattgefundenen Traumas. Einwandernde Lymphozyten und Granulozyten lösen über autokrine sowie parakrine Signale eine anschließende ‚inflammatorische‘ Phase aus, deren Maximum ca. 72 h nach Auftreten einer Ruptur erreicht wird und mehrere Wochen andauert. Aktivierte Makrophagen sorgen für einen Abbau von nekrotischem Bandmaterial. Durch die Freisetzung von bestimmten Wachstumsfaktoren wie z.B. dem vascular epidermal growth factor (VEGF), dem plated derived growth factor (PDGF) oder auch den transforming growth factors α/β (TGF- α/β) [41] kommt es zu einer Bildung von Granulationsgewebe und zur Neovaskularisation. Daneben beginnen Fibroblasten unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren mit der Neusynthese von Kollagenen und Matrixproteinen. Dieser Vorgang bildet den Übergang in die dritte, die sog. ‚reparative‘ Phase. Neben Matrixproteinen wie Proteoglykanen wird dabei hauptsächlich Kollagen Typ III synthetisiert, das eine Brücke über die gerissenen Bandenden bildet [40]. Die Matrix wird dicker und der Anteil an Kollagen Typ I steigt erheblich an. Insgesamt kommt es dadurch zu einer „Ligamentisierung“ der bestehenden Strukturen.

Der gesamte Prozess wird deshalb als „Remodeling“ bezeichnet. Bis zum Abschluss dieser Phase besitzt das neu gebildete Gewebe aufgrund einer unzureichenden Matrixzusammensetzung mit ungünstigen Kollagenverhältnissen und unzureichenden Quervernetzungen, sog. ‚crosslinks‘ der Kollagenfasern (KF), untereinander nicht suffiziente mechanische Eigenschaften. Aufgrund der ungünstigen Gefäßversorgung [42] sowie der fehlenden Bildung eines sog. ‚fibrin

clots‘ zwischen den Faserenden, besitzt ein vollständig rupturiertes ACL nur die Fähigkeit zu einer Defektheilung. Daraus resultiert ein instabiles Knie, das zur Stabilitätssicherung meist einer operativen Behandlung unterzogen werden muss. Hierfür gibt es in der heutigen Zeit verschiedene Möglichkeiten.

1.3.3 Operative Rekonstruktionsverfahren

1.3.3.1 Autogener Ersatz

Aufgrund des ungünstigen intrinsischen Regenerationspotentials des ACL [43], bildet die chirurgische Versorgung bzw. Rekonstruktion des ACL aktuell den „Goldstandard“ in der Therapie [40]. Hierunter werden verschiedene Verfahren subsummiert. Relevant sind heute allerdings nur noch drei Standardverfahren: die ACL-Rekonstruktion mittels des mittleren Patellasehnedrittels, der Ersatz mittels einer Semitendinosus-/Gracilissehnenplastik, sowie die Versorgung mit Hilfe eines Quadrizepssehnenanteils.

1.3.3.1.1 Rekonstruktion mittels Lig. patellae

Die Rekonstruktion des ACL mit Hilfe des mittleren Drittels des Lig. patellae, wurde erstmals von Kenneth Jones im Jahre 1963 vorgestellt [44]. Dabei wird ein sog. Bone-Tendon-Bone-Transplantat (BTB) gewonnen, d.h. ein Sehnenstück der Patellarsehne, das an beiden Enden in einem Knochenstück fest verankert ist. Die sich daraus ergebenden Vorteile sind eine primär feste Verankerung im Knochen, eine frei wählbare Transplantatbreite, eine Erhaltung der aktiven Innenrotation, sowie eine Schwächung der Antagonisten, in diesem Fall des M. quadrizeps [45–47]. Der Nachteil besteht darin, dass in bis zu 40 % aller Fälle entnahmeassoziierte Komplikationen beobachtet werden. Dies liegt vor allem an der für das Kniegelenk traumatisierenden Entnahme des Kreuzbandersatzmaterials. Postoperativ kann es dabei häufig zu einer Störung des Streckapparates mit einem persistierenden Streckdefizit von bis zu 15 % nach einem Jahr, ventralen Knieschmerzen (mit Krepitationssymptomatik) sowie Problemen bei knieenden Tätigkeiten kommen [48–50].

Seltener, jedoch schwer zu behandelnde Probleme sind Patellafrakturen und Sehnenrupturen, sowie die Entstehung eines sog. infrapatellären Kontraktursyndroms (IPCS) oder eines „Cyclops“ [48]. Trotz dieser Nachteile waren Patellarsehnen auch lange das am häufigsten eingesetzte Sehnenmaterial und wurden als „Goldstandard“ der ACL-Rekonstruktion bezeichnet [51].

1.3.3.1.2 Rekonstruktion mittels Hamstrings-Sehnenplastik

Neben der Lig. patella-Plastik gilt der Ersatz mittels eines Sehnentransplantats als Alternativverfahren der Wahl. Ihrer im Vergleich zur Patellasehne [18] geringeren Reißfestigkeit begegnet man mit einer meist vierfachen Bündelung der Sehnenstränge, wodurch eine ungefähre Annäherung an die morphologischen Eigenschaften eines nativen ACL erreicht wird [52]. Diese Technik weist jedoch Vor- und Nachteile auf.

Der wohl bedeutendste Vorteil liegt in der geringeren Entnahmestellen-Morbidität, der sog. „donor-site-morbidity“, da der Streckapparat hier unberührt bleibt. Zusätzlich lässt sich der operative Zugangsweg in einem spannungsfreien und „relativ geschützten“ Areal wählen, wodurch Wundheilungsstörungen deutlich minimiert werden können. Auf der anderen Seite wird jedoch durch diese Technik die Innenrotation bzw. die dynamische Gegenregulation bei forcierter Außenrotation deutlich geschwächt, was in der Folge zu weiteren Knieproblemen führen kann [53–55]. Daneben muss auch berücksichtigt werden, dass die Sehne nicht immer in gleicher Länge und Dicke gewonnen werden kann, sodass beispielsweise aufgrund eines Dickendefizits kein ausreichend „kräftiges“ Transplantat eingesetzt werden kann. In diesen Fällen werden alternative Verfahren, vor allem die Lig.-patella-Plastik, empfohlen.

1.3.3.1.3 Ersatz mittels Quadrizepssehnen-transplantat

Der Einsatz der Quadrizepssehne in der Kreuzbandchirurgie wurde am Menschen erstmals von Marshall 1979 beschrieben. Dabei wird, ähnlich dem BTB-Transplantat des Lig. patellae, ein sog. Quadrizepssehnen-Knochenblock-Transplantat gewonnen und ins Kniegelenk eingesetzt.

Obwohl in der letzten Zeit durch Studien von Fulkerson und vor allem Stäubli [18, 56, 57], die die hervorragende Biomechanik und Morphometrie der Quadrizepssehne herausstellten, der Einsatz eines Quadrizepssehnen-Patella-Konstrukts als Primärerersatz des ACL wieder in den Fokus rückte, wird es heute nur selten und meist ausschließlich bei Revisionseingriffen angewandt, da es zu Schmerzen und Funktionseinschränkungen im Kniegelenk sowie zu einer Abnahme der Quadrizepssehnenkraft kommen kann [58].

1.3.3.2 Allogener und xenogener Ersatz

Vor allem bei Revisionseingriffen und bei multiplen Bandverletzungen, ergibt sich das Problem der Verfügbarkeit autologer Sehnen. In diesen Fällen stellen allogene Transplantate, d.h. Transplantate derselben Art von einem genetisch nicht identischen Spender, meist die einzige Chance auf einen suffizienten Kreuzbandersatz dar. Dabei werden vor allem die Patellar-, Achilles- oder auch Tibialis anterior-Sehnen verwendet [59–61]. Während die Vorteile wie z.B. kurze OP-/Narkosezeiten, fehlende Entnahmemorbidität oder frühe Belastungsstabilität klar ersichtlich sind, sind dem Einsatz solcher allogener Materialien aufgrund von Immunreaktionen des Empfängers, der möglichen Übertragung von Infektionskrankheiten wie HIV, HCV oder Ähnlichem, Grenzen gesetzt [62, 63]. Zusätzlich erschweren die Kostenintensität des Verfahrens, eine aufgrund der Lagerung geringere Reißfestigkeit sowie die geringe Spendenbereitschaft in der deutschen Bevölkerung den Einsatz derartiger Materialien. In Amerika dagegen hat diese Ersatztechnik in den letzten fünf Jahren eine Zunahme um ca. 30 % erfahren und stellt dort eine wirkliche Alternative in der ärztlichen Routine des ACL-Ersatzes dar [64].

Neben diesem Verfahren gab es innerhalb des letzten Jahrhunderts auch immer wieder Ansätze, zu einem xenogenen Bandersatz. Dabei handelt es sich um einen adäquaten Bandersatz aus körperfremden Material. Erstmals beschrieb Lange 1907 [65] den Versuch, das Kreuzband mittels Seide zu ersetzen. Dies konnte sich aber ebenso wenig durchsetzen, wie Kunstbänder aus Dacron [66, 67], Polyester [68, 69], Goretex® [70], Trevira [71] oder auch Kohlefaser [72], da die Komplikationsrate hoch („schwarzes Knie“) und die Zahl der klinisch erfolg-

reichen Operationen niedrig waren [73]. Seit 1990 gilt die Implantation von Kunststoffbändern sogar als Präarthrosemodell für das Knie [74]. Dennoch gab es auch innerhalb der letzten 10 Jahre immer wieder Ansätze, Kreuzbänder durch xenogenes Material zu ersetzen. Als Beispiel hierfür dient das Leeds Keio Ligament /LARS [75, 76].

Daneben gab es etwa zu Beginn der 30er Jahre immer wieder Versuche, Kreuzbänder mit Hilfe von tierischen Materialien zu ersetzen. Bircher war der Erste, dem dies mit Kängurubändern gelang [77] und der damit sogar gute Ergebnisse erzielen konnte. Auch in der Folge gab es immer wieder Berichte über weitere Einsatzversuche tierischer Materialien, ohne dass sich diese Verfahren jedoch durchsetzen konnten [78–83].

In jüngster Zeit gibt es im Rahmen des Tissue Engineering, wieder Bestrebungen, u.a. Kreuzbänder mit Hilfe von Trägermaterialien, sog. ‚Scaffolds‘, die fakultativ mit diversen Zellen besiedelt werden können, in vitro und in vivo zu ersetzen [84–86]. Das Konzept basiert dabei auf einer Beeinflussung von Zellen und deren Biosyntheseprozessen, um im Idealfall ein bestimmtes menschliches Gewebe in vitro züchten zu können. Hierfür vereint es Komponenten aus „Ingenieurs-, Werkstoff- und Lebenswissenschaft“ [87], jedoch kommen auch neue Methoden wie Gentransfer, Wachstumsfaktoren oder Gentherapie zum Einsatz. Grundsätzlich beinhaltet das Tissue Engineering vier Grundprinzipien:

- die Verwendung von (dreidimensionalen) Trägermaterialien, sog. „scaffolds“,
- den Ersatz von lebenden Zellen oder Gewebe,
- die Kontrolle der Signaltransduktion der einzelnen Komponenten untereinander, meist mittels Einsatzes von Wachstumsfaktoren,
- die Verwendung eines Kulturmediums bzw. Organismus.

Die Vorteile und Chancen sind dabei klar ersichtlich. Neben einer geringeren Patientenmorbidity aufgrund der Schonung autologer Entnahmestellen und einer daraus resultierenden kürzeren OP-Dauer ist auch ein schnellerer Regenerationsprozess mit einer wie bei herkömmlichen Verfahren vergleichbaren Kniestabilität gegeben. Dennoch steckt gerade im Bereich der Sehnen- und Bandregeneration das Tissue Engineering bisher noch in der Grundlagenforschung fest.

Zwar wurden unter Variation des jeweiligen Trägermaterials bereits erste Versuche unternommen, jedoch konnten bisher noch keine durchschlagenden Ergebnisse erzielt werden. Dabei scheint vor allem die Frage nach dem Trägermaterial entscheidend, da dieses im Idealfall eine hohe initiale Reißfestigkeit gleichzeitig aber auch eine gute Biokompatibilität und eine schnelle Degradierbarkeit aufweisen muss, um den Prozess der Neoligamentbildung nicht zu kompromittieren. Kollagen Typ I bietet hier optimale Voraussetzungen, da es leicht degradierbar, hoch biokompatibel und sehr reißfest ist.

1.4 Fragestellung

Mit der zunehmenden Bedeutung des Tissue Engineering für die Regenerative Medizin konnten in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte bezüglich der Regeneration von traumatisiertem Band- und Sehngewebe erzielt werden. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Optimierung dieser Kollagenkonstrukte, um eine höhere anfängliche biomechanische Stabilität in vivo zu erreichen. Hierfür wurden diverse Kollagencrosslinker in Bezug auf ihr biomechanisches Verhalten sowie auf sog. Minikonstrukte untersucht und untereinander verglichen. Ebenso wurde ihre Wirkung auf Zellen in vitro im Sinne einer Biokompatibilitätsmessung sowie die Auswirkungen von Kollagenase auf ihre Reißfestigkeit geprüft.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgt eine Tierstudie an 16 Minipigs, denen statt eines nativen ACL Genipin-gecrosslinkte Konstrukte implantiert wurden. Nach 6 postoperativen Wochen wurde an 8 Tieren eine biomechanische Testung durchgeführt. Die übrigen 8 Tiere wurden nach 6 Monaten untersucht. Ziel war es, eine möglichst hohe Reißfestigkeit in den Untersuchungen zu erzielen, sowie einen Einblick in die Remodelingprozesse des hergestellten Konstrukts und dessen Interaktion auf das umliegende Gewebe zu gewinnen. Es wurden daher auch histologische Untersuchungen der entnommenen Materialien vorgenommen.

2 Material und Methoden

2.1 Isolation und Aufreinigung der Kollagenfasern

Die zur Herstellung der Konstrukte verwendeten Kollagenfasern (KF) wurden aus Rattenschwanzsehnen gesundheitsüberwachter Tiere (gezüchtet von der Fa. Charles River, Sulzfeld) nach einem einheitlichen Protokoll isoliert und aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst die Rattenschwänze vorbereitet und in unsteriles 0,9 % NaCl eingelegt. Anschließend erfolgte das Herauslösen der Kollagen-I-Fasern nach bekannter Technik [88]. Nach einer Sortierung der KF nach ihrer Länge (mittel = 8-11 cm) wurden diese nun für 10 min in 70%iges Ethanol eingelegt. Danach wurden die Fasern für 2 min mit sterilem 0,9 % NaCl gewaschen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und abschließend die KF in sterilen Flaschen bei 4 °C gelagert.

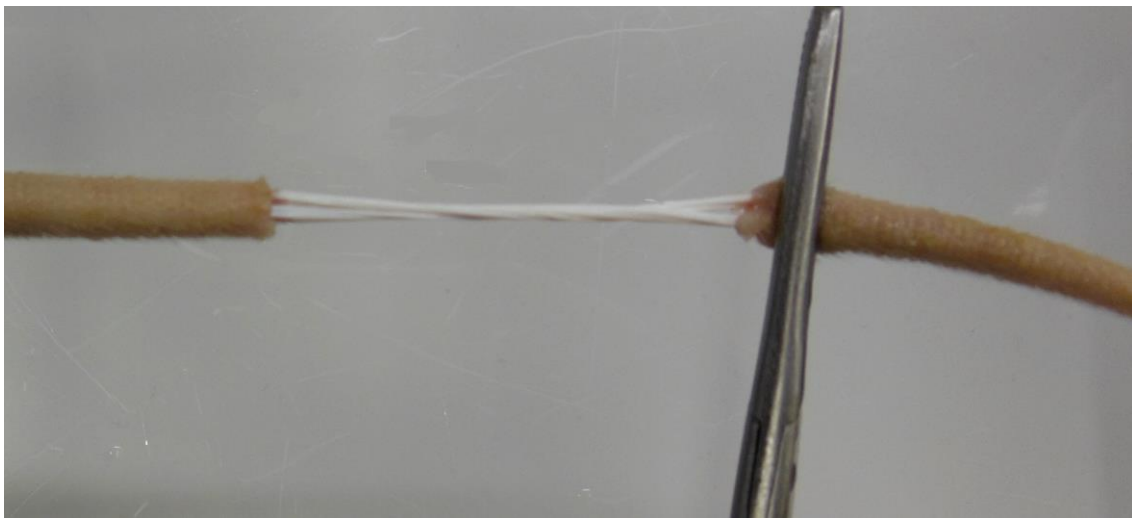


Abb. 9: Isolation der Kollagenfasern aus Rattenschwänzen (eigene Darstellung).

2.2 Qualitätskontrolle der Fasern

Zur Überprüfung der Qualität der herausgelösten KF wurde zur groben Orientierung eine primäre biomechanische Testung der Fasern vorgenommen. Dabei wurde jede einzelne Faser einer Belastung von 6 N bzw. 5 N ausgesetzt. Nur die Fasern, die dieser Prüfung Stand hielten und nicht rissen oder verglasten, wurden in der Folge weiterverarbeitet.

2.3 Herstellung der Konstrukte

Die kontrollierten KF wurden im nächsten Schritt zu einem längeren Faserstrang zusammengeführt. Hierbei wurde eine einfache Dreifachknotentechnik bestehend aus drei halben Schlägen verwendet, wie sie in der Chirurgie üblich ist.

Die Enden der Kollagenfasern wurden jeweils mittels dieses Knotens verknüpft und zu einem Strang beliebiger Länge zusammengeführt. Wichtig bei der Verknüpfung war es, auf die Homogenität der einzelnen Fasern untereinander zu achten, da nur so der optimale Halt eines Knotens gewährleistet werden konnte. Als weitere Qualitätskontrolle erfolgte eine erneute mechanische Testung der Stränge und insbesondere der Knoten, allerdings diesmal mit 2 N. Anschließend wurde der Strang auf eine 1 ml Syringe Spritze aufgewickelt und in steriles 0,9%iges NaCl zur weiteren Konservation eingelegt. Je nach Dichte der jeweiligen Wicklung, sowie der Art des herzustellenden Konstrukts, wurden eine oder mehrere dieser Kollagenfaserketten zu vollwertigen Kreuzbandkonstrukten weiterverarbeitet. Hierzu wurde ein Instrument entwickelt, das aus zwei starren Holmen mit zwei querverlaufenden parallelen Streben bestand (s. Abb. 10).



Abb. 10: Vorrichtung zur Herstellung von Kollagenfaserkonstrukten (sog. "Reiter").

Je nachdem, welche Art von Konstrukt benötigt wurde, wurde der Abstand der Streben verändert. Bei den Tierversuchen betrug er 9,0 cm, für die biomechanischen Messungen waren 3,0 cm ausreichend. Ebenso variierte die Anzahl der Wicklungen um die beiden Streben je nach Konstrukttypus. Beim Tierversuch waren es 15, bei den Minikonstrukten nur 8 Wicklungen. Die gewickelten Stränge wurden anschließend aus dem Instrument genommen. Um den Durchmesser eines nativen Minipig-ACL von etwa 4,5 mm zu erhalten und um die Stabilität nach allen Seiten zusätzlich zu erhöhen, wurden die Konstrukte für den Tierversuch noch einmal der Länge nach gefaltet und dreifach ineinander verdrillt, sodass eine Bandstruktur erkennbar war (s. Abb. 11). Der Durchmesser dieses Bandes wurde mittels einer Lochplatte ermittelt, die Öffnungen von verschiedenen Durchmessern aufwies. Die Öffnung, durch die das Konstrukt gerade noch durchgezogen werden konnte, entsprach dem ungefähren Banddurchmesser. Dabei wurde beim Tierversuch auf einen Durchmesser von 4 mm, beim Minikonstrukt auf etwa 2 mm geachtet. Anschließend wurde durch die beiden Schlaufen des Konstrukts je ein Surgical Loop der Fa. Braun gefädelt und verknötet. Das Endprodukt wurde für eine spätere Verarbeitung in ein 15 ml Tube mit sterilem 0,9%igem NaCl eingelegt.

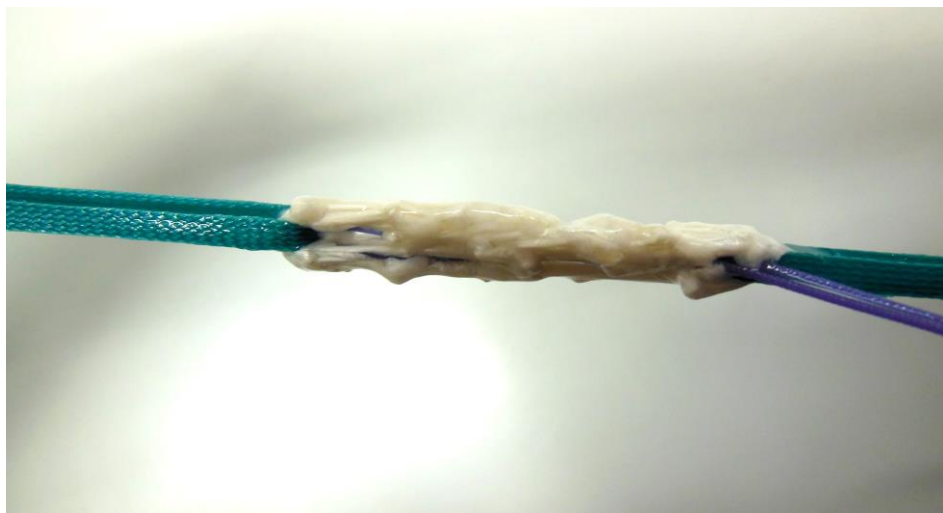


Abb. 11: vollendetes Kollagenfaserkonstrukt in vitro.

2.4 Crosslinking

Da die Tierversuchskonstrukte während der initialen Versuchsreihe aus dem Jahr 2010 deutliche Reißfestigkeitseinbußen im Vergleich zu den in vitro-Versuchen zeigten, wurden in der neuen Versuchsreihe Crosslinking-Verfahren zur Stabilisierung der Kollagenfasern bzw. Minikonstrukte verwendet. Diese führten durch unterschiedliche chemische Reaktionen an den Peptidketten des Kollagens zur Bildung von intra- bzw. intermolekularen Brücken, wodurch eine höhere Stabilität der Konstrukte erreicht werden konnte.

Insgesamt wurden 4 Crosslinker (Glucose, EDC/NHS, 10 % HMDI, Genipin) auf ihre biomechanischen und biokompatiblen Eigenschaften untersucht.

2.4.1 Crosslinking mittels Glukose

Hierzu wurde zunächst eine 100 mM-Glukose-Lösung hergestellt. Diese wurde anschließend steril filtriert (Porendurchmesser 0,22 µm) und die KF in die entstandene Glucoselösung eingelegt. Nach einer dreitägigen Inkubationszeit erfolgte eine Gammasterilisation der Kollagenfasern bzw. -konstrukte mit 25 kGy (BBF Sterilisationsservice, GmbH, Kernen, s. Kap. 2.5). Abschließend wurden die Fasern zunächst für 2 Tage in 500 mM Natrium-Ascorbat und danach noch dreimal in sterilem 0,9 % NaCl gewaschen.

2.4.2 Crosslinking mittels EDC und NHS im MES-Puffer

Grundlage für die Berechnung von Phosphate Buffered Saline (PBS) in diesem Ansatz war ein molekulares Gewicht von 73,85 g/mol. Für N-Morpholinoethansulfonsäure (MES) betrug es 195,2 g/mol. Der Lösungsansatz bestand dabei aus:

- 5,375 ml MES-Lösung (0,05M) pH=5,5 [400] aus
- 52,46 mg MES
- 5,375 ml Aqua dest.
- 86,5 mg 1-Ethyl-3-diaminopropyl-carbodiimid
- 20,75 mg N-Hydroxysuccinimid

Nach Herstellung der Crosslinker-Lösung nach o.g. Ansatz erfolgte die Zugabe der KF und das Crosslinken für 24 h. Anschließend wurden die Fasern mit PBS unter ständigem PBS-Wechsel auf der Schüttelplatte für 48 h gewaschen und der Gammasterilisation mit 25 kGy (BBF Sterilisationsservice, GmbH, Kernen, s. Kap. 2.5) zugeführt. Abschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen in steriler 0,9 % NaCl-Lösung.

2.4.3 Crosslinking mittels 10 % HDMI

Hierzu wurde zunächst eine 10 % Hexamethylendiisocyanat-Lösung (HDMI) in 100 % Isopropanol hergestellt. Nach Einlegen der KF erfolgte ein Crosslinking für 24 h. Im Anschluss wurden die Fasern für 48 h in Isopropanol auf der Schüttelplatte und danach mindestens dreimal in 0,9 % NaCl gewaschen. Abschließend erfolgte eine Gammasterilisation mit 25 kGy (BBF Sterilisationsservice, GmbH, Kernen, s. Kap. 2.5) und nochmals ein dreimaliges Waschen in sterilem 0,9 % NaCl.

2.4.4 Crosslinking mittels Genipin

Bei dieser Form des Crosslinking wurde eine 0,5 % Genipinlösung [89] hergestellt aus

- 3,69 mg PBS
- 5 ml H₂O
- 25 mg Genipin

Anschließend wurden die KF hinzugegeben und ein Crosslinking für 24 h durchgeführt. Nach Waschen mit PBS (mit PBS-Wechsel) für 48 h unter Lagerung auf dem Shaker erfolgte eine Gammasterilisation mit 25 kGy (BBF Sterilisationsservice, GmbH, Kernen, s. Kap. 2.5) und abschließend ein dreimaliges Waschen in steriler 0,9 % NaCl-Lösung.

Durch den Crosslinkingvorgang nahmen die KF eine grauschwarze Farbe an.

2.5 Gammasterilisation von Fasern und Konstrukten

Nach der Herstellung der jeweiligen Fasern bzw. Konstrukte erfolgte abschließend eine Gammabestrahlung mit 25 kGy. Diese diente zum einen der Sterilisation der Konstrukte, zum anderen förderte sie beim Crosslinking mit Glukose die Verknüpfung der einzelnen KF. Aufgrund ihres großen Durchdringungsvermögens sowie ihrer hohen Dosishomogenität wird diese Methode aktuell häufig zur Sterilisation von Medizinprodukten eingesetzt und gewährleistet so ausreichende Sicherheit in Bezug auf die Keimfreiheit des Materials.

2.6 Biomechanische Messungen

Die Auswirkungen der verschiedenen Crosslinking-Verfahren auf die Stabilität der einzelnen Kollagenfasern sowie der hergestellten Ersatzbänder wurden einer biomechanischen Prüfung unterzogen.



Abb. 12: Vorrichtung für die biomechanischen Messungen (sog. „Zwick“).

Hierfür wurde eine spezielle Materialtestmaschine verwendet (Zwick Z010, Model 1445, Zwick Roell AG, Ulm, s. Abb. 12), die im Folgenden als „Zwick“ bezeichnet wird. Sowohl bei den Einzelfasertests als auch bei den Konstrukttests wurden Maximallastversuche durchgeführt. Während der Messung musste das Kollagen

immer feucht gehalten werden, um ein Austrocknen mit Veränderungen der Reißfestigkeit zu vermeiden. Die Messung erfolgte dabei unter einer Vorlast von ca. 1 N, sowie einer Messgeschwindigkeit von 30 mm/min. Es wurden Last-Dehnungsdiagramme angelegt, um neben der Maximallast auch die lineare Steifigkeit des Materials untersuchen zu können. Zusätzlich wurde das Elastizitätsmodul ermittelt. Dabei galt es zu beachten, dass Kraft-Dehnungskurven ein charakteristisches Muster aufweisen.

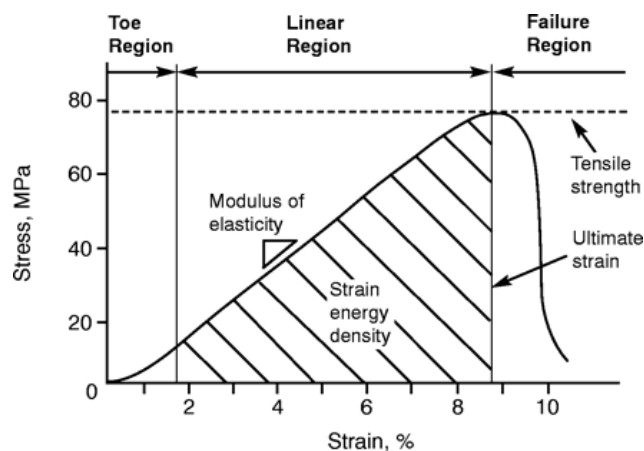


Abb. 13: schematische Darstellung eines Kraft-Dehnungs-Diagramms von humanen Ligamenten (aus: Woo SLY, Vogrin TM, Abramowitch SD. Healing and Repair of Ligament Injuries in the Knee. *J Am Acad Orthop Surg* 8.2000; 8:364-372).

Zunächst verlief die Kurve flach, was auf eine Dehnung ohne intraligamentäre Kraftzunahme zurückzuführen war [90]. Mit zunehmender Dehnung ging die Kurve in einen linearen Verlauf über. Die Steigung S der Kurve verhielt sich hierbei direkt proportional zum Elastizitätsmodul E , gemäß der Formel $E = S/A$, wobei A den Querschnitt der Faser bzw. des Konstrukts beschreibt. S korrelierte zusätzlich zum Quotienten aus $\Delta\sigma/\Delta l$, wobei $\Delta\sigma$ die Spannungsänderung und Δl die Längenänderung der Faser(n) darstellten [40].

Nach diesem linearen Verlauf, der die höchste Steifigkeit des Materials beschreibt, flachte die Kurve bei weiterer Dehnung aufgrund von irreversiblen Deformationen in der Struktur ab. Schließlich zerrissen einzelne Kollagenfasern bzw. das gesamte Konstrukt.

Neben den bereits genannten Variablen wurde außerdem die Reißfestigkeit, also das Maximum der Kraft-Dehnungskurve, die sog. ‚ultimate tensile strength‘ (UTS)

sowie die Steifigkeit des Materials bestimmt. Letztere ermittelt sich aus dem Quotienten von Kraft zu absoluter Dehnung und kommt somit ohne Bestimmung der Querschnittsfläche des verwendeten Materials aus. Sie entspricht dem Verhältnis von Spannung (Kraft/Fläche) zu Dehnung. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel anhand eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests. Zusätzlich wurde zu Vergleichszwecken eine einseitige Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) durchgeführt, um Unterschiede bereits im Vorfeld detektieren zu können. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 5 \%$ festgelegt. Als signifikant wurde dabei ein p-Wert von $0,01 \leq p \leq 0,05$ und als hochsignifikant Werte mit $p < 0,01$ bezeichnet.

2.7 Messungen zur Biokompatibilität

Neben den biomechanischen Eigenschaften stand, im Hinblick auf den Tierversuch bzw. den zukünftigen humanen Einsatz der Konstrukte, die Messung der Biokompatibilität der unterschiedlichen, durch Crosslinking hervorgegangenen Kollagenfasern im Vordergrund. Um diese metrisch zu analysieren und vergleichen zu können, wurden neben einer klassischen Zellzählung mit Morphologiebestimmung, ein sog. BioRadAssay zur Proteingehaltsbestimmung der Zellen sowie eine CellTiterGlo®-Messung durchgeführt.

Als gemeinsame Grundlage wurden Fibroblastzellen aus Mäusen der Zelllinie L929 verwendet. Den Ausgangspunkt der oben beschriebenen Nachweisverfahren bildete die Herstellung eines Eluats aus den jeweiligen Kollagenfasern. Hierzu wurde eine vorgegebene Menge von Fasern (10 g Feuchtgewicht $\hat{=}$ 2,5 mg Trockenmasse) unter der Sterilbank in einer sterilen Petrischale für etwa 48 h getrocknet. Anschließend wurden diese in ein 50 ml Flacon gegeben und pro Gramm Kollagenfasern mit 10 ml DMEM (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) + 0,5 % DMSO (Applichem über Fa. Hartenstein, Würzburg, Deutschland) zugesetzt. Parallel dazu wurde für die Negativkontrolle in eine 24-Well-Platte pro Well (Anzahl der Wells abhängig vom Versuchsansatz) 500 μ l DMEM + 0,5 % DMSO pipettiert. Ebenso wurde bei der Herstellung der Positivkontrolle verfahren, allerdings wurde hier zusätzlich ein autoklaviertes Vekaplan KT-Plättchen (\varnothing 15,5 cm) pro Well eingelegt. Die 24-Well-Platten wurden wie das

50 ml Röhrrchen daraufhin bei 37°C und 5 % CO₂ für 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte das Auslegen der Zellen auf jeweils zwei 24-Well- sowie zwei Mikrotiterplatten (MTP). Die Zahl der verwendeten Wells richtete sich dabei nach der Anzahl der zu bestimmenden Materialien. Es wurde darauf geachtet, dass in die Wells der 24-Well-Platte etwa 25.000 und in die MTP etwa 20.000 Zellen pro Well pipettiert wurden. Anschließend wurden diese dann ebenfalls für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Nun wurden 10 ml Trypsin zur Zellablösung zugegeben und die MTP für 3 min inkubiert. Hiernach wurde das entstandene Trypsinat zusammen mit 10 ml DMEM Medium in ein 50 ml Flacon gegeben und dieses bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abpipettiert und das verbliebene Zellpellet in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Nach Durchführung einer Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer (Improved von Marienfeld) wurden die Zellen entsprechend ihrer Verwendung in die 24-Well bzw. MTP auslegt.

Nach den o.g. Inkubationszeiten wurde nun das aus den Kollagenfasern gewonnene Eluat auf die Zellwells pipettiert, jeweils 1 ml/Well auf die 24-Well-Platte und 100 µl/Well auf den MTP. Die Zellplatten mit dem Eluat wurden dann für weitere 48 h im Brutschrank bei 0,5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Unter Einhaltung der genannten Inkubationszeiten erfolgte am 5. Tag eine Zellzählung mit Bestimmung der Zellmorphologie. Hierbei wurden die Zellen aus den vorgegebenen Wells nach Waschen mit 500 µl PBS wiederum mit Hilfe von 500 µl Trypsin/EDTA abgelöst und pro Well in eine sterile Eppendorfcup zusammen mit 500 µl DMEM-Vollmedium pipettiert. Anschließend erfolgte für 5 min eine Zentrifugation mit 2000 rpm in der Eppizentrifuge, um ein Zellpellet zu gewinnen. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde dieses mit 500 µl Medium resuspendiert und etwa 15 µl dieser Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Neben der genauen Anzahl der Zellen wurde hierbei zusätzlich auf ihre Morphologie geachtet. Außerdem erfolgte eine Lyse der Zellen, in den dafür vorgesehenen Wellplatten, die für die Proteingehaltsbestimmungen nötig ist. Dazu wurde der Cell-Lysis Buffer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nun wurde das Medium der Zell-

wells abpipettiert und diese dreimal mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin/EDTA pro Well abgelöst und mit 500 µl PBS/Well in Eppendorfcups gefüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugation in einer Epizentrifuge mit 2000 rpm bei Raumtemperatur wurde der entstandene Überstand abgesaugt und die verbliebenen Zellen mit 300 µl Lysisbuffer resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Kühlung der Eppendorfcups auf Eis für 10 min sowie eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 0 – 4 °C. Das entstandene Lysat bildete nun die Grundlage für die folgenden Messungen mittels BioRad-Assay bzw. CellTiterGlo®-Assay.

2.7.1 Proteinbestimmung mit dem DC Protein Assay

Zu Beginn musste hier eine Verdünnungsreihe für die Standardkurve der Proteinbestimmungen hergestellt werden. Dabei wurde der Protein BSA-Standard 1,43 mg/ml H₂O aus dem DC Protein Assay von BioRad verwendet, der als sog. Stammlösung fungiert. Von dieser Stammlösung wurde nun eine Verdünnungsreihe (1000 µg/ml → 800 µg/ml → 600 µg/ml → 400 µg/ml → 200 µg/ml → 100 µg/ml → 50 µg/ml → 0 µg/ml) erstellt und je 5 µl auf eine MTP aufgetragen. Daneben wurden in Doppelbestimmungen ebenfalls 5 µl der oben aufgeführten jeweiligen Lysate pipettiert. Es erfolgte nun die Zugabe von 25 µl Reagenz A` pro Well, entstanden aus 20 µl Reagenz S pro ml Reagenz A, sowie von 20 µl Reagenz B pro Well. Nach Ablauf von 15 min wurde diese MTP nun im Elisa-Reader ausgewertet.

Zusammengefasst bildete der DC Protein Assay eine kalorimetrische Nachweismethode für Proteinkonzentrationen. Der Reaktionsmechanismus war dabei ähnlich dem von Lowry et al. beschriebenen, also eine Reaktion von Protein mit Alkalin-Kupfer-Tartrat-Lösung und einem Folin Reagenz [91].

2.7.2 Proliferationsmessung mittels CellTiterGlo®

Hierfür wurden die vorher beschriebenen beiden MTP, die die Zellen mit dem entsprechenden Eluat enthalten, benötigt.

Pro Well wurden, nachdem die Zellen etwa 10 min auf Raumtemperatur zurückgeführt worden waren, 100 µl Cell Titer Glo Substrat von Promega #7571 aufgetragen. Es folgte direkt im Anschluss die Auswertung der Ergebnisse im Infinite® M200-Luminometer von Tecan. Mit Hilfe dieses Assays gelingt die Bestimmung metabolisch aktiver Zellen. Mittels einer Luciferase-Reaktion wurde dabei der ATP-Gehalt des entsprechenden Wells bestimmt, um so indirekt auf die Zellanzahl schließen zu können, da diese proportional zum entsprechenden ATP-Gehalt ist [92].

2.8 Kollagenaseexpositionsvoruch

Hauptfaktor für ein langfristiges Überleben eines Konstrukts aus KF in vivo bildet neben dem immunogenen Potential besonders die Stabilität des Konstrukts gegenüber dem Einfluss von Abbauenzymen. Im Kniegelenk sind dies vornehmlich Kollagenase I und II, die als Enzyme innerhalb der Synovialflüssigkeit dauerhaft vorhanden sind [4, 93, 94]. Bei frischen Kreuzbandrissen sowie nach ACL-Rekonstruktion kommt es daher frühzeitig zu einer ligamentösen Degeneration des verletzten Kollagengewebes.

Erstmals beschrieben wurde diese Entität bereits 1983 von Warren [95], der aufzeigen konnte, dass ein rupturiertes ACL bereits nach 6 Wochen fast gänzlich abgebaut sein kann. Als Grund führten D. Amiel et al. [96] den starken Anstieg der Kollagenaseaktivität an. Diese in einem Kaninchenmodell experimentell entdeckte Zunahme der Kollagenaseaktivität, konnte in einer Reihe von Folgestudien auch in der menschlichen Synovia nachgewiesen werden [97–99]. Dabei gelten die Kollagenaseenzyme MMP 3 (Koll II), MMP 1 (Koll I) sowie MMP 13 als Hauptinitiatoren der Ligamentdegradation.

Daneben spielt dieser Effekt auch im Zuge der Auto- bzw. Allografteinheilung nach ACL-Ersatz eine nicht unerhebliche Rolle [100, 101]. Deshalb sind neben den biomechanischen Eigenschaften der gecrosslinkten KF und den sich daraus ergebenden Vor- bzw. Nachteilen einzelner Crosslinker, auch ihre Resistenz gegenüber synovialen Kollagenaseenzymen Gegenstand dieser Arbeit.

Um die Widerstandsfähigkeit der KF bzw. Minikonstrukte gegenüber den beiden Kollagenasen in vitro jedoch abbilden zu können, wurden Minikonstrukte bzw.

einzelne KF, die vorher mit den oben genannten Crosslinkingsubstanzen behandelt und γ -sterilisiert wurden, verschiedenen Konzentrationen einer Lösung aus beiden Kollagenasen ausgesetzt. Als Ausgangssubstanz diente dabei ein Kollagenasesubstrat der Fa. Worthington mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$. Es wurden vier Ansätze zu je 10 ml erstellt, wobei der erste die Kollagenasen in einer Konzentration von 200 ng/ml, der zweite von 20 ng/ml, der dritte von 2 ng/ml und der letzte von 200 $\mu\text{g/ml}$ enthielt. Dabei wurde PBS⁻ als Verdünnungsmittel der Ausgangssubstanz eingesetzt. Die einzelnen Konstrukte bzw. KF wurden anschließend mit eben diesen vier Ansätzen der Kollagenasen versetzt und für zehn Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte eine biomechanische Messung an der „Zwick“, unter Ermittlung der in Kapitel 2.7. genannten relevanten Variablen, um einen Vergleich der Crosslinkingsubstanzen untereinander, sowie zu nativen KF zu ermöglichen.

2.9 Der Tierversuch

2.9.1 OP-Technik des Tierversuchs

Grundlage für ein gutes Operationsergebnis bildete eine biomechanisch korrekte Platzierung des ACL-Konstruktes im Tier.

Für diese Studie wurde ein Minipigmodell verwendet. Dies erscheint legitim, da einerseits große Tiere untersucht werden müssen, um einen Vergleich mit dem Menschen zu ermöglichen und andererseits Schweine sich in ihrer ACL-Konfiguration im Gegensatz zu Schafen oder Ziegen nur in der Größe und Krafrichtung im PL-Bündel vom Menschen unterscheiden. Mehrere Autoren sehen Schweine deshalb als präferiertes Tiermodell [102–104].

Aufgrund der anatomischen Verhältnisse wurde ein offener Zugangsweg gewählt. Um dabei eine gewisse Komparabilität und Reliabilität der Studie zu gewährleisten, erfolgte der Kreuzbandersatz bei jedem Tier am rechten Hinterlauf. Die Wahl eines geeigneten tibialen bzw. femoralen Ansatzpunktes fußte auf einer möglichst isometrischen Implantation des neuen Konstruktes. Isometrisch waren in diesem Zusammenhang die Punkte, die bei Flexions-Extensions-Bewegungen des Kniegelenks nur zu geringen Längenänderungen des Transplantats führten.

Somit können die Kräfte im Bandersatz minimal und dessen Lebensdauer maximal gehalten werden [10]. Allerdings gestaltete sich die Identifizierung dieser Punkte als relativ schwierig, da das Transplantat im Gegensatz zum nativen ACL differente materielle und geometrische Eigenschaften aufwies.

Alle chirurgischen Schritte unterstanden dabei der Qualitätssicherung durch die ansässigen Orthopäden und wurden von diesen auch durchgeführt.

Für den Versuch wurden 16 Minipigs mit einem Gewicht zwischen 30 und 50 kg und einem Alter von 2,5 bis 3,5 Jahren verwendet. Diese wurden von einer Tierärztin mit 4 mg/kg Azaperon intravenös über die Ohrvene sediert und mit 5,5 - 6 mg/kg Thiopental und 15 mg/kg Ketamin anästhesiert. Nach laryngealer Intubation mittels Endotrachealtubus der Größe 7,5, wurden die Tiere zur Aufrechterhaltung der Narkose im Verlauf der OP über ein externes Beatmungsgerät mit einem Isoflurangemisch (2,1 %, Fa. Forene®, Abott GmbH, Wiesbaden, D) beatmet. Eine zusätzliche Analgesie wurde bolusweise mit Fentanyl 0,005 mg/kg bei Bedarf verabreicht.

Nach der Rasur und gründlicher Desinfektion der Haut über dem Kniegelenk, erfolgte der Zugang zum Gelenk durch einen etwa 10 cm langen medial der Patella durchgeführten Hautlängsschnitt. Über diesen Zugangsweg und unter konsequenter Blutstillung, wurde die Schichtpräparation des Kniegelenks durchgeführt. Nach der Darstellung der Kapsel wurde diese durch einen Längsschnitt eröffnet und die Patella nach lateral subluxiert. Zudem erfolgte eine Probeentnahme von Synovialflüssigkeit. Im weiteren Verlauf wurde der Hoffa-Fettkörper teilreseziert und das ACL, unter Schonung von Gelenkkapsel und anderen Kniebinnenstrukturen, unter Sicht ansatznah abgesetzt und entfernt. Nach Identifizierung der geeigneten tibialen und femoralen Ansatzpunkte wurden die Bohrungen der Kanäle für das Transplantat durchgeführt. Nach Vorbohren mit einem Kirschnerdraht zur genauen Beurteilung des Sitzes des neuen Transplantates erfolgte die femorale und tibiale Bohrung mit einem Durchmesser von ca. 4,5 mm (Bohrer der Fa. Arthrex®). Femoral ergaben sich dadurch Bohrkanallängen zwischen 16 und 27 mm, tibial schwankten die Bohrkanallängen zwischen 20 und 28 mm, wobei meist Längen um 22 mm erreicht wurden. Der Winkel der Bohrung zur jeweiligen Schaftachse betrug dabei etwa 20 Grad. Anschließend wurden die Implantate

den sterilen Flacons entnommen und mit Surgical Loops der Fa. Braun, sowie mit Suturebuttons der Fa. Arthrex® versehen. Danach wurde das Ersatzband femoral eingezogen und nach distal gespannt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich das Konstrukt 1 cm im Bohrkanal befindet und sich der femoral befestigte Suturebutton sicher zur Verankerung umklappt. Abschließend erfolgte die tibiale Sicherung des Konstrukts ebenfalls mittels Suturebutton bei etwa 20-30-gradiger Flexion des Kniegelenks. Nach Prüfung des korrekten Sitzes und Spannung des Konstrukts wurde die Wunde schichtenweise geschlossen und die Wundränder oberflächlich mit Hilfe von Stahlklammern (Fa. B. Braun, Melsungen) adaptiert. Zur postoperativen Analgesie wurden für mindestens drei Tage 0,005 – 0,01 mg/kg Buprenorphin und Metamizol (0,4 mg/kg i.v./s.c.) verabreicht. Um die postoperative Wundinfektion so weit wie möglich zu reduzieren, erfolgte zusätzlich eine dreimalige intravenöse Antibiotikagabe von Penicillin (VETOQUINOL AG, Ittingen, Schweiz). Bereits direkt nach der Operation durften die Tiere das operierte Knie voll belasten.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde die Hälfte der Tiere nach 6 Wochen, der Rest nach 6 Monaten untersucht. Die Kniegelenke der Hinterläufe wurden dafür entnommen und im Labor bis auf das ACL freipräpariert. Dabei diente das Kniegelenk der nicht operierten Seite als Referenzwert für die biomechanischen Messungen des operierten Kniegelenks.

2.9.2 Histologische Aufarbeitung

2.9.2.1 Fixierung, Einbettung und Färben der Proben

Die histologische Untersuchung eines der transplantierten Implantate wurde durch das Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Zur Fixierung wurde dieses in eine 4%ige Paraformaldehydlösung eingelegt und im Anschluss nach einem standardisierten Entwässerungsprotokoll (s. Anhang) entwässert. Danach erfolgte die Paraffineinbettung (Paraplast Plus®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA) unter Verwendung eines Paraffintanks (Leica EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) und einer entsprechenden Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems

Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Aus den gefertigten Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf silanisierte Adhäsionsobjektträger (HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co KG Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen wurden.

Für die histologische Auswertung mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurden Färbungen hergestellt, die unterschiedliche Gewebestrukturen hervorheben können. So wurden eine HE-Färbung, eine Trichromfärbung nach Masson Goldner, eine Pentachrom-, eine Azan- sowie eine van-Gieson-Färbung angefertigt. Die ausführlichen Färbeprotokolle sind im Anhang nachzulesen. Anschließend wurden die gefärbten Präparate mit Vitro-Clud® (Vitro-Clud® Einschlussmittel für die mikroskopische Technik, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) und Deckgläsern (Menzel Gläser, Deutschland) eingedeckt. Die HE-Färbung diente dabei als Übersichtsfärbung. Hier sind Zellkerne und saure Mucosa blau, alles Weitere ist rot. In der Masson-Goldner-Trichromfärbung stellen sich Zellkerne schwarz, Zytoplasma ziegelrot, Erythrozyten orangegelb, Bindegewebe und saure Mucossubstanzen grün und Osteoid rot dar. Diese Färbung ist daher besonders gut geeignet zur Darstellung von Bindegeweben.

Mit der Azan-Färbung färben sich Zellkerne (Chromatin) und das Zytoplasma rot, sowie Kollagen- und retikuläre Fasern dunkelblau. Sie gilt ebenfalls als Übersichtsfärbung.

Bei der van-Gieson-Färbung stellen sich die Zellkerne schwarzbraun und das Cytoplasma gelb bis hellbraun dar. Durch die Gegenfärbung mit Pikrinsäure-Säurefuchsin werden elastische Fasern und Muskelgewebe gelb und KF rot angefärbt.

In der Movat's Pentachromfärbung wirken mineralisierter Knochen und Kollagen leuchtend gelb, mineralisierter Knorpel blaugrün, Knorpel dunkelrot, elastische Fasern rot, Zellkerne blauschwarz, Zytoplasma rötlich und saure Glucosaminoglykane leuchtend hellblau. Diese Färbung wurde angefertigt, um Knorpel und Kollagen wie es z.B. am Bandansatz vorkommt zu beurteilen.

2.9.2.2 Deskriptive Aufarbeitung in der Durchlichtmikroskopie

Die gefärbten Präparate wurden an einem Mikroskop mit 1,6-, 2,5-, 5-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung beurteilt und mit einer Axio Cam am Mikroskop fotografiert.

Die HE- und Azan-Färbung dienten dabei der Übersicht und Vergleichbarkeit. Die Masson Goldner Trichrom-Färbung wurde zur Beurteilung der Zelldifferenzierung und der Umbauvorgänge am Transplantat in Bezug auf Zelleinwanderung, Nekrosen und Infiltrationen herangezogen. Die Movat Pentachrom-Färbung war besonders bei der Darstellung der Bandinsertion, der Knorpelzellen und der Mineralisationsfronten hilfreich. Aufgrund nicht abgrenzbarer Knochengrenzen war eine dezidierte Beurteilung dieser jedoch nicht möglich.

2.10 Lösungen und Medikamente

- Agarose (840004, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D)
- Atropin (B. Braun AG, Melsungen, D)
- Azaperon (Jansen GmbH, Neuss, D)
- BSA-Standard 1,43 mg/ml in H₂O aus DC Protein Assay von BioRad #500-0112
- Buprenorphin (Richett-Benckiser, UK)
- Cell Lysis Buffer (#9803 von Cell Signaling (über New England Biolabs), 1:10 verdünnt
- Cellcounter
- CellTiterGlo® Kit (Promega #7571, Madison, USA)
- Collagenase (NB 4 Standard Grade, 17545, Sigma, Steinheim, D)
- Crosslinkersubstanzen
- DC Protein Assay #500-0112 (BioRad, München, D)
- Desderman® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D)
- DMEM (500 ml DMEM high Glucose #E15-009, 5 ml Pen/strep 100x #P11-010, 10 ml L-Glutamin #M11-004, 50 ml FCS #A15-101 (alles v. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
- DMSO für die Zellkultur (Appllichem #A3672.0250, über Fa. Hartenstein,

Würzburg, D)

- EDC/NHS (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerthe, D)
- Essigsäure (6755.2, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, D)
- Ethanol 70 % (9065.2, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, D)
- Fentanyl® (Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, D)
- Formalin (A0823, 2500, Appli Chem, Darmstadt, D)
- Genipin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Glukose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hämatoxylin-Lösung (4302, Merck, Darmstadt, D)
- Hexamethylen-diisocyanat (Fluka, Buchs, CH)
- Isofluran® (Forene® Abott GmbH, Wiesbaden, D)
- Ketamin (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D)
- Medium (L11, PAA Cell culture company, Pasching, A)
- Mercaptoethanol (1.15433, Merck, Darmstadt, D)
- Metacam (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Ingelheim, D)
- NaCl (Merck 6404, F. Merck, Darmstadt, D)
- NaCl 0,9 % steril und unsteril (Delta Select GmbH, Pfullingen, D)
- Paraformaldehyd 4 %
- PBS Dulbecco Instamed Pulver, pH 7,2 (CHROMA, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, D)
- PBS steril und unsteril (Zusammensetzung 10 l PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,5 g Na₂HPO₄, 2g KH₂PO₄)
- Penicillin (Vetoquinol AG, Ittingen, CH)
- Pepsin (S3002, 2 g/250 ml 0,2M HCL, DAKO, Glostrup, Dk)
- Polyethylenglykol (Fluka, Buchs, CH)
- Ringer-Lactat Lösung (B. Braun, AG, Melsungen, D)
- Thiopental (Nycomed Deutschland GmbH, D)
- Tris (A 1086, 5000, Appli Chem, Darmstadt, D)
- Trypsin (Immunhistochemie, S2012, 250µg/ml, DAKO, Glostrup, Dk)
- Trypsin/EDTA #L11-004 v. PAA
- Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin/l, 0,2g EDTA/l, L11-004, PAA, Linz, A)

- Xylol (1.08685.2500, Merck, Darmstadt, D)
- Zählkammer (Neubauer Improved Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D)
- Zellen L929 CC1 Maus-Fibroblasten (LGC Standards GmbH, Wesel, D)

Alle weiteren verwendeten Standardlaborchemikalien stammten von den Firmen Roth GmbH und Co (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

2.11 Verwendete Geräte

- 24-Well-Platte (Greiner Bio One Cellstar #662160)
- Abdecktuch rechteckig
- Adhäsionsobjektträger (HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D)
- Aluschale mit Tupfer
- Analysenwaage Kern EW
- Arterienklemme
- Assay Cell Titer (96 Aqueous, Non Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Mannheim, D)
- Autoklav Varioklav (Varioklav, HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, D)
- Becherglas (Hartenstein, Würzburg, D)
- Bohrer kanüliert (0.3, 3.5, 4.0, 4.5) Set (Arthrex®)
- Bohrer steril
- Brutschrank (Hera Cell)
- Brutschrank (Heraeus, Osterode, D)
- Combitip plus (von Eppendorf; 5 ml, 1 = 10 µl #0030069.455; 10 ml, 1 = 200 µl #0030069.269, Hamburg, D)
- Deckgläser (Menzel Gläser, D)
- Durchlichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss)
- Elektrokauter
- Elisareader SUNRISE (Tecan mit Magellan-Software, Männedorf, CH)
- Endotrachealtubus 7,5 (Ruesch Care, Teleflex Medical GmbH, Kernen, D)

- Entwässerungsautomat (TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D)
- Eppendorfgefäße (Greiner Bio One #616201, Frickenhausen, D)
- Eppizentrifuge (Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products International. Hanau, D)
- Filterhalter (25 mm, steril, Fa. Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, D. Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH Würzburg/Fa. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)
- Fixiergitter (Tissue Tek III, Miles Limites, Slough; UK)
- Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT
- Fotoschale aus Kunststoff
- Gewichte (200 g, 500 g, 600 g)
- Glasflasche 100 ml (Fa. Schott GmbH, Mainz, D)
- Glaspipetten 10 ml
- Graftmaster® (Arthrex®, Karlsfeld, D)
- Haken (Aesculap, B. Braun Melsungen AG, D)
- Hartschnittmikrotom (Leica GmbH, Bensheim, D)
- Heraeus Multifuge X1R Centrifuge (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- Infinite M200 (Tecan, Programm i-control)
- Inkubator für Zell- und Gewebekulturen (BB6060, Heraeus, Hanau, D)
- Kanüle 2 mm
- Kirschnerdraht mit Öse 15 mm (Arthrex®, Karlsfeld, D)
- Kisolfolie (MDS GmbH, Buseck, D)
- Knochennadel
- Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Nussloch, D)
- Kulturplatten (anti-haft beschichtete Plates) (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, D)
- Längenmessgerät (Arthrex® Karlsfeld, D)
- Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena, D)
- Lineal (Hartenstein, Würzburg, D)

- Lochplatte mit Durchmesserangabe
- Löffel scharf
- Manipler® (Braun, Melsungen, D)
- Materialprüfmaschine Z010® (Zwick Roell AG, Ulm, D)
- Membranfilter (0,22 µm, 0,45 µm, 25 mm; Nylon Fa. Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, D)
- Mikroskopkamera (Axio Cam MRC 5, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D)
- Mikrotiterplatte TTP (Greiner Bio One #92096, Frickenhausen, D)
- Mikrotiterplatten (Greiner Bio One mit weißen Wänden #655098)
- Mikrotom (Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D)
- Mullkompressen (Braun Melsungen)
- Multipette (Eppendorf, Hamburg, D)
- Nadelhalter (Braun, Melsungen, D)
- Objektträger (Marienfeld, Laboratory Glassware, D)
- OP-Faden EthibondR (3/0) (Johnson & Johnson, Norderstedt, D)
- OP-Faden Vicryl® (1.0) (Johnson & Johnson, Norderstedt, D)
- OP-Tape (Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath, D)
- Paraffintank (Leica EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D)
- Petrischale (Kunststoff 94/16 Greiner Bio One #632180)
- Pinzette anatomisch
- Pinzette chirurgisch
- Pinzette spitz
- Pipettenspitzen blau (Greiner Bio One Ultratip #686290)
- Pipettenspitzen gelb (Greiner Bio One Ultratip #685290)
- Pipettierhilfe (Accujet, Braun, Melsungen, D)
- Pipettierhilfe Accu-Jet (Fa. Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D)
- Plastikstab 1 cm
- Polyethylen Green® 3 mm, (Johnson & Johnson, Norderstedt, D)
- Präparierschere

- Rattenschwänze (Charles River, Sulzfeld, D)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml) (Eppendorf, Hamburg, D)
- Schlauchüberzüge steril (Molnlycke Health Care, Ekrath, D)
- Schlitztuch (Cardinal Health, Tuttlingen, D)
- Schüttler (Edmund Bühler TH 15)
- Seralon® OP-Faden (Serag-Wiessner, Nailla, D)
- Sicherheitswerkbank Klasse II (HS 15, Heraeus, Osterode, D)
- Sigma T 1503 (Sigma ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, D)
- Skalpellgriff (Hartenstein, Würzburg, D)
- Skalpellklinge (Hartenstein, Würzburg, D)
- Spritzenhülle 1 ml
- Sprühpflaster (Beiersdorf AG, Hamburg, D)
- Sterilbank (Sterilbank Heraeus Hera Safe oder Lamin Air)
- Suture Button® 3,5 mm (Arthrex®, Karlsfeld, D)
- Tischzentrifuge (Labo fuge 440 R, Heraeus, Osterode, D)
- Tube 50 ml, Röhrchen (Greiner Bio One #227261, Frickenhausen, D)
- Vekaplan KT Plättchen
- Vitro-Clud® (Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, D)
- Vortex (Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, D)
- Waage I (EW 6000-1M, Kern und Sohn GmbH, Allstadt, D)
- Waage II (Scaltec SPOS, max 310 g, Scaltec Instruments, Heiligenstadt,)
- Waage III (Kern 770, max 220 g, Kern und Sohn GmbH, Allstadt, D)
- Wärmeschrank (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG., Wehrheim, D)
- Zellkulturflaschen (150 cm², Greiner BIO ONE GmbH, Frickenhausen, D)
- Zentrifuge (biofuge pico, Heraeus, Hanau, D)
- Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml, Sarstedt, Nürnberg, D)
- Zwick ProLine mit 1 kN Maximalkraft (Zwick Roell, Ulm, D)

3 Ergebnisse

3.1 Biomechanische Ergebnisse der Einzel-Kollagenfaser

Die aus den Rattenschwänzen gewonnenen nativen Kollagenfasern (KF) wurden mittels unterschiedlicher Substanzen (0,5 % Genipin, Glukose, 10 % HMDI) gecrosslinkt. Anschließend erfolgte eine Gammabestrahlung bei 25 kGy zur Sterilisation. Die einzelnen Fasern wurden daraufhin einer biomechanischen Testung an der „Zwick“ unterzogen. Dabei zeigten die nativen KF (n = 37) im Mittel Kraftwerte von $6,5 \pm 3,3$ N, wobei als Maximum Werte bis zu 12,3 N ermittelt werden konnten. Fasern, die zuvor mit Glukose gecrosslinkt wurden (n = 45), erreichten Werte von $9,3 \pm 3,1$ N. Mit Hilfe von 10 % HMDI (n = 25), konnte der durchschnittliche Kraftwert einer KF auf $11,9 \pm 2,5$ N gesteigert werden. Die höchsten Kraftwerte allerdings konnten die Fasern erzielen, die zuvor mit 0,5 % Genipin (n = 61) behandelt wurden. Hier ließ sich ein durchschnittlicher Wert von $13,4 \pm 3,7$ N ermitteln. Zudem wurde ein Maximum von 24,7 N über alle KF erreicht.

Der folgende Boxplot stellt die gemessenen Werte anschaulich dar und lässt einen groben Vergleich der einzelnen Substanzen erkennen (s. Abb. 14).

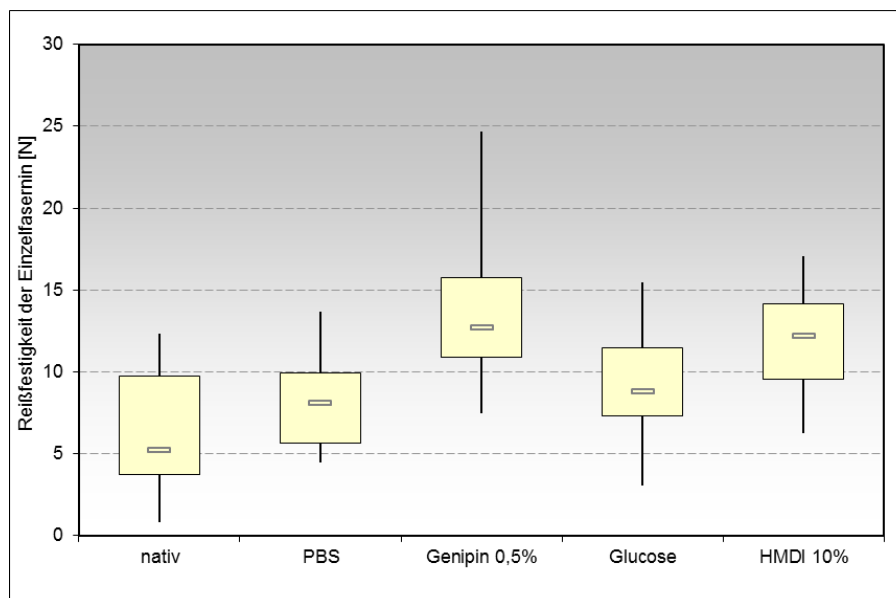


Abb. 14: Boxplot der max. Reißfestigkeit von Einzelfasern nach Crosslinkingsubstanz in N.

Um die Unterschiede auch statistisch bewerten zu können, wurde zu Beginn eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Hier wurde ein kritischer

F-Wert von 2,42 ermittelt, der deutlich unter dem gemessenen F-Wert von etwa 31,3 lag. Somit musste ein signifikanter Unterschied innerhalb der Varianzen der einzelnen Prüfgrößen bzw. zwischen den Crosslinkern vorliegen.

Um dieses Ergebnis weiter aufarbeiten und spezifizieren zu können, wurden mehrere zweiseitige t-Tests vorgenommen. Dabei ließ sich für jeden der drei Crosslinker Glukose, 10 % HMDI und 0,5 % Genipin ein hochsignifikanter Unterschied zur nativen Kollagenfaser nachweisen (s. Abb. 13).

Tabelle 1: Vergleichstabelle der Crosslinker anhand von t-Tests (HS: hochsignifikant, S: signifikant).

| Crosslinker | nativ | Glucose | 10 % HMDI | 0,5 % Genipin |
|--------------------|-------|---------|-----------|---------------|
| nativ | - | HS | HS | HS |
| Glucose | HS | - | HS | HS |
| 10 % HMDI | HS | HS | - | S |
| 0,5 % Genipin | HS | HS | S | - |

Untereinander wurden ebenfalls t-Tests durchgeführt, um die Unterschiede der diversen Crosslinker statistisch ausreichend verarbeiten zu können. Zwischen 0,5 % Genipin und Glukose-gecrosslinkten Fasern konnte ein p-value von $1,41 \cdot 10^{-8}$ errechnet werden. Dies belegt den hoch signifikanten Vorteil von Genipin auf die Kraftwerte einer KF im Vergleich zu Glukose.

Auch zwischen Genipin und 10 % HMDI war ein signifikanter p-value von 0,03 zu erheben. Dies spricht ebenfalls für eine Überlegenheit von Genipin gegenüber 10 % HMDI, zumindest auf Niveau einer Einzelkollagenfaser.

3.2 Biomechanik der Minikonstrukte

Um Grenzen der Stabilität bzw. der Bänderigenschaften eines Kollagenfaserkonstrukts besser abbilden zu können, wurden in einem nächsten Schritt sog. Minikonstrukte angefertigt. Diese besaßen eine definierte Länge von 3,0 cm und einen Durchmesser von 2,0 bis 2,5 mm.

Auch hier war die Zielvorgabe, einen möglichst guten Vergleich der Crosslinkerkonstrukte untereinander sowie zum nativen Konstrukt herzustellen.

Für das Konstrukt aus nativen, γ -sterilisierten Kollagenfasern ergaben sich Werte um $43,8 \pm 10,3$ N, wobei diese zwischen den Extremen 64,3 N und 29,5 N schwankten. Insgesamt wurden für die nativen Fasern 16 Minikonstrukte untersucht.

Ein Crosslinker, der hier zuerst zum Vergleich herangezogen wurde, war EDC/NHS, ein sog. „zero-length-crosslinker“, der somit nicht Teil der entstehenden Crosslinks innerhalb der KF wurde. Bei 19 untersuchten Konstrukten wurden im Mittel Werte von $43,3 \pm 8,8$ N gemessen. Der Vergleich der Mittelwerte bzw. der dargestellte Boxplot (s. Abb. 15) zeigen hier kraftmäßig keinen Zugewinn zum Konstrukt aus unbehandelten KF. Dies wurde auch durch den durchgeführten t-Test mit einem p-value von 0,90 belegt, der deutlich über dem Signifikanzniveau von 5 % liegt.

Im Gegensatz dazu ließ sich bei den 20 Konstrukten aus Glukose-behandelten KF jedoch ein deutlicher Zugewinn an Reißfestigkeit erzielen. Im Mittel lagen die Werte bei $108,1 \pm 16,1$ N, also fast 2,5-fach höher als bei den Konstrukten aus nativen KF. Der Maximalwert von 158,7 N war sogar viermal so hoch wie der Kraftwert der unbehandelten Konstrukte. Dieser Unterschied spiegelte sich auch im t-Test mit einem p-value von $1,9 \cdot 10^{-15}$ wieder. Zusätzlich wurden analog 20 Konstrukte untersucht, deren KF mit 10 % HMDI behandelt wurden. Hier ließen sich die höchsten Kraftwerte aller untersuchten Minikonstrukte nachweisen. Durchschnittlich erzielte ein HMDI-Konstrukt Werte von $177,5 \pm 28,0$ N mit einem Maximalwert von 242,8 N. Dies entspricht fast dem 6-fachen Kraftwert eines durchschnittlichen Nativkonstrukts und stellte somit den absoluten Spitzenwert in dieser Untersuchung dar. Allerdings war die ermittelte Standardabweichung mit 28,0 N die höchste, die in dieser Versuchsreihe gemessen werden konnte, was

eine Standardisierung bzw. Vorhersagbarkeit der Kraftwerte hätte verhindern und somit die Reliabilität einer möglichen Versuchsreihe hätte schmälern können. Die signifikant reißfestesten Fasern des im Vorfeld durchgeführten Einzelkollagenfaservergleichs waren diejenigen, die zuvor mit 0,5 % Genipin behandelt wurden. Auch hier wurden 20 Minikonstrukte untersucht. Der Mittelwert lag mit $111,4 \pm 15,8$ N etwa im Bereich der Glukose-Konstrukte und somit deutlich über dem Mittelwert der nativen Konstrukte. Allerdings war das Minimum im Vergleich zu den Glukose-behandelten Konstrukten dezent höher und wies mit fast 90 N noch etwa den doppelten Kraftwert eines Nativkonstrukts auf. Der p-value lag mit $2,46 \cdot 10^{-16}$ im hochsignifikanten Bereich, so dass auch die Genipin-Minikonstrukte deutlich reißfester waren als die Konstrukte aus unbehandelten KF. Die ermittelten Kraftwerte sind zur besseren Anschaulichkeit anhand eines Boxplots in Abb. 15 gegenübergestellt.

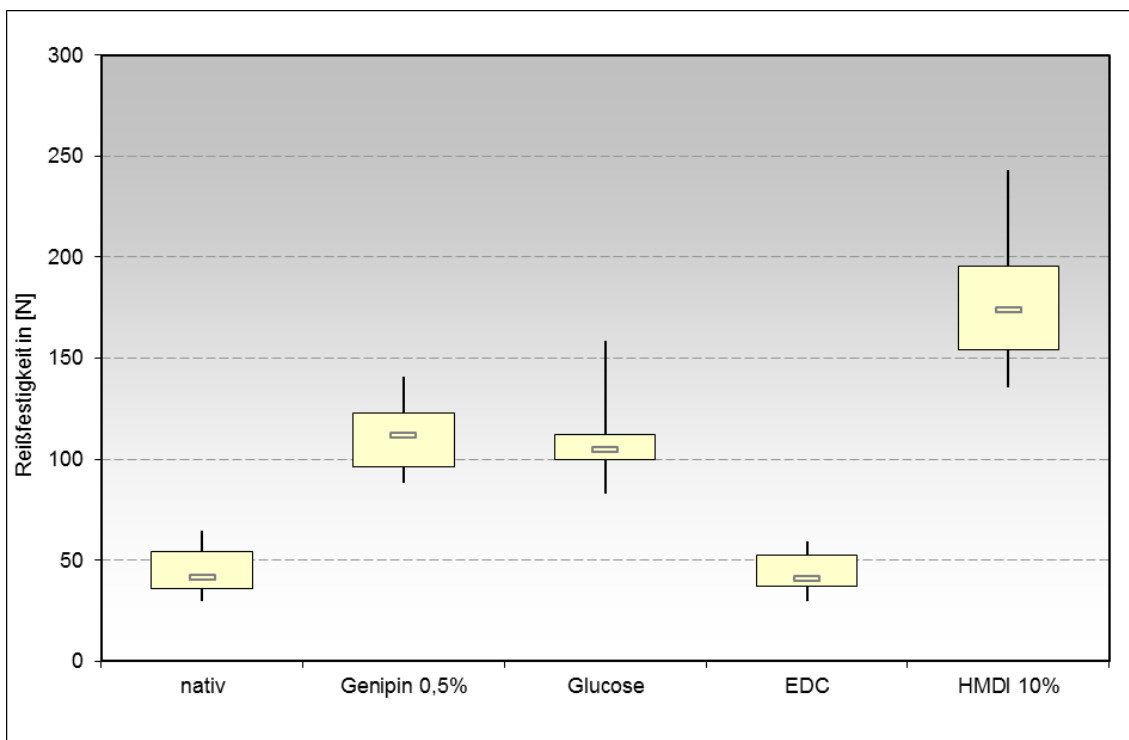


Abb. 15: Boxplot der max. Reißfestigkeit der Minikonstrukte nach Crosslinker in N.

3.3 Elastizitätsmodul und Steifigkeit

Neben der Reißfestigkeit, die im Grunde der maximalen Kraft entspricht, die ein Band aushalten kann, spielt das sog. Elastizitätsmodul bei der Stabilität bzw. Beschreibung von Bändern eine große Rolle. Da dieses allerdings abhängig von der Querschnittsfläche eines Materials ist und diese in der Minikonstruktversuchsreihe nur mit großem Fehler zu bestimmen war, wurde als Ausgleich die Steifigkeit ermittelt. Diese ist definiert als die Kraftänderung pro Längenänderung eines Materials und entspricht somit der Steigung im linearen Teil des Kraft-Dehnungsdiagramms. Die Steifigkeit wurde für jedes Konstrukt mit Hilfe einer Trendgerade im o.g. Diagramm ermittelt und die Mittelwerte in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2: Vergleich der mittleren Steifigkeit eines Minikonstrukts in N/mm.

| | nativ | Glukose | HMDI 10 % | Genipin 0,5 % | EDC/NHS |
|--------------------|------------|------------|------------|---------------|-------------|
| Steifigkeit (N/mm) | 10,8 ± 2,6 | 18,7 ± 3,5 | 22,6 ± 3,1 | 20,5 ± 2,1 | 10,11 ± 2,2 |

Wie schon bei den Kraftwerten der unterschiedlich behandelten Minikonstrukte, ließ sich auch in der Steifigkeit durch die Zugabe der Crosslinker Glukose, 0,5 % Genipin oder 10 % HMDI eine hoch signifikante Zunahme der Reißfestigkeit erkennen. Der höchste Wert mit 26,4 N/mm wurde, ebenso wie bei der Kraftuntersuchung, von HMDI-Konstrukten erzielt. Allerdings besitzen diese auch die höchste Verteilungsbreite, während die Genipinkonstrukte die höchste interne Homogenität aufweisen. EDC/NHS konnte hier, ähnlich wie bei den Reißfestigkeitsuntersuchungen, keine zusätzliche Optimierung einer nativen Kollagenfaser erwirken.

3.4. Vergleich der Crosslinker Glukose, 0,5 % Genipin, 10 % HMDI

Wie aus den oben dargestellten Ergebnissen zu ersehen ist, erreichten nur die Crosslinker Glukose, 10 % HMDI sowie 0,5 % Genipin einen zusätzlichen Nutzen hinsichtlich der Optimierung von Kraft und Steifigkeit eines Kollagenkonstrukts. Im Folgenden sollen nun diese drei Crosslinker anhand ihrer spezifischen Eigenschaften miteinander verglichen werden. Grundlage dafür bilden zwei t-Tests und der aus ihnen hervorgehende p-value. Prüfgrößen waren nur die vorher erwähnte maximale Reißfestigkeit und die ermittelte Steifigkeit. Insgesamt ließen sich bei beiden Prüfgrößen mit 10 % HMDI als Crosslinker die höchsten Werte erzielen. Allerdings fiel die hohe Standardabweichung der Werte in beiden Fällen auf. 0,5 % Genipin lieferte hier bessere Ergebnisse.

Um die Unterschiede der drei Crosslinker statistisch aufarbeiten zu können, wurde für beide Prüfgrößen separat eine ANOVA durchgeführt. Diese zeigte einen hochsignifikanten Unterschied der drei Crosslinker, der im Folgenden anhand von t-tests und ihrer p-values genauer dargelegt werden soll.

So konnte zwischen 10 % HMDI und Glukose bzw. 0,5 % Genipin in Bezug auf ihre maximale Reißfestigkeit eine hochsignifikante Abweichung nachgewiesen werden. Die beiden letztgenannten unterscheiden sich untereinander bei einem p-value von 0,52 jedoch nicht statistisch signifikant.

Ähnlich verhielt es sich auch bei der Steifigkeit. Hier lieferte 10 % HMDI signifikant bessere Ergebnisse als Glukose bzw. 0,5 % Genipin. Allerdings war der p-value mit 0,02 im Vergleich zu Genipin deutlich höher als noch beim Reißfestigkeitsvergleich. Das spricht für ein dezentes Angleichen der Genipin-Konstrukte an die HMDI-Konstrukte.

Der Vergleich von Genipin und Glukose lieferte hinsichtlich der Steifigkeit beider Konstrukttypen neue Erkenntnisse. Der p-value von 0,07 im zweiseitigen t-Test ließ einen marginal signifikanten Unterschied zumindest in Bezug auf ihre Steifigkeit erkennen. Somit scheinen Genipin-Konstrukte trotz ähnlicher Reißfestigkeitsergebnisse den Glukose-Konstrukten leicht überlegen (s. Abb. 16).

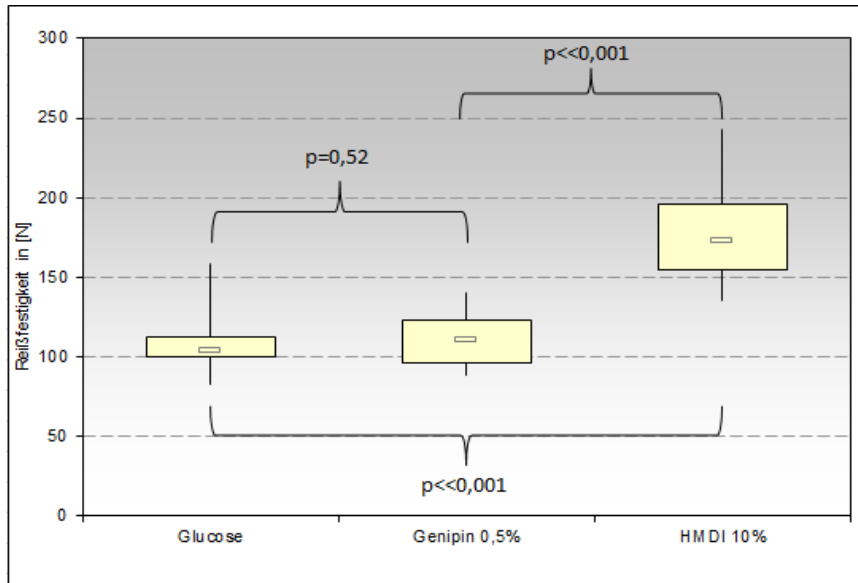


Abb. 16: Vergleichsgrafik der gecrosslinkten Minikonstrukte mit p-value.

Aus diesem Grund, sowie der statistisch geringeren Streuung der Mittelwerte und der besseren Datenlage im Vergleich zu 10 % HMDI in Bezug auf vergleichbare wissenschaftliche Arbeiten, bildeten Konstrukte aus 0,5 % Genipin die Grundlage für das anschließende Tierversuchsmodell.

3.5 Einfluss der Genipinkonzentration auf die Biomechanik

Da es sich bei Genipin um ein potentiell zytotoxisches Produkt handelt [105], wurde versucht, eine Genipinkonzentration zu finden, bei der minimale Zytotoxizität mit maximaler Reißfestigkeit einhergeht.

Hierzu wurde eine Genipin-Konzentrationsreihe angelegt mit 0,0625 %, 0,125 %, 0,3125 %, 0,5 % und 0,625 %. Jeweils 20 einzelne KF wurden mit diesen Konzentrationen versetzt, γ -sterilisiert und biomechanisch untersucht. Das Ergebnis veranschaulicht folgender Boxplot:

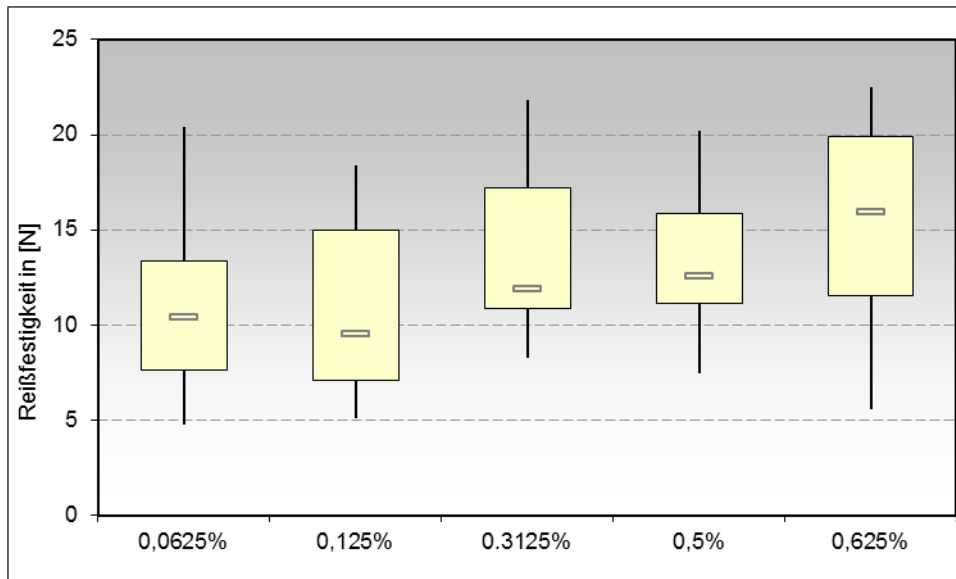


Abb. 17: Einfluss der Genipinkonzentration auf die max. Reißfestigkeit einer Einzelfaser.

Wie man aus dem Vergleich bei 0,0625 % und 0,625 % erkennen kann, stieg die Reißfestigkeit einer Einzelfaser bei zunehmender Genipinkonzentration an.

Während sich bei 0,0625 % noch Werte um $11,1\text{N} \pm 4,2\text{ N}$ ergaben, wurden bei 0,625 % bereits Werte um $15,7 \pm 4,8\text{ N}$ gemessen. Dies entspricht bei einer etwa 10-fachen Konzentrationssteigerung einer Reißfestigkeitszunahme von über 40 %. Allerdings lässt sich auch erkennen, dass sich dieser Verlauf keineswegs fortsetzt, da bei einer Konzentration von 0,5 % und einem Mittelwert von $13,5 \pm 3,4\text{ N}$ nur eine Reißfestigkeitszunahme von ca. 20 % zu verzeichnen war. Trotzdem ergab sich im t-test ein signifikanter Unterschied von 0,0625 % bis 0,5 % in Bezug auf die Reißfestigkeit ($p \leq 0,05$).

Die max. Kraftleistungen der Konzentrationswerte 0,3125 %, 0,5 % und 0,625 % überschneiden sich annähernd, wie im Boxplot ersichtlich. Daher war von keinem signifikanten Unterschied auszugehen. Diese Aussage ließ sich mittels einer ein-faktoriellen Varianzanalyse bekräftigen, die einen F-Wert von etwa 1,65 bei einem kritischen F-Wert von ca. 3,16, sowie einen p-value von 0,20 lieferte. Hinsichtlich der Reißfestigkeit der drei Genipinkonzentrationen ist daher von einem nicht signifikanten Unterschied auszugehen.

3.6 Ergebnisse der Biokompatibilitätsmessungen

Neben den biomechanischen Eigenschaften der jeweiligen Konstrukte, spielt in vivo auch die Biokompatibilität des Materials eine besondere Rolle.

Gerade sog. Crosslinkersubstanzen fungieren als potentielle Quelle für das Freisetzen zytotoxischer Substanzen. Diesem Sachverhalt muss eine angemessene Bedeutung zukommen, um Fremdkörper- bzw. Abstoßreaktionen in vivo vorhersehen bzw. vermeiden zu können und so dem Implantat optimale Bedingungen zum Einheilen zu ermöglichen.

Deshalb wurden mehrere in vitro Tests durchgeführt, die den Einfluss der gecrosslinkten KF auf eine Monolayerzellschicht aus Mäusefibroblasten qualitativ und quantitativ darstellen sollten.

3.6.1 Cell Titer Glo

Der Cell Titer Glo[®] (Promega GmbH) dient zum Nachweis des ATP-Gehaltes metabolisch aktiver Zellen mittels einer Luciferasereaktion als Maß für die Zahl lebender Zellen. Er lässt somit Rückschlüsse auf die Zytotoxizität der Substanz zu, mit der die Zellen zuvor versetzt wurden.

In einer ersten Versuchsreihe wurden zunächst native, γ -sterile KF mit Glucosegecrosslinkten γ -sterilen KF verglichen. Nach 48 h zeigen die nativen Fasern eine Extinktion von $0,787 \pm 0,124$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die Fasern, die zuvor mit Glucose gecrosslinkt wurden, erbrachten hingegen eine Extinktion von $0,889 \pm 0,043$ verglichen mit der Negativkontrolle. Ähnliches konnte auch nach 72 h beobachtet werden. Hier erreichten die nativen Fasern einen Wert von $0,833 \pm 0,053$ und die Glucose-gecrosslinkten Fasern einen Wert von $0,936 \pm 0,097$ normiert zur Extinktion der Negativkontrolle.

Insgesamt lässt sich hier also ein dezent gehemmtes Wachstum unter dem Einfluss beider Entitäten erkennen, wobei die Glucose-gecrosslinkten Fasern ein wenig höhere Werte aufwiesen als ihre nativen Pendanten. Eine durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse konnte allerdings weder nach 48 h noch nach 72 h einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Materialformen nachweisen ($p_{48} = 0,11$; $p_{72} = 0,07$).

Eine zweite Versuchsreihe diente dem Vergleich der beiden Crosslinker 0,625 % Genipin und 10 % HMDI. Hier ergab sich für die mit 0,625 % Genipin gecrosslinkten Fasern eine Lumineszenz von $0,519 \pm 0,033$ gegenüber der Negativkontrolle. Bei 10 % HMDI als Crosslinkingsubstanz wurden dagegen Werte um $0,846 \pm 0,036$ erzielt. Die 72 h-Messung zeigte für die mit 0,625 % Genipin versetzten KF Werte um $0,357 \pm 0,029$, die im Vergleich zu den mit 10 % HMDI behandelten Fasern mit Werten von $0,717 \pm 0,028$ deutlich reduziert ausfielen. Beide Substanzen führten somit zu einem reduzierten Zellwachstum im Vergleich zur Negativkontrolle, wobei 0,625 % Genipin eine deutlich höhere Zytotoxizität aufwies als 10 % HMDI.

Auf den ersten Blick schien 0,625 % Genipin dem 10 % HMDI im Hinblick auf Zellwachstum und Zellüberleben deutlich unterlegen zu sein. Eine durchgeführte ANOVA konnte diese Aussage bekräftigen und belegte die hochsignifikante ($p < 0,001$) höhere Zytotoxizität der 0,625 % Genipin-gecrosslinkten Fasern gegenüber den mit 10 % HMDI behandelten KF.

Als Randnotiz muss jedoch angemerkt werden, dass die Exstinktion der 50%igen Verdünnung des Genipin-KF-Eluats mit Werten um $0,768 \pm 0,024$ nach 48 h und $0,708 \pm 0,030$ nach 72 h etwa im Bereich des unverdünnten HMDI-Faser-Eluats lag und der o.g. signifikante Unterschied hier nicht zu ermitteln war.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden nun KF verglichen, die zuvor mit 0,625 % Genipin bzw. Glucose gecrosslinkt worden waren.

Aufgrund der unzureichenden Menge an Eluat stehen hier jedoch nur die Ergebnisse nach 48 h zur Verfügung. Es ergaben sich für das Eluat aus den Genipin-gecrosslinkten Fasern, normiert auf die der Negativkontrolle, Exstinktionswerte von $0,774 \pm 0,019$ und für das Eluat der Glucose-gecrosslinkten Fasern Werte von $0,740 \pm 0,016$.

Beide Substanzen führten somit zu einer Reduktion des Zellwachstums in vitro um mehr als 25 % im Vergleich zur Negativkontrolle.

Eine ebenfalls durchgeführte statistische Analyse mittels ANOVA belegte den zu vermutenden signifikanten Unterschied der beiden Crosslinkersubstanzen auf das Zellwachstum ($p = 0,012$) mit einer höheren Zytotoxizität der Glucose-gecrosslinkten Fasern.

Tabelle 4: CellTiterGlo®-Exstinktionswerte nach 48 h und 72 h (n = 3).

| | nativ | Glucose | HMDI 10% | Genipin 0,625% | Genipin 0,5% |
|------|-------------|-------------|-------------|----------------|--------------|
| 48 h | 0,787±0,124 | 0,889±0,053 | 0,846±0,036 | 0,519±0,033 | 0,924±0,043 |
| 72 h | 0,833±0,053 | 0,936±0,097 | 0,717±0,028 | 0,357±0,029 | 0,857±0,153 |

In einer letzten Versuchsreihe (vgl. Abb. 20) wurden nun die beiden biomechanisch stärksten Crosslinker 0,5 % Genipin und 10 % HMDI zusammen mit den nativen, γ -sterilen KF einer abschließenden Betrachtung unterzogen. In der 48 h-Messung erreichte das Eluat der nativen KF einen Exstinktionswert von $0,916 \pm 0,119$ verglichen mit der Negativkontrolle. Die Eluate aus 0,5 % Genipin und 10 % HMDI konnten einen Wert von $0,924 \pm 0,043$ bzw. $1,427 \pm 0,035$ erreichen.

Die 72 h-Messung zeigte einen Wert von $1,455 \pm 0,066$ für das Eluat aus nativen KF. Das Eluat aus 10 % HMDI gecrosslinkten Fasern lieferte einen Wert von $1,200 \pm 0,061$, während das Eluat aus 0,5 % Genipin-gecrosslinkten Fasern verglichen mit der Negativkontrolle bei Lumineszenzwerten von $0,857 \pm 0,153$ lag. Das Eluat aus nativen KF erreichte dagegen in der 72 h-Messung kaum eine Beeinträchtigung des Zellwachstums und lag im 48h-Wert sogar über dem Wert der Negativkontrolle.

Ähnlich verhielt es sich mit dem Eluat aus 10 % HMDI-gecrosslinkten Fasern, wobei sich hier sowohl die Werte nach 48 h als auch nach 72 h über denen der Negativkontrolle befanden und somit keine Kompromittierung des Zellwachstums durch 10 % HMDI als Crosslinkingsubstanz nahelegen.

Eine dezente Beeinträchtigung des Zellwachstums wiesen nur die 0,5 % Genipin-gecrosslinkten Fasern auf, wobei dieser Unterschied auf Grundlage eines t-Tests ($p_{48h} = 0,07$) statistisch als nicht signifikant zu werten ist.

Lediglich beim 72 h-Wert ergab sich eine marginale Signifikanz von $p_{72h} = 0,03$. Im Vergleich zu den 10 % HMDI Fasern ließ sich jedoch auf Grundlage eines t-Tests eine Erhöhung des Zellwachstums der 10 % HMDI Fasern gegenüber den 0,5 % Genipin Fasern ($p_{48h} = 0,004$; $p_{72h} < 0,001$) ermitteln. Dieser Vergleich

ist aufgrund des kaum signifikanten Unterschieds des Genipineluats zur Negativkontrolle für die Beurteilung der Biokompatibilität in vivo allerdings so gut wie nicht von Bedeutung, da, wie gesehen, beide Stoffe das Zellwachstum kaum kompromittierten.

Insgesamt lassen die Ergebnisse folgende Schlüsse zu:

- Die 10 % HMDI-gecrosslinkten Fasern zeigen über alle Versuchsreihen hinweg die geringsten Beeinträchtigungen des Zellwachstums. 0,625 % Genipin hingegen scheint das Zellwachstum jedoch deutlich zu hemmen.
- Je geringer die Genipinkonzentration der einzelnen KF ist, desto weniger Zytotoxizität lässt sich nachweisen.

Insbesondere in der letzten Versuchsreihe konnte dieser Sachverhalt sehr gut nachvollzogen werden, da hier bei einer Genipinkonzentration von 0,5% kaum noch signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle nachzuweisen waren. Beide Crosslinker können somit als ausreichend biokompatibel bezeichnet werden.

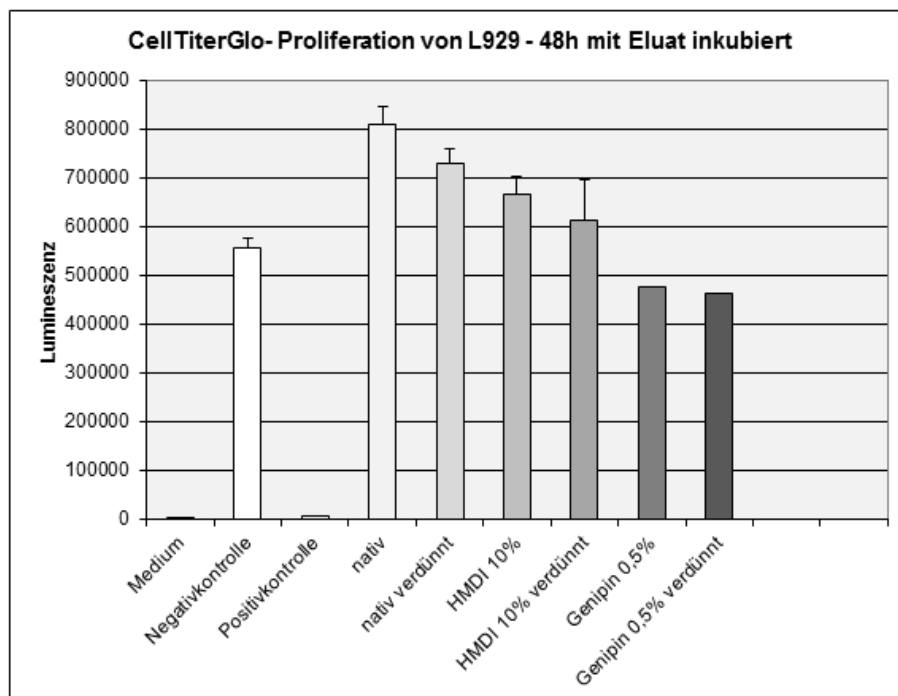


Abb. 20: Vergleich der Crosslinker 10 % HMDI und 0,5 % Genipin mittels CellTiterGlo-Messung.

3.6.2 DC Protein Assay

Der DC Protein Assay der Firma BioRad® dient dem kolorimetrischen, quantitativen Nachweis von Protein.

Der Reaktionsmechanismus verläuft dabei ähnlich wie von Lowry et al. 1951 bereits beschrieben [91].

Die Proteinkonzentrationswerte der Zellen, die den nativen KF ausgesetzt waren, schwankten zwischen $0,706 \pm 0,106$ und $1,41 \pm 0,043$ im Vergleich zur Negativkontrolle. Daneben führte ein 10 % HMDI-Crosslinking zu einem Proteingehalt der Zellen von $0,700 \pm 0,064$ bzw. $0,951 \pm 0,114$ in der letzten Versuchsreihe. Bei der Bewertung des Einflusses von Genipin auf die Zellen muss beachtet werden, dass innerhalb der Versuchsreihen die Genipinkonzentration von 0,625 % auf 0,5 % gesenkt wurde.

Der Proteingehalt der Zellen, deren KF mit 0,625 % Genipin als Crosslinker ausgesetzt waren, erreichte dabei Werte zwischen $0,518 \pm 0,100$ und $0,843 \pm 0,067$, während unter 0,5 % Genipin Proteinkonzentrationen von $0,795 \pm 0,084$ gemessen werden konnten.

Über alle Versuchsreihen hinweg lässt sich der Trend, der sich bereits bei der Auswertung der CellTiterGlo®-Versuche abgezeichnet hatte, mit Hilfe des DC Protein Assays von Biorad® weiter bekräftigen. Auch hier scheinen die Crosslinker 10 % HMDI und 0,5 % Genipin den Proteingehalt der Zellen kaum zu beeinflussen. Sie führten zu Proteinkonzentrationseinbußen von maximal 30 % (0,5 % Genipin = 20 % bzw. HMDI = 30 %, vgl. dazu Abb. 21) und lagen damit deutlich vor 0,625 % Genipin, das zu einer Reduktion des Proteingehaltes um fast 50 % im Vergleich zur Negativkontrolle geführt hatte.

Glucose als Crosslinker scheint die Proteinkonzentration der Zellen kaum zu beeinflussen, was Werte von z.T. $0,861 \pm 0,136$ belegten, jedoch traten starke Fluktuationen der Werte über die einzelnen Versuchsabläufe hinweg auf.

Unter Berücksichtigung der biomechanischen Messungen verblieben somit 10 % HMDI bzw. 0,5 % Genipin als einzige wirklich attraktive Crosslinker, die das Zellwachstum bzw. die Proteinkonzentration der Zellen nur wenig bis kaum inhibieren und dabei eine verbesserte Stabilität gewährleisten konnten.

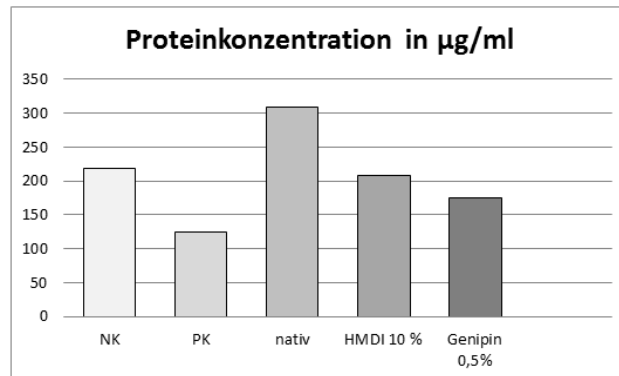


Abb. 21: Bestimmung der Proteinkonzentration in µg/ml für die einzelnen Crosslinker im DC Protein Assay.

3.6.3 Zellzählung und Zellmorphologie

Neben den beiden zuvor dargestellten Assays wurden auch weniger sensitive Untersuchungsmethoden angewandt, um den Einfluss der verschiedenen Crosslinker auf die L929-Zellen zu beschreiben. Hierzu zählen unter anderem die Zählung der Zellen, sowie deren Wachstumsbeurteilung unter dem Mikroskop.

In der Zellzählung ergaben sich im Mittel bei den nativen Fasern 65 % der Zellzahl der Negativkontrolle, bei den Glucosefasern zwischen 80 % und 131 %, bei den 10 % HMDI Fasern zwischen 65 % und 110 % und schließlich bei den Genipinfasern konzentrationsabhängig zwischen 45 % und 80 %, wobei die höheren Werte bei niedrigeren Konzentrationen von Genipin erreicht wurden.

Daneben erfolgte die Beurteilung der Zellmorphologie anhand verschiedener Kriterien wie Adhärenz, Form, Apoptosezeichen und Dichte der Zellen im Well.

Zellen, die Glucose-gecrosslinkten Fasern ausgesetzt waren, zeigten unter dem Mikroskop insgesamt eine verminderte Adhärenz, sowie Dichte des Zelllayers und deutliche Apoptosezeichen wie Abrundung und totes Zellmaterial.

10 % HMDI als Crosslinker der KF führte zu deutlich weniger apoptotischen Zellen, in deren Zelllayer jedoch weiterhin einige Auflockerungen zu erkennen waren. Die Vitalität der Zellen, gemessen an der Anzahl lebender zu apoptotischer Zellen, ergab extrapoliert Werte um 60 %.

Morphologisch den besten Eindruck hinterließen die Zellen, die das Eluat aus Genipin-gecrosslinkten Fasern erhalten hatten.

Hier zeigte sich meist ein gleichmäßig dichter Zelllayer mit weniger apoptotischen Zellen im Vergleich zu den Vorgängern. Die Vitalität der Zellen wurde dabei durchweg auf über 70 % geschätzt.

Insgesamt ließen sich für Genipin und HMDI anhand der Zellzählung und Zellmorphologie die besseren Eigenschaften auf Zellmorphologie und -anzahl im Vergleich zu Glucose belegen. Zudem scheint Genipin, zumindest in Bezug auf Zellmorphologie bzw. -vitalität, auch leicht verbesserte Voraussetzungen liefern zu können als 10 % HMDI.

3.7 Kollagenaseexpositionsvoruch

Wie unter „2.9 Kollagenaseexpositionsvoruch“ beschrieben, wurde eine Konzentrationsreihe angelegt, die zu gleichen Teilen Kollagenase Typ I und Typ II enthielt.

Daran anschließend wurden Minikonstrukte, die mit den verschiedenen Crosslinkern behandelt wurden, diesen Kollagenaselösungen exponiert. Nach 10 Tagen erfolgte eine biomechanische Testung der Minikonstrukte an der „Zwick“ (s. Abb. 22). Dabei zeigte sich für die nativen, nicht gecrosslinkten Minikonstrukte mit steigender Konzentration der Kollagenasekonstruktion eine Abnahme der maximalen Reißfestigkeit. Hier ließ sich ein Abfall von ca. 75 % der Reißfestigkeit bei 0 ng/ml von etwa $62,8 \pm 8,1$ N auf $16,3 \pm 4,9$ N bei einer Konzentration von 2 µg/ml nachweisen. Der Abfall erfolgte weitestgehend homogen, wobei eine 10-fache Erhöhung der Kollagenasekonzentration eine annähernde Halbierung der max. Kraftwerte darstellte.

Auch für die Glukose-gecrosslinkten Minikonstrukte konnte ein hoher absoluter Kraftabfall von über 80 % zwischen 0 ng/ml und 2 µg/ml beobachtet werden. Diese Werte sanken hier von $84,8 \pm 4,3$ N auf $15,3 \pm 4,3$ N. Allerdings ergab sich der Hauptabfall der maximalen Reißfestigkeit erst zwischen Konzentrationswerten von 200 ng/ml und 2 µg/ml. Dieser Rückgang von $67,7$ N \pm $32,0$ N auf $15,3 \pm 4,3$ N machte dabei etwa 75 % des Gesamtabfalls aus.

Bei 10 % HMDI als Crosslinking-Substanz hingegen ließ sich ein derartiger Abfall nicht nachweisen. Die Werte blieben relativ konstant und veränderten sich von

72,3 ± 19,6 N bei einer Kollagenasekonzentration von 0 ng/ml auf 76,5 ± 16,1 N bei ansteigender Konzentration nicht signifikant (p-Wert: p = 0,98).

Ebenso verhielt es sich mit 0,5 % Genipin als Crosslinker. Die Werte blieben hier zwischen 96,3 ± 19,0 N bei 0 ng/ml und 100,7 ± 28 N bei 2 µg/ml über alle Kollagenasekonzentrationen konstant und zeigten keinerlei Abfall in höheren Konzentrationsbereichen. Anhand einer ANOVA ließ sich hier bei steigender Kollagenasekonzentration keine signifikante Änderung der Reißfestigkeit belegen (p-value = 0,51).

Beim Vergleich der maximalen Reißfestigkeit der einzelnen Minikonstrukte untereinander im Kollagenversuch war insgesamt eine signifikante Zunahme der Überlegenheit der beiden Crosslinker Genipin und 10 % HMDI gegenüber den nativen bzw. Glukose-gecrosslinkten Minikonstrukten (p < 0,05) zu verzeichnen. Bereits bei der Konzentration von 20 ng/ml Kollagenase konnte der t-Test für die 10 % HMDI-Konstrukte bei einem p = 0,048 und die Genipinkonstrukte bei einem p = 0,004 eine signifikante Verbesserung der Reißfestigkeit zum unbehandelten Konstrukt nachweisen, die bei steigender Kollagenasekonzentration noch weiter evident wurde (p_H = 0,0001 bzw. p_G = 0,004).

Im Gegensatz dazu ergab sich für die Glukose-gecrosslinkten Konstrukte keine signifikante Verbesserung im Vergleich zum nativen Minikonstrukt (p_{200ng/ml} = 0,1, p_{2µg/ml} = 0,4).

Der Vergleich der Crosslinker untereinander wurde ebenfalls anhand einer ANOVA vorgenommen. Diese zeigte erst ab einer Kollagenasekonzentration von 2 µg/ml einen signifikanten Unterschied der drei Substanzen: (p_{2µg} = 2,4 · 10⁻⁶, p_{200ng} = 0,17) mit einer Überlegenheit von HMDI bzw. Genipin gegenüber Glukose.

Die Gegenüberstellung von 10 % HMDI zu 0,5 % Genipin gecrosslinkten Konstrukten erlaubte keine signifikanten Aussagen bzgl. einer Überlegenheit einer von beiden Substanzen. Lediglich bei einer Kollagenasekonzentration von 2 µg/ml konnte ein als Berechnungsgrundlage fungierender t-Test einen marginal signifikanten Unterschied (p_{zweiseitig} = 0,11) zugunsten von 0,5 % Genipin nachweisen.

Auch die hier dargestellten Ergebnisse belegen die signifikante Überlegenheit der beiden Crosslinker 10 % HMDI bzw. 0,5 % Genipin gegenüber den nativen Konstrukten unter dem Einfluss unterschiedlicher Kollagenasekonzentrationen. Dabei zeigten sowohl die mit 10 % HMDI, als auch die mit 0,5 % Genipin behandelten Konstrukte keine Beeinflussung ihrer Reißfestigkeit in Gegenwart von Kollagenase I und II in vitro und lassen somit ein optimiertes Ergebnis in vivo erwarten.

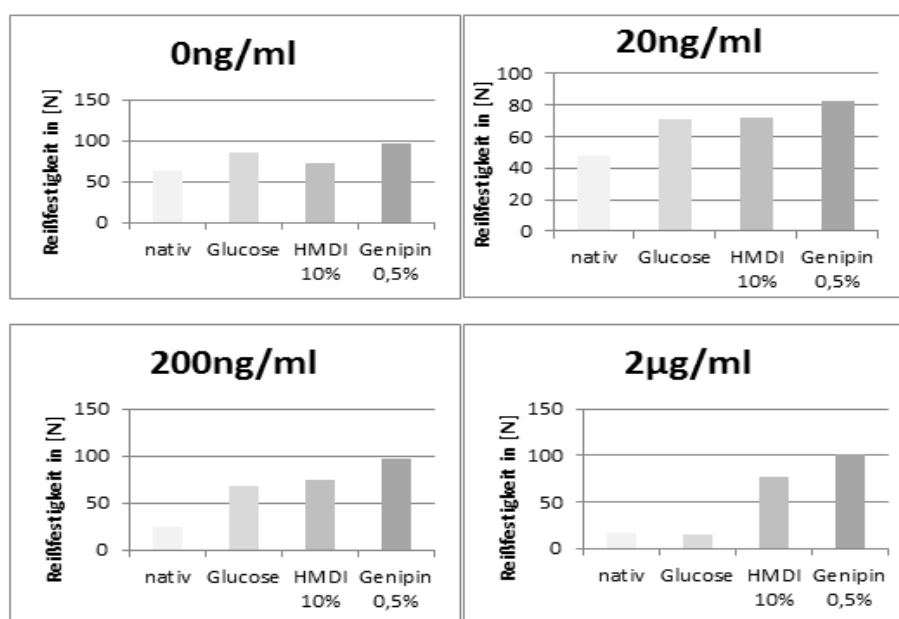


Abb. 22: Reißfestigkeit der Minikonstrukte nach Exposition mit einem Kollagenasegemisch in der angegebenen Konzentration (in N).

3.8 Einfluss des Knotentyps auf das Kollagenkonstrukt

Während der in vitro Konstrukttests an der „Zwick“ zeigte sich, dass die Knoten innerhalb der Konstrukte den eigentlichen Schwachpunkt darstellten, da diese fast ausschließlich innerhalb dieses Bereiches rissen.

Um diesen Umstand auch biomechanisch genauer zu beleuchten, wurden isolierte Knotentests durchgeführt. Dazu wurden zwei Kollagenfasern mit Hilfe eines definierten Knotentyps miteinander verbunden und dieser Knoten in einem Zugversuch an der „Zwick“ getestet. Hier ließ sich für einen Dreifachknoten, der standardmäßig in den vorausgegangenen Konstrukten verwendet wurde, im Mittel ein Wert von $4,7 \pm 1,2$ N ($n = 17$) als maximale Reißfestigkeit feststellen. Da

dieser Wert unter dem durchschnittlichen Ultimate Intensile Strength (UTS) einer nativen KF lag, konnte dadurch indirekt die getroffene Eingangsaussage bekräftigt werden. In einem Modifikationsversuch wurden in der Folge diverse Knotentypen auf mechanische Durchführbarkeit und Praktikabilität im Labor getestet. Schließlich wurde ein Knotentyp, der sog. „Blutknoten“ (s. Abb. 23), auch biomechanisch an der „Zwick“ untersucht.

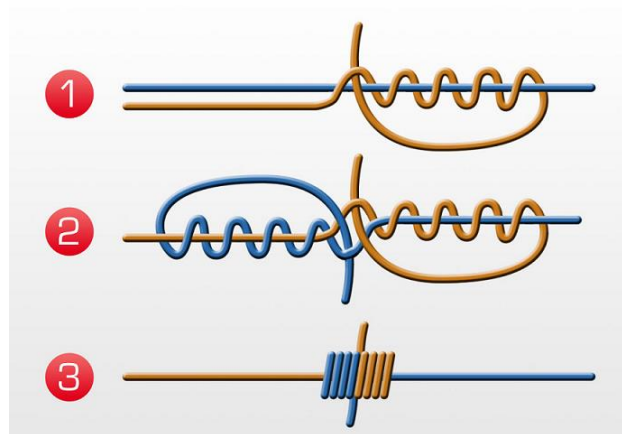


Abb. 23: Bildung des Blutknotens (aus: <http://www.petriangeln.de/blutknoten-anleitung-zwei-angelschnure-verbinden>).

Hier ließ sich eine durchschnittliche Reißfestigkeit von $6,1 \pm 2,1$ N ($n = 24$) ermitteln. Dieser Wert liegt nicht nur deutlich über dem des Dreifachknotens, sondern auch etwa im Bereich einer nativen KF. Daher muss davon ausgegangen werden, dass nun nicht mehr der Knoten selbst, sondern, wie erwünscht, die Kollagenfaser an sich den limitierenden Faktor in einem Konstrukt darstellt.

Ein auf den ermittelten Werten durchgeführter t-Test mit einem p-value von 0,01 bestätigte die getroffene Vermutung eines hochsignifikanten Unterschieds beider Knotentypen.

Als Begründung lässt sich die deutlich bessere Kraftverteilung auf den pränodalen Bereich des Knotens, der als der eigentliche Schwachpunkt der Verbindung gilt, anführen, da dieser Bereich im Blutknoten besser geschützt und somit spannungsfreier liegt.

3.9 Ergebnisse des Tierversuchs

3.9.1. Biomechanik und Makroskopie

Nach den vorausgegangenen Untersuchungen wurden in der Folge nach beschriebener Methode 30 Konstrukte für den Tierversuch gefertigt. Als Crosslinker wurde Genipin in einer Konzentration von 0,5 % verwendet. Ein Implantat hatte dabei eine Länge von 4 cm sowie einen relativ präzisen Durchmesser von 4 mm, was eine Errechnung der Spannung ($\delta = F/A$) möglich machte. Die durchgeführten Vergleichsmessungen der nicht-implantierten Konstrukte ergab eine mittlere Reißfestigkeit von $295,5 \pm 35,7$ N, sowie eine durchschnittliche Spannung von $23,1 \pm 2,8$ N/mm². Insgesamt umfasste die Studie 16 Versuchstiere, wovon jeweils 8 nach 6 Wochen bzw. nach 6 Monaten untersucht wurden. Dabei wurde das operierte rechte Kniegelenk der einzelnen Tiere frei präpariert und sein natives Pendant im linken Knie als Kontrolle gemessen. Bei der Präparation der 6-Wochentiere fiel in diesem Zusammenhang auf, dass alle operierten Knie deutliche Entzündungszeichen aufwiesen. Die Implantate wirkten aufgeschwemmt und waren teilweise gänzlich zersetzt. Zwei Kniegelenke waren aus diesem Grund biomechanisch gar nicht beurteilbar, da sich bei der Präparation bereits das ersetzte ACL löste. Zusätzlich konnten an den Bohrkanälen eines Knies Abszesshöhlen mit teilweise zersetzten Genipinfasern nachgewiesen werden. Als Ursache wurde ein durch Genipin induzierter Inflammationsprozess angenommen, der den starken Abfall der Reißfestigkeit der ACL bei den 6-Wochentieren zumindest ansatzweise erklären könnte.

Die Präparation der 6-Monatstiere gestaltete sich dagegen weitgehend komplikationslos. Nur bei einem Tier zeigte sich im Knie eine Abszesshöhle am tibialen Bohrkanaleintritt. Alle übrigen Tiere wiesen makroskopisch eine definierte vordere Kreuzbandstruktur auf, die die deutlich besseren Werte erklärte (s. Abb. 18).



Abb. 18: Blick in das präparierte Kniegelenk eines 6-Monatstieres (MP245). Deutlich erkennbar ist die kreuzbandähnliche Struktur des Implantates (s. Kreis).

Zusätzlich ließen sich bei den meisten Präparaten bindegewebsartige Strukturen erkennen, die von der Rückseite der Patella bis zum Ansatz des vorderen Kreuzbandes reichten.

In den folgenden beiden Tabellen finden sich die ermittelten Ergebnisse für die maximale Reißfestigkeit, sowie der maximalen Spannung der Implantate im Vergleich zu ihrem nativen ACL.

Tabelle 3: Max. Reißfestigkeit (F) und Spannung (∂) der Implantate nach 6 Wochen im Vergleich zu den jeweiligen nativen ACL's nach 6 Monaten.

| 6 Wochen | MP 150 | MP 239 | MP 253 | MP 233 | MP 244 | MP 132 | MP 296 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $F(N)_{\text{Tier}}$ | 15,7 | 9,0 | 6,9 | 11,4 | 19,8 | 0 | 0 |
| $\partial(N/mm^2)_{\text{Tier}}$ | 1,25 | 0,72 | 0,55 | 0,91 | 1,58 | 0 | 0 |
| $F(N)_{\text{ACL}}$ | 1564,5 | 953,5 | 763,9 | 671,2 | 841,5 | 1127,8 | 955,8 |
| $\partial(N/mm^2)_{\text{ACL}}$ | 124,5 | 75,9 | 60,8 | 53,4 | 67,0 | 89,7 | 76,1 |

| 6 Monate | MP 205 | MP 234 | MP 241 | MP 248 | MP 236 | MP 245 | MP 201 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $F(N)_{\text{Tier}}$ | 159,2 | 256,9 | 258,4 | 165,8 | 63,9 | 170,4 | 65,4 |
| $\partial(N/mm^2)_{\text{Tier}}$ | 12,6 | 20,4 | 20,6 | 13,2 | 5,1 | 13,6 | 5,2 |
| $F(N)_{\text{ACL}}$ | 952,4 | 941,6 | 1075,1 | 1191,4 | 992,8 | 1101,5 | 919,1 |
| $\partial(N/mm^2)_{\text{ACL}}$ | 75,8 | 74,9 | 85,6 | 94,8 | 79,0 | 87,7 | 73,1 |

Die Ergebnisse zeigten, dass die Implantate bei den 6-Wochen-Versuchstieren eine durchschnittliche Reißfestigkeit von $8,9 \pm 6,9$ N besaßen, während die 6-Monatstiere bereits Werte um $162,8 \pm 73,0$ N erreichen konnten.

Da die nativen Vergleichskreuzbänder im Mittel einer Maximalkraft von $1003,7 \pm 205,8$ N standhielten, entspricht dies bei den 6-Wochentieren etwa einer Reißfestigkeit von 1 % und bei den 6-Monatstieren von ca. 15,9 %. Im Vergleich zu den nicht-implantierten Konstrukten hingegen ergeben sich Werte von 3 % bei den 6-Wochen- und 55,1 % bei den 6-Monatstieren.

Insgesamt wurden im Bereich der 6-Monats-Gruppe somit deutlich höhere Werte gemessen als in der 6-Wochen-Gruppe. Zudem konnte festgestellt werden, dass der Minimalwert der zweiten Gruppe mit 63,3 N schon fast dem 4-fachen des Maximums der 6-Wochen-Gruppe (mit 15,7 N) entsprach.

Neben der maximalen Reißfestigkeit der einzelnen Bänder war deren maximale Spannung ein weiterer Untersuchungsgegenstand dieser Studie. Diese lag beim nativen ACL bei etwa $79,9 \pm 16,4$ N/mm². Von den 6-Wochen- zu den 6-Monats-Ergebnissen konnte eine Steigerung im Mittel von $0,7 \pm 0,6$ N/mm² auf $13,0 \pm 5,8$ N/mm² erzielt werden, wobei hier zwei Tiere Werte über 20,0 N/mm² aufweisen konnten und damit nahe an den in vitro ermittelten Implantatmittelwert von $23,1 \pm 2,8$ N/mm² heranreichten.

Auf diesen Daten vorgenommene t-Tests belegen die Unterschiede zwischen 6-Wochen-, 6-Monats- und nativen ACL-Messungen statistisch. So ließ sich bei den Spannungswerten der nativen Kreuzbänder sowohl im Vergleich zu den 6-Wochen-Implantaten [$p = (2,2 \cdot 10^{-10})$] als auch bei den 6-Monats-Implantaten

[$p = (1,3 \cdot 10^{-10})$] ein p-value von $p < 0,0001$ errechnen, was den hochsignifikanten Unterschied der eingesetzten Implantate zu den nativen ACL belegen konnte. Der Spannungsvergleich der Kreuzbandimplantate der 6-Wochentiere mit den 6-Monatstieren untereinander wies aufgrund eines kleineren p-values von $p = 0,002$ ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Spannung des Konstrukts im Laufe der Zeit nach (s. Abb.19).

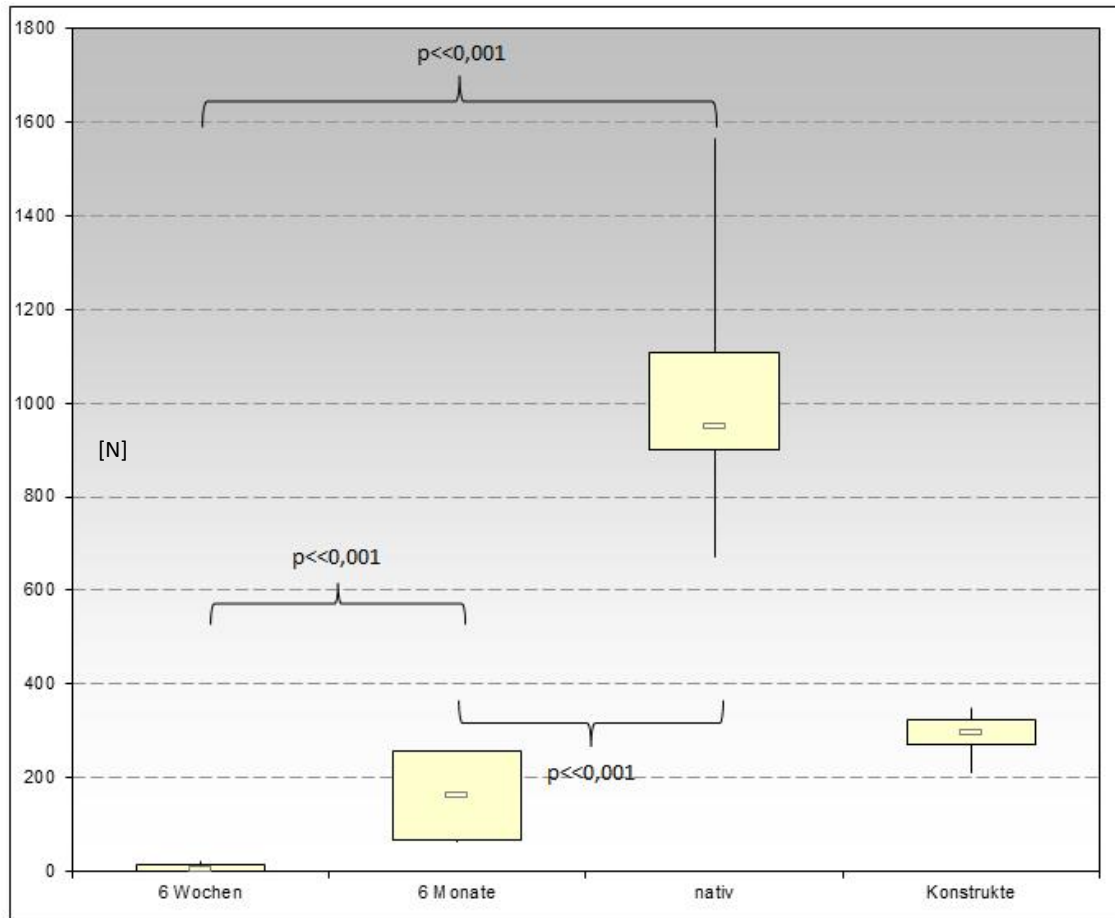


Abb. 19: Vergleich der Reißfestigkeitswerte der Tierversuchskonstrukte in N inklusive p-value aus den t-Tests (s. Text).

3.9.2. Histologische Beurteilung

Im Präparat eines 6-Monatstieres war das Implantat eindeutig abgrenzbar und vollständig erhalten. Auf die Darstellung des Übergangs in den Knochen wurde bereits bei der Paraffineinbettung verzichtet. Insgesamt zeigte sich eine eher aufgelockerte Gewebsstruktur ohne größere hypozelluläre Bereiche und mit einer

weitestgehend homogenen Zell- und Blutgefäßverteilung. Dennoch war eine typische wellige Kollagenfaserstruktur gut erkennbar (s. Abb. 24). Hieran angelagert fanden sich zahlreiche Zellen, die eine ovoid bis spindelförmige Konfiguration aufwiesen und entlang der Faserrichtung zur Darstellung kamen. Hierbei handelte es sich am ehesten um eingewanderte Fibroblasten, die sich in Zugrichtung an die entsprechenden KF anlegten. Daneben waren zahlreiche Blutgefäße zu erkennen (s. Abb. 25). Peripher war eine ein- bis zweilagige Zellscheide des Präparates angedeutet, bei der es sich vermutlich um die Äquivalente eines Synovialüberzuges handelte und die in Abb. 26 im unteren Bildausschnitt gut zu erkennen ist.

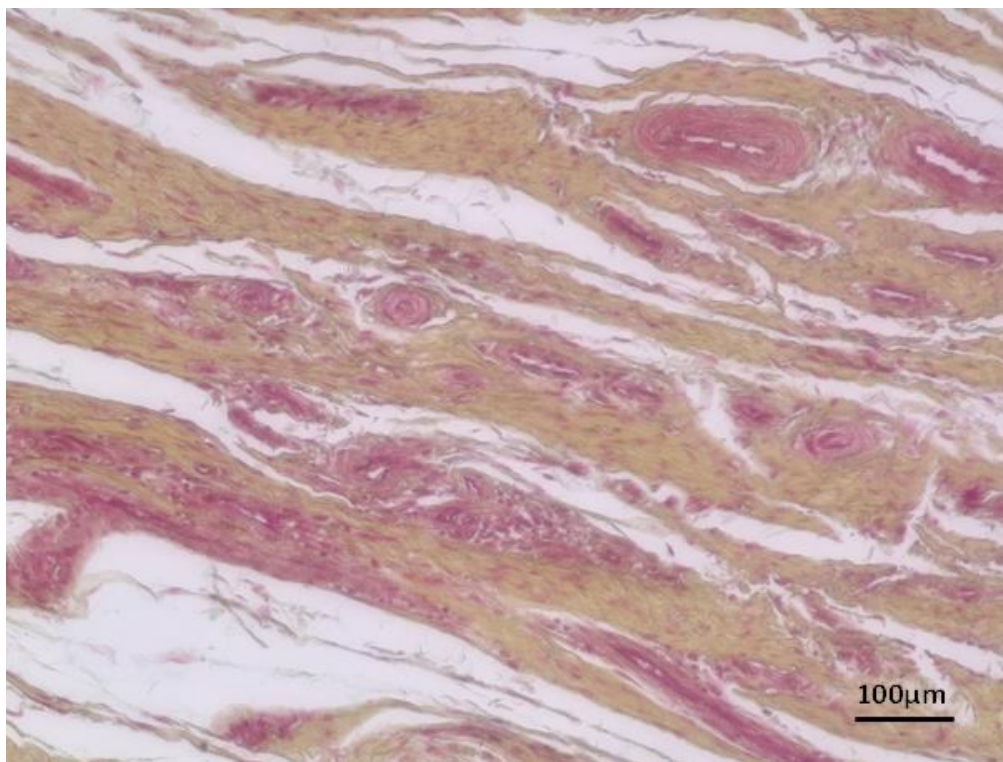


Abb. 24: Pentachrom-Färbung des Implantats 6 Monate post OP. Gut erkennbar sind die Ausrichtung und Wellenstruktur der KF und die zahlreichen angeschnittenen Blutgefäße. MP 250, MG x20.

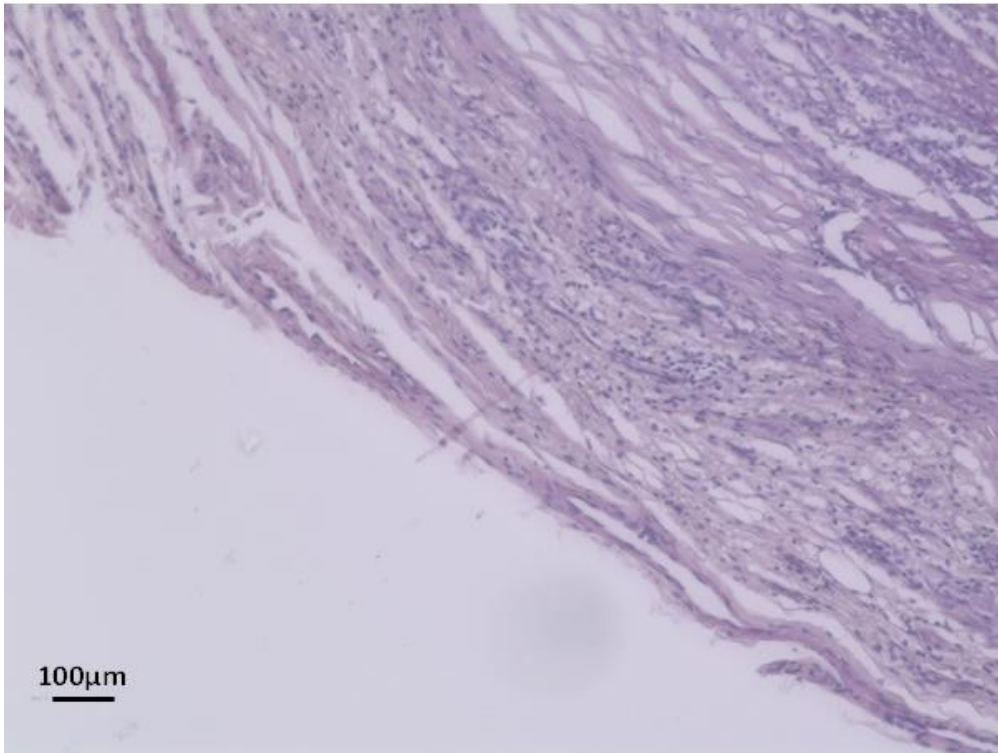


Abb. 25: HE-Färbung des Implantats 6 Monate post OP. Sichtbar sind die Wellenstruktur der KF und die Hyperzellularität. MP 250, MG x10.

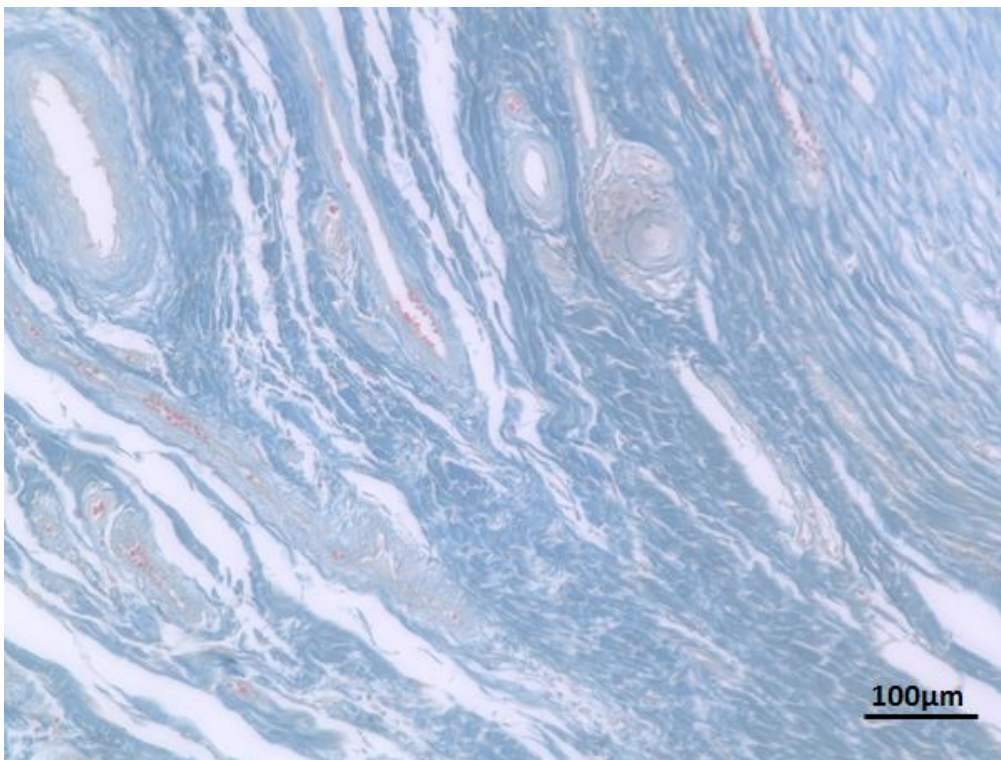


Abb. 26: Azan-Färbung des Implantats 6 Monate post OP. MP 250, MG x20.

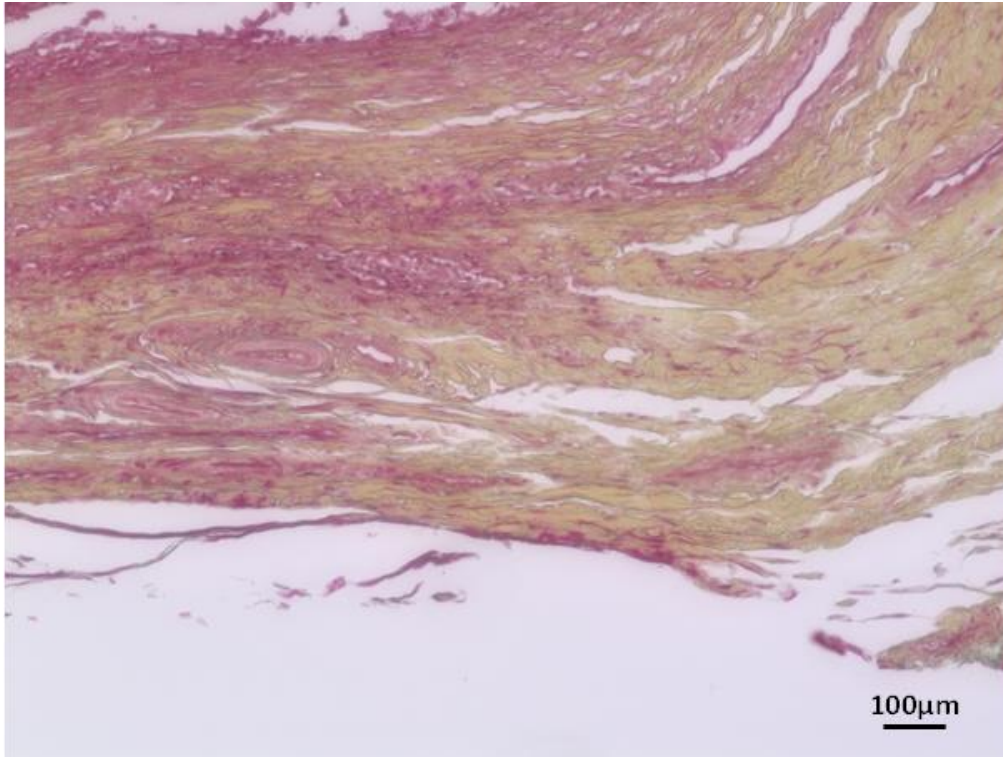


Abb. 27: Pentachrom-Färbung des Implantats 6 Monate post OP. Im unteren Bildausschnitt stellt sich ein ein- bis zweilagiger Synovialüberzug dar. MP 250, MG x10.

4 Diskussion der Ergebnisse

Die steigende Anzahl an vorderen Kreuzbandrupturen und die Suche nach einem adäquaten Ersatz des vorderen Kreuzbandes stellt in der heutigen Zeit eine der größten Herausforderungen in der orthopädischen Chirurgie dar.

Bis jetzt gibt es keine einheitliche Meinung darüber, welches Rekonstruktionsverfahren einen gleichwertigen, nebenwirkungsarmen und auch im Verlauf suffizienten Kreuzbandersatz liefern können.

Zusätzlich entstehen z.B. durch die gleichzeitig steigende Anzahl an Rerupturen neue Probleme, deren Lösung ebenfalls noch Gegenstand gegenwärtiger Forschung ist.

Aus diesem Grund entstand im Jahre 2010 das sog. EXIST Projekt, dessen Ziel die Entwicklung eines Konstrukts aus KF für den ACL-Ersatz war.

Von dieser Forschungsgruppe wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit ein Konstrukt entwickelt, das aus ineinander verknüpften Kollagen I-Fasern bestand, die aus Rattenschwänzen extrahiert wurden. Es wurde sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* an einem Tierversuchsmodell mit Minipigs getestet und makroskopisch, biomechanisch und histologisch untersucht [88, 106].

Dabei zeigte sich *in vivo* eine stark herabgesetzte Reißfestigkeit des Konstrukts sowohl nach 6 Wochen als auch nach 6 Monaten. Als Ursache wurde ein erhöhter Abbau durch Synovialkollagenasen diskutiert. Zudem wies ein auf Grundlage der gewonnenen Daten hergestelltes humanes Kollagenfaserimplantat mit Werten von 907 ± 134 N im Vergleich zum nativen menschlichen Kreuzband mit Werten von 1730 N bis 2160 N in der maximalen Reißfestigkeit noch deutlich unterlegene mechanische Eigenschaften auf [16, 17]. Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Optimierung der beschriebenen Kollagenfaserkonstrukte sowohl im Hinblick auf die maximale Reißfestigkeit als auch auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber kollagenabbauenden Enzymen *in vivo*.

Hierfür wurden die Konstrukte einem Crosslinking mit diversen Substanzen unterzogen und biomechanisch und in Bezug auf ihre Biokompatibilität untersucht. Ein sich daran anschließender Tierversuch mit 16 Minipigs sollte zeigen, wie stabil sich die Implantate schließlich *in vivo* präsentieren.

4.1 Wahl eines geeigneten Crosslinkers

Seit dem Einsatz von kollagenbasierten Materialien, sog. „Scaffolds“, in der rekonstruktiven Medizin wird immer wieder versucht, die mechanische Stabilität des verwendeten Kollagens zu erhöhen. Im Zuge dessen werden unterschiedlichste, sog. Crosslinkingsubstanzen eingesetzt, die durch inter- bzw. intramolekulare Verknüpfungen innerhalb der Faserstruktur die mechanischen Eigenschaften verbessern sollen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Crosslinker 0,5 % Genipin, 10 % HMDI, Glucose sowie EDC/NHS (N-ethyl-N'-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide/N-hydroxy-succinimide) anhand ihrer mechanischen Eigenschaften und ihrer Biokompatibilität verglichen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Überlegenheit von 0,5 % Genipin und 10 % HMDI gegenüber den anderen beiden Crosslinkern, sowie gegenüber den nativen Fasern. Grundlage für die mechanische Reißfestigkeitserhöhung während des Crosslinkingvorgangs stellt dabei die Bildung von inter- bzw. intramolekularen Brücken zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen dar. Um vorhandene Vorteile oder Limitationen von Crosslinkern besser beurteilen zu können, ist es deshalb notwendig, den Reaktionsmechanismus der einzelnen Substanzen genauer zu betrachten.

HMDI bzw. Isocyanate wechselwirken dabei mit ϵ -Aminogruppen von Hydroxylysin im Kollagenmolekül und führen zur Ausbildung von Harnstoff-Bindungen vor allem intramolekular [89, 107]. Da HMDI nicht wasserlöslich ist, wird ein Surfactant zum Crosslinking benötigt, in diesem Fall Isopropanol. In der vorliegenden Arbeit konnten so UTS-Werte über 50 N/mm² (MPa) erzielt werden.

Der Reaktionsmechanismus von Genipin dagegen ist noch nicht bis zur absoluten Vollständigkeit verstanden. Vermutlich kommt es auch hier über Wechselwirkungen zwischen Amin-, Lysin-, sowie Argininresiduen zu einer Monomerbildung, die im Weiteren die KF vernetzen [108–110]. Seine max. Reißfestigkeit lag in den o.g. Versuchsreihen zwischen 25 und 40 MPa.

EDC dagegen ist wasserlöslich und katalysiert eine Crosslinkbildung zwischen Carboxyl- und Aminogruppen ohne selbst als Teil dieser Verbindung zu verbleiben. Als Nebenprodukt tritt Harnstoff auf [111–116]. Ermittelt wurden Werte um 14 MPa.

Beim glucoseabhängigen Crosslinken spielt neben der Ausbildung von Verknüpfungen innerhalb von AGE`s (advanced glycation endproducts), die über eine exzessive nicht enzymatische Glycosylierung entstehen, auch eine im Zusammenhang mit der γ -Bestrahlung auftretende Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen eine wichtige Rolle [111, 117–127]. Sie führte in der Folge ebenfalls zu einer Verknüpfung der Kollagenmoleküle und insgesamt zu Reißfestigkeitswerten über 30 MPa.

Für die mechanische Stabilität des Kollagenonstrukts sind neben der spezifischen Crosslinkingeigenschaft [128] auch die Dauer des Crosslinkingvorgangs [89, 113, 129, 130], die spezifische Eindringtiefe eines Crosslinkingreagenzes, sowie die Menge an Kollagen, die verknüpft werden soll [131] von größter Bedeutung. Weiterhin scheint die Anwesenheit von Wasser während des Crosslinkingvorgangs die mechanischen Eigenschaften zu beeinflussen [130]. Alle diese Voraussetzungen gilt es dabei bereits im Vorfeld einer Versuchsreihe zu beachten, um mögliche Wechselwirkungen der Substanzen in vivo besser vorhersagen bzw. deuten zu können.

Das am häufigsten in der Literatur genutzte und als Versuchssubstanz angeführte Crosslinkingreagenz stellt Glutaraldehyd dar. Sein Anwendungsgebiet in der Medizin reicht vom Crosslinking von Hornhautoberflächen über Perikardgewebe bis hin zu Sehnen und Bändern [128, 132, 133]. Es gewährleistet eine hohe mechanische Stabilität bei erhaltenen visko-elastischen Eigenschaften des Kollagens [110] und macht es daher zu einer der beliebtesten Substanzen zum Crosslinken von Kollagen.

Allerdings ist seine Anwendung in vivo stark umstritten, da es eine hohe Zytotoxizität besitzt [107, 107, 110, 134–138] und somit zu starken Inflammationsprozessen, wie beispielsweise einer fibrösen Einkapselung [89, 139], führen kann. Seine maximale Reißfestigkeit, der sog. UTS, liegt je nach Studiendesign zwischen 12 und 70 MPa [89] und damit im Bereich der in der vorliegenden Studie getesteten Crosslinker. Menschliche Sehnen und Bänder erreichen zum Vergleich Werte zwischen 15 und 53 MPa. Ein humanes ACL hat dabei einen Wert von ca. 50 MPa [17].

Weitere Crosslinker, deren Zytotoxizität deutlich geringer ist als die von Glutaraldehyd, sind daher Gegenstand der aktuellen Forschung. Die attraktivsten Methoden sind dabei solche, die keine toxischen Nebenprodukte bilden und möglichst ohne den Zusatz von chemischen Substanzen ablaufen.

Kato et al. berichten in diesem Zusammenhang über rekonstituierte KF, die einem DHT (dehydrothermal treatment) unterzogen wurden [140]. Diese konnten eine UTS von ca. 30 MPa erzielen und lagen damit etwa im Bereich von nativen Rattenkollagenfasern wie sie in dieser Studie verwendet wurden, jedoch noch unterhalb der Werte eines Glutaraldehydcrosslinkings.

Dunn et al. berichteten von keinem signifikanten Unterschied im UTS von DHT plus Carbodiimid gegenüber Glutaraldehyd, wobei jedoch ein stark erniedrigtes Risiko der Enkapsulation eines möglichen Konstrukts in vivo bestand [131].

Im Vergleich zu anderen, rein physikalischen Crosslinkingmethoden sind für DHT bessere biomechanische Eigenschaften beschrieben [141].

Neben den o. g. physikalischen Methoden am Beispiel von DHT, spielen heute vor allem chemische Methoden eine große Rolle.

Studien, wie die von Gentleman et al. belegen die guten mechanischen Eigenschaften von Carbodiimid als Crosslinker, das UTS-Werte von bis zu 50 MPa nachweisen konnte und damit etwa im Bereich eines humanen ACL liegt [142].

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Annahme eines Durchmessers von 2 mm pro Minikonstrukt für EDC/NHS-Konstrukte ein durchschnittlicher UTS von nur etwa 15 MPa gemessen werden. Dies war vor allem darauf zurückzuführen, dass die exakte Bestimmung des Durchmessers aufgrund der Konstruktconfiguration nicht möglich war. Vielmehr handelte es sich um einen (groben) oberen Maximalwert, der von keinem Konstrukt überschritten wurde, da der Durchmesser anhand einer Lochplatte ausgemessen und nicht metrisch ermittelt werden konnte.

Trotzdem zeigten die EDC/NHS-gecrosslinkten Fasern die geringsten UTS-Werte und keine signifikante Verbesserung zu rein nativen Kollagenfaserkonstrukten.

Im Kontext von Diabetesstudien konnte in den letzten Jahren die Fähigkeit von Glucose zum Crosslinking von Kollagen via Glycosylation und Radikalenbildung aufgezeigt werden. Insbesondere durch eine Studie von Ohan et al. aus dem Jahre 2001, konnte nachgewiesen werden, dass Glucose in Kombination mit

elektromagnetischer Strahlung, hier UV- bzw. γ -Strahlung, zu mechanisch stabileren Kollagenscaffolds führt. Zusätzlich besitzen sie eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Kollagenasen [126, 127, 143].

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich unter den oben dargelegten Voraussetzungen für die Glucose-Konstrukte UTS-Werte von ca. 30 MPa. Allerdings führte eine Bestrahlung von Kollagen mit UV- bzw. γ -Strahlen unweigerlich auch zu einer Fragmentierung und Denaturierung der Kollagenhelices, die die Stabilität dieser Konstrukte bereits im Vorfeld kompromittierten [118–120].

Eine weitere, vergleichsweise neuere Methode ist das Crosslinking mittels Transglutaminasen, einer Enzymgruppe, die γ -Glutamyl- ϵ -Lysine Crosslinks innerhalb von Proteinen induziert [144].

Da der Reaktionsmechanismus ohne die Beteiligung von toxischen Nebenprodukten ablaufen kann, gilt dieses Verfahren für den in vivo Einsatz als besonders praktikabel.

Allerdings bleiben die Ergebnisse der mechanischen Eigenschaften von Crosslinkern deutlich hinter denen von chemischen zurück.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von Zeugolis et al. stellt die gängigsten Crosslinkingmethoden vor und vergleicht sie anhand ihrer mechanischen Eigenschaften [89].

Grundlage des Kollagensubstrats war dabei eine Lösung aus Rinderachillessehnen, die mit Hilfe eines speziellen Extrusionsverfahrens in Faserform gebracht wurden. Hier zeigte sich insgesamt eine deutliche Überlegenheit der chemischen Crosslinkingmethoden im Vergleich zu biologischen oder physikalischen Ansätzen.

Wie in der vorliegenden Arbeit lieferte HMDI, hier allerdings in einer Konzentration von 5 %, insgesamt die besten Ergebnisse im sog. „wet state“ der Fasern mit einem UTS von ca. 7 MPa.

KF, die mit EDC/NHS gecrosslinkt wurden, zeigten ebenso wie in der vorliegenden Arbeit mit 3 MPa eine deutlich unterlegene mechanische Stabilität.

Aufgrund der guten mechanischen Eigenschaften war HMDI in der Literatur auch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Olde-Damink et al. ermittelten als UTS ebenfalls Werte von 20 MPa und konnten dabei aufzeigen, dass kein signifikanter Unterschied zu Glutaraldehyd in Bezug auf Reißfestigkeit festzustellen war [145]. Grundlage ihrer Studie bildete aufgereinigtes Kollagen aus Schafshaut, das mit 1,5 % HMDI versetzt worden war.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die guten mechanischen Eigenschaften von HMDI bestätigt werden. Hier wurde eine 10 % HMDI-Lösung verwendet und ein geschätzter UTS von ca. 55 MPa ermittelt.

Auch die Ergebnisse der Biokompatibilität zeigten in vitro keine Einschränkung des Zellwachstums durch HMDI-gecrosslinkte KF. Allerdings belegen im Gegensatz dazu mehrere Studien das Vorhandensein einer, wenn auch im Vergleich zu Glutaraldehyd geringeren, zytotoxischen Komponente von HMDI [107, 107, 146]. Van Wachem et al. ermittelten diesbezüglich ein um etwa 15 % eingeschränktes Zellwachstum bei subkutaner Implantation von gecrosslinktem Schafskollagen im Vergleich zu EDC/ NHS bzw. keinem Crosslinker [116].

Einen Grund hierfür sahen sie sowohl in einer primären Zytotoxizität durch Beiprodukte beim Crosslinkingvorgang, als auch in einer sekundären Zytotoxizität, die aufgrund von enzymatischer Freisetzung von sog. „pendant“-Molekülen aus HMDI-gecrosslinkten Schafskollagen entstehen.

Daneben scheint Genipin, ein sog. natürlicher Crosslinker, gewonnen aus der Frucht von *Gardenia jasminoides* ELLIS, insgesamt eine gute mechanische Stabilität mit einer geringen bis keiner Zytotoxizität zu verbinden.

Yoo et al. konnten dies in einer aktuellen Studie, die keinen signifikanten Unterschied von Genipin und Glutaraldehyd aufzeigen konnte, belegen [147]. Es wurden dabei konzentrationsabhängig UTS-Werte bis zu 15 MPa gemessen.

Sung et al. gehen sogar von einer überlegenen mechanischen Stabilität Genipins im Vergleich zu Glutaraldehyd aus [148]. Die gemessenen Werte in der vorliegenden Arbeit lagen je nach Konzentration zwischen 20-40 MPa und belegten die guten mechanischen Eigenschaften.

Trotz dieser Ergebnisse in den Belastungstests, besitzt Genipin auch eine geringe zytotoxische Komponente, wie verschiedene Autoren belegen konnten [149–151]. Die dafür verantwortlichen Konzentrationswerte lagen jedoch weit

über den für ein suffizientes Kollagencrosslinking nötigen Dosen [105]. Insgesamt decken sich diese Ergebnisse mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werten.

So konnten bei einer Genipinkonzentration von 0,5 % geschätzte UTS-Werte zwischen 35 und 40 MPa ermittelt werden. Daneben zeigte sich in den Studien zur Biokompatibilität eine nur geringe Einschränkung des Zellwachstums in vitro.

Ähnlich wie bei Yoo et al. konnte eine Abhängigkeit zwischen der Genipinkonzentration und des UTS entdeckt werden [147]. Dies ist vermutlich auf eine erhöhte Anzahl an Crosslinks zurückzuführen, die bis zu einer Konzentration von 0,6 stetig zu einem Anstieg des UTS führten, ab einem höheren Wert jedoch keine signifikante Zunahme mehr aufwiesen.

Die vielen Studien, die im Zusammenhang mit Kollagencrosslinking in den letzten Jahren durchgeführt wurden, belegen das große Interesse am Nachweis eines suffizienten Kollagenmaterials für den Einsatz im menschlichen Körper. Allerdings unterscheiden sich die meisten Studien in der Wahl des Kollagenmaterials und der Art des Verarbeitungsprozesses, was die hohe Variabilität der vorgestellten Ergebnisse zumindest teilweise erklären kann. Außerdem dürfen auch die Konzentrationen der einzelnen Substanzen innerhalb einer Studie nicht vernachlässigt werden, da die Anzahl der Crosslinks zu einem Großteil von der jeweiligen Konzentration des Crosslinkers abhängt.

In der vorliegenden Studie zeigten die mit 0,5 % Genipin gecrosslinkten Fasern biomechanisch deutlich bessere UTS-Werte als Fasern, die mit 10 % Glukose, 10 % HMDI oder EDC/NHS behandelt worden waren. Ebenso konnten kaum Unterschiede hinsichtlich der Biokompatibilität von Genipin und den Vergleichscrosslinkern detektiert werden.

Insgesamt kann daher festgehalten werden, dass sich Genipin wegen seiner guten mechanischen Eigenschaften und der guten Biokompatibilität hervorragend für den Einsatz in vivo eignet und deshalb auch im Rahmen der vorliegenden Tierversuche eingesetzt wurde.

4.2 Einfluss von Abbauenzymen auf die Ergebnisse

Während der ersten Tierversuche mit den eigens aus nativen KF im Jahre 2010 entwickelten ACL-Konstrukten [88] konnte eine starke Abnahme der Reißfestigkeit der Implantate vor allem nach 6 Wochen beobachtet werden. Ähnliches wurde auch schon bei humanen autologen Sehnentransplantationen von Ekdahl et al. beobachtet [152]. Diese gehen dabei von einer Reduktion der Reißfestigkeit von ca. 25 % nach 7 Wochen aus, während Müller et al. sogar Kraftverluste von bis zu 75 % nach Hamstringplastik ermitteln konnten [153].

Hauptgrund dafür ist neben der fehlenden Vaskularisierung der Sehnentransplantate auch eine Erhöhung postoperativ auftretender inflammatorischer Enzyme [96, 154, 155].

Hierbei spielen vor allem Kollagenasen, der Kollagenaseinhibitor TIMP-1, sowie TNF- α eine besondere Rolle.

Akesen et al. untersuchten dazu die Synovialflüssigkeit von 16 Patienten vor und nach ACL-Rekonstruktion [97]. Hauptaugenmerk lag auf der intraartikulären Konzentration der Kollagenasen MMP-1, MMP-8 bzw. MMP-13. Es zeigte sich eine durchschnittliche Konzentration an Kollagenase von ca. $1,5 \pm 0,05$ ng/ml. Allerdings wurden die Proben bereits 18 h nach Rekonstruktion entnommen, wodurch eine mögliche Enzymerhöhung über diesen Zeitraum hinaus nicht erfasst werden konnte.

Lipowitz et al. berichten von einer Zeitschwelle von bis zu 13 Wochen bis zur vollständigen Ausbildung der Synovialreaktion nach Kreuzbandruptur [156].

Tchetverikov et al. ermittelten sogar einen Anstieg von MMP-3 in der Synovialflüssigkeit auf Werte um 78 ng/ml nach Knieverletzung bis zur 17. Woche [99].

Neben einer Erhöhung der Konzentration der kollagenabbauenden Enzyme könnte es jedoch auch zu einer Erhöhung ihrer Enzymaktivität kommen. Diese konnte von den meisten Assays jedoch nicht erfasst werden [96].

Um die Widerstandsfähigkeit von Implantaten auf Kollagenbasis zu erhöhen, werden deshalb diverse Crosslinkingmethoden eingesetzt. Der entscheidende Wirkmechanismus bei fast allen Methoden ist eine sterische Hinderung der für

die Kollagenaseenzyme wichtigen Bindungsstellen am Kollagen durch die Crosslinkingsubstanz. Um den Crosslinkingeffekt nachweisen zu können, werden in der Literatur mehrere Verfahren beschrieben. Dabei wird häufig die Löslichkeit des behandelten Kollagens in einer Kollagenaselösung betrachtet [128, 141]. Daneben gibt es auch Verfahren, die die Reduktion des Kollagenfaserdurchmessers als Maß für die Widerstandsfähigkeit angeben [108].

Da beim Kreuzbandersatz jedoch die mechanischen Eigenschaften des Konstrukts für eine erfolgreiche Herstellung der Kniegelenksbiomechanik die größte Rolle spielen, wurden in dieser Arbeit die direkten Auswirkungen verschiedener Kollagenasekonzentrationen auf die UTS, d.h. die max. Reißfestigkeit, betrachtet. Dieser Versuchsaufbau erlaubte gleichzeitig einen möglichen Vergleich der Crosslinkingsubstanzen untereinander.

Die Konzentrationen, denen die Konstrukte ausgesetzt wurden, lagen zwischen 20 ng/ml und 2 µg/ml. Die natürliche Kollagenasekonzentration in der Synovialflüssigkeit beläuft sich je nach Studie auf Werte zwischen 0,12 ng/ml und $1,1 \pm 2,2$ µg/ml und liegt damit im Versuchsbereich dieser Arbeit [99, 157]. Ob und inwieweit eine Implantation von „Fremdmaterial“ Auswirkungen auf die Konzentration und Aktivität proteolytischer Enzyme in vivo hat, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Ein gewisser Einfluss muss daher zusätzlich berücksichtigt werden.

Die angegebenen Kollagenaselösungen setzten sich zu jeweils gleichen Teilen aus Kollagenase I und II zusammen. Dieses Verhältnis spiegelt die Situation in vivo allerdings nur bedingt wieder, da bereits mehr als 13 verschiedene Metalloproteasen bekannt sind. Zudem erstreckte sich der Beobachtungszeitraum nur über 10 Tage, was angesichts der zuvor dargestellten Studien zwar für einen in vivo Versuch kurz, in Bezug auf Vergleichsstudien jedoch relativ lang war [141]. Die Konstrukte mit 10 % HMDI- und 0,5 % Genipin-Crosslinks zeigten während des Versuchs keine Abnahme der Reißfestigkeit. Die nativen bzw. Glucose-gelcrosslinkten Konstrukte wiesen jedoch vor allem bei höherer Kollagenasekonzentration deutliche Kraftereinbußen auf. Der Grund hierfür könnte in der besseren sterischen Hinderung der Abbauenzyme durch die beiden chemischen Crosslinker liegen. Da alle Konstrukte im Vorfeld der Testreihe einer Sterilisation mittels

γ -Strahlen unterzogen wurden, was, wie zuvor beschrieben, zu einer partiellen Fragmentierung des Kollagens führt, könnten auch Eigenschaften der Crosslinker, die Kollagenfasern gegenüber Strahlung resistent machen, zu einer Verbesserung der Ergebnisse geführt haben. Für Glucose ist dieser Effekt jedenfalls bereits beschrieben worden [126].

Wie von Charulatha et al. ausgeführt, sind daneben vor allem die Art und die Anzahl der Crosslinks für die maximale Reißfestigkeit wie auch für die Kollagenasewiderstandsfähigkeit innerhalb des Kollagens von entscheidender Bedeutung [128]. Dies kann eine hinreichende Erklärung für die vorliegenden Versuchsergebnisse sein.

Die 10 % HMDI und 0,5 % Genipin behandelten Konstrukte erwiesen sich im Rahmen dieser Studie als optimal.

Neben Crosslinking sind in der Literatur jedoch auch noch weitere Methoden beschrieben, um die Aktivität proteolytischer Enzyme zu hemmen und den Remodelingprozess des Implantats zu beschleunigen.

Murray et al [39] zeigten beispielsweise eine positive Beeinflussung dieser Enzyme mit Hilfe von PRP.

Insgesamt bleibt somit festzuhalten, dass besonders im Hinblick auf den langfristigen Einsatz kollagenbasierter Konstrukte in der regenerativen Kreuzbandchirurgie der Einfluss proteolytischer Enzyme nicht vernachlässigt werden darf. Das Crosslinking verbindet dabei die Vorteile einer erhöhten mechanischen Stabilität mit einer suffizienten Widerstandsfähigkeit gegenüber Kollagenasen.

4.3 Das Biokompatibilitätsmessverfahren

Im Rahmen dieser Studie wurden zur in vitro Untersuchung der Biokompatibilität Eluate der einzelnen gecrosslinkten Konstrukte auf Mäusefibroblasten der Zelllinie L929 gegeben und mit Hilfe zweier Proteinassays analysiert.

In der Literatur werden diverse Wege beschrieben, die Biokompatibilität von gecrosslinkten Kollagenfasern zu überprüfen. Häufig werden diese in einem Tierversuch subkutan implantiert und nach einer vorgegebenen Zeit auf Degradation und Einwandern spezifischer Zelltypen analysiert.

Hiraoka et al. beispielsweise implantierten Kollagengerüste mit PGA (Polyglycol-säure) in das Subkutangewebe von Ratten. Es zeigte sich keine entzündliche Reaktion aber eine gute Zelleinwanderung [158]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kollagenkonstrukte direkt in das Kniegelenk von Minipigs eingesetzt, um die Biokompatibilität zu untersuchen.

Auch verschiedene in vitro Methoden sind beschrieben [159, 160]. Hierbei variieren Zelltypus, Inkubationszeit und Detektionsverfahren, was einen objektiven Vergleich der Studien fast unmöglich macht.

In der Regel werden Sehnen- bzw. Bandimplantate in vitro an Fibroblastzellkulturen getestet, da diese den Hauptzelltyp der ECM darstellen und eine Wachstumshemmung der Fibroblasten einen erheblichen Einfluss auf das Einwachsen eines Implantats besitzt.

In der Remodelingphase von Kreuzbändern spielen jedoch auch Synovialzellen eine nicht unerhebliche Rolle [161, 162]. Der Einfluss von Crosslinkern auf diesen Zelltyp wurde allerdings bisher noch nicht untersucht.

In vivo Versuche stellen insgesamt eine deutlich validere Methode zur Überprüfung der Biokompatibilität dar, da hierbei alle Zelltypen (also auch Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten etc.) berücksichtigt werden können.

Zur groben Orientierung besitzen jedoch auch in vitro Tests eine ausreichende Aussagekraft.

Die beiden in dieser Arbeit angewandten Testmethoden sind durch den Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin an der Universität Würzburg zertifiziert und dienen als Grundlage für suffiziente Aussagen bezüglich der Biokompatibilität. Die verwendeten nativen KF wurden nach DIN 13485 getestet und für absolut biokompatibel befunden. Dies bestätigte die im Vorfeld geführte in vivo Studie an 50 Minipigs.

In der vorliegenden Arbeit zeigten 0,5 % Genipin und 10 % HMDI als Crosslinkingsubstanzen eine gute mechanische Stabilität und eine große Biokompatibilität.

Einige wenige Studien konnten dagegen eine dezente Wachstumshemmung der Zellen unter HMDI-Einfluss nachweisen [146].

Genipin bot in entsprechenden Konzentrationen allerdings kaum Einschränkungen im Bereich des Zellwachstums [149–151].

Innerhalb des vorliegenden Tierversuchs zeigten sich jedoch vor allem nach 6 Wochen deutliche Anzeichen abgelaufener Entzündungsprozesse innerhalb des Kniegelenks. Da diese Prozesse während der ersten Versuchsreihe mit nativen Konstrukten nicht zu detektieren waren, musste ein negativer Einfluss von Genipin auf das Inflammationsgeschehen angenommen werden. Makroskopisch ließ sich dies bereits in Ansätzen nachvollziehen. So zeigte das 6-Wochen-Implantat eine deutliche Aufschwemmung ohne dass dabei die definierte Struktur der KF noch zu erkennen war. Im Konsens dazu fand sich eine stark herabgesetzte Reißfestigkeit *in vivo*. Histologisch konnte aufgrund der schwer durchführbaren Präparation der Implantate kein Tier nach 6 Wochen untersucht werden. Eine genaue histologische Untersuchung mit Zelltypenverteilung wäre zur Abgrenzung eines stattfindenden Inflammationsprozesses sicher sinnvoll gewesen. Ebenso hätte auch eine Untersuchung der intraartikulären Flüssigkeit *in vivo* zum Ausschluss von Entzündungsparametern beitragen können. Dies wäre entweder durch eine Messung und Differenzierung von Zellen wie Leukozyten oder durch die Bestimmung von Zytokinen wie TNF- α und IL-1 und Immunglobulinen direkt aus dem Gelenkpunktat oder in Organen des retikuloendothelialen Systems möglich. Song et al. untersuchten daher die Zellen und Zytokinproduktion in Lymphknoten und Milz von Mäusen nach subkutaner Implantation eines Kollagengerüsts, um eine Aussage über die Abwehrreaktion des Körpers zu erhalten. Sie nutzten Antikörper gegen T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren und bestimmten die Höhe der Zytokine Interleukin 4 und Interferon γ . Diese Messungen zeigten eine dem bovinen Kollagen vergleichbare Immunogenität [163]. Allerdings sind derartige Untersuchungen meist mit erheblichem Material- und Kostenaufwand verbunden. In vorliegender Studie wurde daher darauf verzichtet.

Die Histologie der 6-Monatstiere hingegen ließ ein Entzündungsgeschehen nicht mehr nachvollziehen. Hier fanden sich zwar eine ausgeprägte Vaskularität und Hyperzellularität, die jedoch vor allem auf fibroblastäre Einwanderung zurückzuführen war und sich analog zur Histologie der Vorgängerstudie verhielt.

4.4 Der Tierversuch im Vergleich zu anderen Methoden

4.4.1 Der Tierversuch

Aufgrund der ausgezeichneten mechanischen Stabilität, sowie der guten Biokompatibilität *in vitro*, wurde 0,5 % Genipin als Crosslinkingsubstanz für die Konstrukte des Tierversuchs ausgewählt. Diese Konstrukte wurden anschließend Schweinen der Rasse Minipig implantiert.

Die Wahl eines geeigneten Tiermodells, das die Situation im Menschen so nah wie möglich abbilden kann, ist dabei für die Aussagekraft einer Studie wegweisend.

Um die biomechanische Situation angemessen wiederzuspiegeln zu können, sollte deshalb ein Großtier mit ähnlicher Wachstumsrate und Skelettmaturationszeit herangezogen werden [104, 164], um mögliche Störfaktoren zu vermeiden [165]. Aus diesem Grund verglichen 1998 Xerogeanes et al. die ACL von Schwein, Ziege und Schaf und stellten fest, dass das ACL des Schweins mit dem des Menschen vergleichbar ist. Wegen seiner Ähnlichkeit zum menschlichen Knie, der Größe und Affinität mit anderen großen Tiermodellen bei der ACL Rekonstruktion wurde das Schweinmodell favorisiert [102]. Wichtig für die Vergleichbarkeit war auch, dass die Stabilität des Kniegelenks beim Schwein v. a. abhängig vom ACL ist und auch die hämatologischen Charakteristika denen des Menschen entsprechen [166]. Ein Minipig kann diese Kriterien hinlänglich erfüllen [165] und wurde deshalb für diese Arbeit ausgewählt.

Hauptproblem der meisten innerhalb des Tissue Engineering entwickelten Scaffolds ist die geringe biomechanische Stabilität in der Phase des Remodelings [152, 162, 167]. Dieser Effekt konnte auch in der Vorgängerstudie von Bischofsberger beobachtet werden, in der sehr geringe Reißfestigkeitswerte des ACL 6 Wochen nach Implantation gemessen wurden. Als Grund hierfür wurde neben der geringen initialen Reißfestigkeit vor allem eine Degradation des Konstrukts durch Kollagenasen in der Remodelingphase angeführt.

Basierend auf dieser Tatsache wurde im Rahmen dieser Studie ein Konstrukt entwickelt, das sich *in vitro* durch eine höhere mechanische Stabilität, sowie eine Resistenz gegenüber Kollagenasen auszeichnete.

Nach Implantation dieser Konstrukte, konnte im postoperativen Verlauf eine gute Wundheilung ohne Auftreten von äußeren Entzündungsreaktionen verzeichnet werden. Die Tiere zeigten bis etwa 2 Wochen nach Operation noch eine Schonhaltung, sowie ein hinkendes Gangbild. Danach ließ sich visuell keine große Instabilität oder Einschränkung des operierten Hinterlaufs verifizieren. Inwieweit es in dieser Zeit zu Rupturen oder Komplikationen kam, war nach 6 Wochen nicht mehr zu evaluieren. Dies darf aber bei der Beurteilung der Ergebnisse und der Frage der Übertragbarkeit auf den Menschen nicht unberücksichtigt bleiben, da die meisten Patienten post operationem ein differenziertes Nachbehandlungsprotokoll mit Entlastung der Gliedmaßen und gezielten physiotherapeutischen Maßnahmen über Wochen bis Monate durchführen. Die Schweine hingegen belasteten nach der Operation das operierte Bein sofort vollständig, wodurch das Risiko einer Reruptur oder eines Implantatversagens deutlich erhöht war. Trotzdem ließen sich 6 Wochen nach Implantation keine degenerativen Anzeichen im Sinne eines Knorpelschadens oder verstärkter Gewebereaktion im Kniegelenk nachweisen. Allerdings wirkten die Implantate in ihrer Struktur aufgeweicht. Ihre dunkle Farbe aufgrund der Genipincrosslinkings war fast vollständig verschwunden und der Großteil des Konstrukts von Entzündungsgewebe ersetzt. Bei einem der Tiere konnte am femoralen Bohrkanaal ein Abszess festgestellt werden, der makroskopisch Anteile von degradiertem Fasergewebe enthielt. Die Ursachen könnten zum einen in der Inflammationsreaktion der Tiere auf den implantierten Fremdkörper liegen, zum anderen besteht auch die Möglichkeit zytotoxischer Einflüsse des Konstrukts selbst auf seine Umgebung mit sich anschließender Gewebsreaktion, ähnlich den Effekten bei Gebrauch von Glutaraldehyd als Crosslinker.

Bei der Untersuchung der 6-Monatstiere konnten diese Effekte nicht mehr beobachtet werden. Alle Tiere wiesen hier jedoch dezente Knorpeldefekte und degenerative Anteile auf, die vor allem im Bereich der Area intercondylaris lokalisiert waren. Ein mögliches Reiben des Konstrukts in der interkondylären Notch könnte dafür eine mögliche Erklärung liefern.

Obwohl es nach Eröffnen der Gelenkkapsel sowohl nach 6 Wochen als auch nach 6 Monaten Probleme gab, das Konstrukt von umgebenen Strukturen wie

Synovia abzugrenzen, konnten dennoch - vor allem nach 6 Monaten - ligamentäre Strukturen (s. Abb. 18) nachgewiesen werden, die sich an der Stelle des nativen ACL gebildet hatten. Zusätzlich zeigten sich auch bindegewebige Strukturen, die von der Rückseite der Patella bis zum Ansatz des vorderen Kreuzbandes reichten. Hierbei könnte es sich um Äquivalente eines Cycloppsyndroms handeln, wie sie auch beim Ersatz des humanen ACL durch autologes Sehnenmaterial beschrieben werden [168]. Es könnte sich aber auch um Residuen eines infrapatellaren Kontraktursyndroms handeln.

Die Ursachen hierfür sind bislang leider ungeklärt, jedoch scheinen ein falscher Bohrkanal oder ein defektes Implantat die Entstehung zu beeinflussen.

Histologisch konnte eine sichtbare Ausrichtung der KF in Zugrichtung des Kreuzbandes nachgewiesen werden. Daneben fand sich eine deutlich erhöhte Gefäßdichte (s. Abb. 24-27).

Vom biomechanischen Gesichtspunkt aus betrachtet, unterschieden sich die Implantate erheblich von den nativen ACL der Minipigs. Die 6-Wochen-Konstrukte besaßen nur noch etwa 3 % der Reißfestigkeit der *in vitro* Konstrukte, was etwa 1 % der Reißfestigkeit eines nativen ACL entspricht. Nach 6 Monaten erhöhten sich diese Werte auf 55,1 % bzw. 15,8 % im Vergleich zu den nativen ACL.

Die Ergebnisse der Spannungsmessungen verhielten sich analog.

Auch für die gängigen Operationsmethoden, insbesondere dem autologen Sehnenersatz, ist ein derartiger Stabilitätsverlust beschrieben. Laut Ekdahl et al. kann sich die max. Reißfestigkeit eines Transplantats auf bis zu 25 % des Ursprünglichen verringern [152].

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Müller et al., die von Verlusten bis zu 75 % berichten [153], wobei nach Scheffler dabei die Nekroserate bis zu 30 % betragen kann [162]. Ursachen hierfür waren neben einer Reruptur des betroffenen Konstrukts insbesondere eine unzureichende Vaskularisierung des Implantats innerhalb der ersten postoperativen Wochen. Diese Beobachtungen konnten bereits in der zuvor durchgeführten Studie mit nativen KF gemacht werden. Hier stellte sich das eingesetzte Implantat nach 6 Wochen zwar bereits synovial überzogen, aber mit einer noch geringen, jedoch ausreichenden Vaskularisierung dar [151].

Nach 6 Monaten hingegen stieg die Vaskularisierung deutlich an, obwohl die Ausrichtung der gebildeten KF noch diffus blieb. Dies konnte übereinstimmend in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Die KF-Struktur war insgesamt aufgelockert, jedoch in Zugverlauf des ACL ausgerichtet und mit zahlreichen Gefäßen durchsetzt. Diese Ergebnisse verhielten sich analog zu den Beobachtungen von Shino et al. in Humanuntersuchung [169, 170]. Sie sahen beim Vergleich zwischen Allo- und Autografts eine zunehmende Gefäßversorgung des Implantats von der 6. bis zur 15. Woche mit einem Rückgang der Vaskularität mit Anzeichen an ein natives ACL bis zur 52. Woche. Erst zu diesem Zeitpunkt wurde eine dem nativen ACL ähnliche histologische Struktur nachgewiesen. Aufgrund des erhöhten Gefäßgehalts nach 6 Monaten kann in vorliegender Arbeit davon ausgegangen werden, dass der Remodelingprozess noch bei weitem nicht abgeschlossen war. Dies darf ebenfalls bei einer Beurteilung der biomechanischen Ergebnisse nicht vernachlässigt werden. Mehrere Autoren berichten in diesem Zusammenhang von einem z.T. deutlichen Reißfestigkeitsverlust aufgrund einwachsender Gefäße [171–173]. Somit sind in den ersten Wochen nach der Operation Implantate zunächst avaskulär und werden erst im Verlauf der Remodelingprozesse von Blutgefäßen durchzogen [162, 174, 175]. In dieser Phase besteht somit die höchste Gefahr der Insuffizienz des Implantats aufgrund von Überdehnung bzw. Überlastung, was Instabilitäten zur Folge haben kann. Ein späterer Untersuchungszeitpunkt wäre daher sowohl hinsichtlich der Beurteilung des Remodelings, als auch der Biomechanik sinnvoll gewesen.

Um die gewonnenen Ergebnisse suffizient bewerten zu können, musste zudem beachtet werden, dass einige Tierstudien von einer frühen Phase der Implantatnekrose berichten [176, 177], die ein weiterer Grund für die hohen Stabilitätsverluste nach 6 Wochen gewesen sein könnte. Dies wurde jedoch beim Menschen bisher nicht beobachtet [161]. Insgesamt muss bei der Übertragung des Tiermodells auf den Menschen berücksichtigt werden, dass menschliche Grafts eine deutlich längere Remodelingphase zeigen als tierische, wie Abb. 28 zeigt.

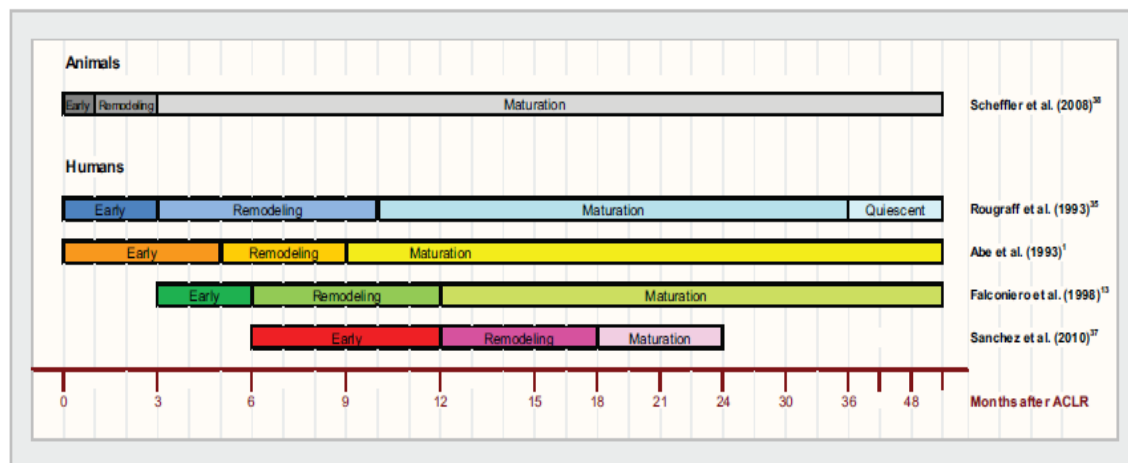


Abb. 28: Unterschiede im Ligamentisierungsprozess zwischen menschlichen und tierischen Kreuzbandtransplantaten (aus: Claes S, Verdoonk P, Forsyth R, Bellemans J. The „Ligamentization“ Process in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. Am J Sports Med 2011, 39(11): S. 2481).

Auch neuere Operationstechniken, die sich noch genauer an der humanen Anatomie orientieren, sowie eine adäquate Rehabilitation nach dem Eingriff, haben bzgl. des Einheilens eines Transplantats und dessen postoperativer Stabilität einen entscheidenden Einfluss.

Abschließend sollte auch das biomechanische Testverfahren kritisch bewertet werden. In vielen Studien, wie auch in dieser, wurde die biomechanische Kraftmessung nur uniaxial durchgeführt. In vivo sind jedoch besonders Rotationsbewegungen von großer Bedeutung, da hier das ACL seine größte Spannung erfährt. Aufgrund fehlender Apparatur konnte im Rahmen dieser Studie nicht näher auf diese Komponente eingegangen werden. Neue, robotergesteuerte Messsysteme, wie bei Woo et al. beschrieben, tragen diesem Zusammenhang Rechnung [40].

4.4.2 Abgrenzung zu anderen Produkten/Materialien

4.4.2.1 Autogene und allogene Transplantate

Die Zahl der Kreuzbandrupturen wird auch in den kommenden Jahren weiter ansteigen.

Goldstandard bisher ist der autologe Ersatz mittels eines Sehnenstransplantats. Unterstützt durch sich immer weiter der anatomischen Struktur adaptierende Operationssysteme, führt dieser in der heutigen Zeit zu stabilen klinischen Ergeb-

nissen. Jedoch geht dies meist mit einer hohen Komorbidität einher. Diese sog. „donor-site morbidity“ ist je nach Transplantationstyp verschieden. BTB-Autografts, die von vielen Operateuren als die ultimative Transplantationsoption angesehen werden, können in diesem Kontext zu Problemen wie vorderem Knie-schmerz, Steifigkeit des Knies, Arthrofibrose, Patellarrupturen oder auch -frak-turen, sowie zu einer Quadrizepsschwäche mit Extensionsdefizit führen.

Auf der anderen Seite besteht im Vergleich dazu bei Hamstring-Autografts neben einer geringen initialen Reißfestigkeit die Gefahr einer Schwächung der ischio-cru-ralen Muskulatur mit einem Rotationsdefizit von bis zu 20 % im Kniegelenk, sowie insgesamt höhere Raten an Rerupturen und Knielaxizität im follow-up.

Aufgrund dieser Kritikpunkte bemüht sich die Wissenschaft weiter um die Er-schließung neuer Möglichkeiten und die Entwicklung optimaler Stoffe und Sub-stanzen für einen adäquaten Kreuzbandersatz.

So ist der Einsatz von Allografts der letzten Dekade deutlich angestiegen [63]. Bis zum heutigen Tag stellen die Patellarsehen, die Achillessehne, sowie die Fascia lata die am häufigsten verwendeten Allografttypen dar und zeigen insge-samt gute klinische Ergebnisse [178–181].

Noyes et al. berichten diesbezüglich von 89 % guter bis exzellenter Ergebnisse nach ACL-Rekonstruktion bei 40 Monaten follow-up [181].

Im Vergleich mit einem BTB-Autograft konnten Shino et al. bei der Untersuchung von 92 Patienten sogar überlegene Ergebnisse im Kniestabilitätstest nachweisen [170].

In einer aktuellen Vergleichsstudie konnte Poehling für die Allograftgruppe in Be-zug auf Schmerz, physikalische Funktion, Bewegungsumfang sowie Aktivitäts-level signifikant bessere Ergebnisse nachweisen [182].

Trotzdem raten jedoch alle Autoren vom Einsatz von Allografts als primärem Kreuzbandersatz ab. Gründe dafür sind das Risiko Infektionskrankheiten wie z.B. HIV, etc. zu übertragen, sowie das suboptimale Einheilen des Allografts in das Kniegelenk [183–185].

Zudem weisen Allografts in manchen Studien große Stabilitätsverluste auf. Dustmann et al. berichten von einem deutlich besseren Ergebnis nach ACL-Rekonstruktion bei Verwendung eines autogenen Sehnentransplantats anstelle eines allogenen Konstruktes [186].

Die Ursachen sehen die Autoren vor allem in einer höheren Expression von Myofibroblasten, sowie in einer besseren und schnelleren Neuorganisation der Ausrichtung der KF, dem sog. „Crimp Pattern“. Zusätzlich scheinen azelluläre Implantate den nativen in ihrer Stabilität unterlegen, was wiederum eine Teilerklärung für die geringe Reißfestigkeit der hier vorgestellten Konstrukte nach 6 Wochen liefern könnte [187].

Auch Jackson et al. gehen von einer langsameren biologischen Inkorporation, einer verlängerten Entzündungsreaktion, sowie einer großen Abnahme der mechanischen Stabilität im Zeitverlauf aus [188]. Zudem erfordert das Sterilisieren von Allografts eine Bestrahlung mittels Gammastrahlen. Dies führt zu einer deutlichen Abnahme der Reißfestigkeit und zu einem höheren Risiko des Implantatversagens. Daneben ist auch der Kostenfaktor bei der Verwendung von Allografts nicht zu unterschätzen [189]. Insgesamt spielen daher Allografts allenfalls bei Re-Re-Rupturen des VKB in Deutschland eine Rolle.

Dem Wunsch nach einem stabilen, kostengünstigen und nebenwirkungsarmen Ersatz des ACL, wurde in der Entwicklung des in dieser Arbeit vorgestellten Kollagenkonstruktes Rechnung getragen.

4.4.2.2 Xenogene Materialien

Aufgrund o.g. Kritikpunkte bemüht sich die Wissenschaft weiter um die Entwicklung optimaler Stoffe und Substanzen für einen adäquaten Kreuzbandersatz. Der ideale Ersatz sollte dabei biodegradierbar, stabil und gut biokompatibel sein. Daneben sollte er ein ähnliches mechanisches Verhalten wie ein natives ACL aufweisen, die Bildung von ligamentösem Gewebe fördern sowie zusätzlich mit einer Rate abgebaut werden, die das Risiko einer Ruptur bis zum vollständigen Ersatz minimiert [190]. Daher kam es über die letzten Jahrzehnte immer wieder auch zum Einsatz neuartiger Materialien, die neben biologischen auch synthetische Anteile enthielten.

In der vorliegenden Arbeit, sowie in den beschriebenen Vorläuferstudien wurde dabei ein kollagenbasiertes Kreuzbandkonstrukt untersucht. Um einen ausreichenden Vergleich zu anderen Produkten und Materialien erreichen zu können, muss zuerst auf die Stabilität des vorliegenden Konstrukts hingewiesen werden. Bereits in der von Bischofberger [88] durchgeführten Vorarbeit mit nativen Kollagenkonstrukten zeigte sich eine mittlere Spannung von etwa 20 N/mm² (MPa) und eine max. Reißfestigkeit um 260 N. Diese Werte konnten durch Modifikation mit diversen Crosslinkern im Rahmen dieser Arbeit weiter gesteigert werden. So lag die Reißfestigkeit bei den Konstrukten des Tierversuchs unter Annahme eines Durchmessers von 4 mm bei etwa 300 N, was einer Spannung von ca. 24 N/mm² (MPa) entspricht. Die von Bischofsberger angefertigten Humankonstruktvarianten (n = 10) ergaben daneben Werte von ca. 900 N. Obwohl bisher noch kein Genipin-Humankonstrukt hergestellt wurde, kann aufgrund der überlegenen Eigenschaften auf Einzelfaser- sowie Minipig-Konstruktbasis davon ausgegangen werden, dass das in dieser Arbeit vorgestellte Genipin-Konstrukt auch auf Humankonstruktbasis verbesserte Werte erzielen kann. Unter der Annahme eines humanen Kreuzbanddurchmessers von 8 mm lassen sich so max. Reißfestigkeitswerte bis 1200 N extrapolieren.

4.4.2.2.1 Synthetische Materialien

Neben dem Einsatz von Allografts kam es vor allem gegen Ende des 20. Jahrhunderts zum vermehrten Einsatz sog. „synthetic grafts“. Diese bestehen aus verschiedenen Materialien wie Kohlefaser, Dacron, Polypropylen oder Polyester und werden entweder als vollständiges Transplantat oder zur Augmentation eines biologischen ACL-Implantats verwendet.

Dabei liegen die Vorteile besonders in der hohen initialen Reißfestigkeit, in Kombination mit der nicht vorhandenen donor-site morbidity, einer ausreichenden Verfügbarkeit, sowie einer schnelleren Rehabilitationszeit [73].

Dandy et al. verwendeten in diesem Zusammenhang als erste Kohlefasern für den Kreuzbandersatz [191]. Nach anfänglich guten Ergebnissen musste jedoch

festgestellt werden, dass diese Fasern neben einer schlechten Widerstandsfähigkeit gegen Rotationskräfte auch das Risiko von Kohleablagerungen in Leber und Knie, hier im Rahmen einer Synovitis („Kohleknie“), bergen.

GoreTex®, heutzutage noch bei Rotatorenmanschettenrupturen der Schulter im Einsatz, gilt als stabilster synthetischer Träger [192]. Hierbei wird von einem UTS von bis zu 5300 N ausgegangen, was in etwa einer Spannung von 130 MPa entspricht [145]. Trotz hoher Stabilität in den ersten postoperativen Monaten [193], konnte ein Stabilitätsverlust im weiteren Verlauf nachgewiesen werden [194, 195]. Paulos et al. ermittelten eine subjektive und objektive Verbesserung im follow-up in weniger als 50 % der Fälle, mit einer Komplikationsrate von über 70 % bei Patienten, die bereits zuvor eine ACL Rekonstruktion erhalten hatten [194]. Gründe hierfür sind, kein Einwachsen von ligamentösem Gewebe in das Band und vor allem dessen Abrieb, sog. „debris“. Diese beiden Punkte konnten bei den implantierten Kreuzbandkonstrukten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Stattdessen zeigte sich eine ligamentäre Struktur, die nach 6 Monaten sowohl eine Zellbesiedlung als auch ein Einwachsen von Blutgefäßen aufwies.

Dacron®, ein Polyester, das vor allem in der Gefäßchirurgie eingesetzt wird, sollte diese Probleme lösen. Trotz der Möglichkeit eines Zellwachstums und einem UTS von 3631 N [66, 196], zeigte sich auch hier eine erhöhte Rerupturrate [197–199] von bis zu 60 % [200]. Daneben konnten Maletius und Gilquist auch eine zunehmende Neigung zur Bildung einer degenerativen Osteoarthritis bei über 40 % ihrer Patienten nachweisen [201].

Neben Polypropylen sind Polyester wie Proflex® oder Trevira® die einzigen Materialien, die in der heutigen Zeit noch transplantiert werden. Dies liegt vor allem an ihrem ausgezeichneten Langzeitüberleben [73]. Daneben zeichnen sie sich durch eine gute Reißfestigkeit mit einem UTS von bis zu 1900 N [202] und der Fähigkeit der Gewebeintegration aus [203].

Krudwig et al. demonstrierten gute klinische Ergebnisse, vor allem in Bezug auf Zufriedenheit und anterior-posteriore-Kniestabilität und konnten zudem nur geringe radiografische Zeichen für eine OA (Osteoarthritis) im follow-up nachweisen [71].

Dennoch sprechen verschiedene Autoren von einer erhöhten Versagensquote [69, 204, 205]. Dies wird auf eine inadäquate Widerstandsfähigkeit gegen Abrieb und Torsionskräfte, sowie strukturelle Veränderungen des Implantats aufgrund unvorhersehbarer Gewebeeinfiltrationen zurückgeführt. Um dem entgegen zu wirken, wurde im Jahr 1982 das sog. „Leeds-Keio-Ligament“ entwickelt [75]. Es besteht aus gewebten, tubulär angeordneten Polyesterfasern, die aufgrund ihrer Porösität das Einwachsen von Gewebe und somit die Bildung eines Neoligaments fördern [206]. Ohne adäquate Remodelingprozesse besitzt diese Form des Kreuzbandersatzes eine durchschnittliche Reißfestigkeit von 850 N. Sie kann jedoch ein Maximum von 2000 N erreichen, wenn das Remodeling bzw. die Gewebsinfiltration optimal verläuft.

Obwohl die Ergebnisse innerhalb der ersten Jahre nach Implantation äußerst vielversprechend waren, konnten die Bänder langfristig keine ausreichend befriedigenden Ergebnisse liefern.

Murray et al. gaben eine Rerupturrate von bis zu 28 % in einem Zeitraum von 10 bis 16 Jahren nach Implantation an, die mit einer erhöhten Inzidenz von degenerativen Veränderungen im Kniegelenk vergesellschaftet waren [207].

Insgesamt bleibt für die o. g. synthetischen Materialien festzuhalten, dass sie, trotz hervorragender initialer Stabilität, aufgrund hohen Transplantatversagens, begleitender OA sowie einhergehendem Abrieb, für den klinischen Alltag obsolet sind. Im Vergleich dazu bestand in der vorliegenden Arbeit eine niedrigere anfängliche Reißfestigkeit der Konstrukte. In keinem der untersuchten Kniegelenke konnten jedoch Rückstände von Transplantatabrieb oder ausgeprägten, begleitenden Arthrosezeichen nachgewiesen werden.

Trotz all dieser Ergebnisse ist der Kreuzbandersatz mittels synthetischer Fasern nicht vollständig aus dem klinischen Alltag verschwunden. Mit der Einführung des sog. LARS Ligaments (Ligament Advanced Reinforcement System) erlebt diese Art des Kreuzbandersatzes sogar heute wieder eine gewisse Renaissance [76, 208]. Das Band, bestehend aus Polyethylen-terephthalat, ermöglicht ein schnelles Gewebewachstum und bietet zudem eine gute initiale Reißfestigkeit [76]. Die Ergebnisse präsentieren daneben einen zufriedenstellenden subjektiven und objektiven Outcome bis zu vier Jahre nach Implantation.

Liu et al. konnten 48 Monate nach Implantation eine höhere Kniestabilität nachweisen als mit vierfach gebündelten Hamstrings [209]. Allerdings liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine Langzeitergebnisse für diese Form der ACL-Rekonstruktion vor.

Zusätzlich wurden synthetische Materialien auch zur Augmentation von Bändern eingesetzt. Ziel dabei war es, autogenes Sehngewebe vor exzessiven Belastungen in der vulnerablen Phase des Remodelingprozesses zu schützen.

Vor diesem Hintergrund entwickelte Kennedy das sog. LAD (Ligament Augmentation Device), das mit einer speziellen Naht am autogenen Transplantat sowie am Knochen fixiert wird [210]. Es besteht aus geflochtenem Polypropylen und kann Kräfte von bis zu 1730 N [15] aushalten. Seine Steifigkeit beträgt dabei etwa 56 N/mm. Neben der Gefahr des Ausreißens des Augmentationsmaterials von der autogenen Sehne, birgt diese Konstruktion bei übermäßiger Kraftübernahme durch das LAD das Risiko einer Atrophie der Sehne, so dass kein adäquater Remodelingprozess einsetzen kann [75, 211, 212].

Außer dem LAD sind noch viele weitere Materialien zur Augmentation von autogenen Sehnen beschrieben worden. Allerdings konnte sich bisher keines in der Routinetherapie etablieren. Dennoch beeinflusste der Gedanke einer möglichen Augmentation des Transplantats auch die weiteren Überlegungen der vorliegenden Arbeit.

So wurde in einer dritten Versuchsreihe ein Konstrukt entwickelt, bei dem die KF zentral von einem FiberTape der Fa. Arthrex® stabilisiert wurden. Der Vorstellung nach sollte dieses Band vor allem in den ersten Wochen nach Implantation eine zusätzliche Verstärkung der Reißfestigkeit liefern und zugleich vor einer möglichen Ruptur schützen. Nach Abschluss eines suffizienten Remodelings der KF, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit nach 6 Monaten angedeutet, sollte seine Funktion durch das neu entstandene Ligament ersetzt werden. Hierbei zeigte sich das FiberTape nach 6 Monaten völlig eingeschlossen, die Ergebnisse sind jedoch Bestandteil einer neuen Arbeit.

4.4.2.2.2 Tissue Engineering

Mit dem Vorstoß des Tissue Engineering innerhalb des letzten Jahrzehnts, konnten die Ergebnisse bezüglich eines adäquaten Kreuzbandersatzes in neuer Form umgesetzt werden.

Tissue Engineering bedient sich dabei einer Kombination aus dreidimensionalen Trägermaterialien, sog. „Scaffolds“, mit dem Einsatz von isolierten Zellen, sowie speziellen Wachstumsfaktoren.

Als Trägermaterialien fungieren dabei biodegradierbare Polymere wie Kollagen Typ I, Seide oder auch PLLA (Poly-L-lactid).

Altmann et al. entwickelten diesbezüglich einen Kreuzbandersatz aus einer gewebten Seidenmatrix [213]. Die einzelnen Seidenfasern sind dabei in hierarchischer Form angeordnet und nach einem speziellen Verfahren ineinander verwoben. Seine mechanischen Eigenschaften ähneln stark denen eines nativen ACL, wobei Maximallasten von bis zu 2 kN und E-Module von über 350 N/mm erreicht werden können.

Mehrere Studien belegen zudem die geringe Zytotoxizität, sowie die Förderung von Zellproliferation von BMSCs (Bone Marrow Stromal Cells) [213–215].

Mit einem Scaffold aus Seide, das mit MSC (Mesenchymal Stem Cells) besiedelt war, erreichten Fan et al. in einer weiteren Studie Spannungswerte von $58,5 \pm 16,8 \text{ N/mm}^2$, was ebenfalls die guten mechanischen Eigenschaften dieses Materials bekräftigt [216].

Neben Seide sind jedoch auch einige andere künstliche Polymere, wie PGA (poly-glycolic acid), PLA (poly-lactic acid), PLAGA (poly-lactic acid-co-glycolic acid), DTE-carbonat (desaminotyrosyltyrosinethyl-carbonat), sowie PCL (poly-caprolacton) Gegenstand aktueller Forschung. Diese bieten den Vorteil einer ausreichenden Verfügbarkeit, sowie keiner Krankheitsübertragung. Des Weiteren werden sie so konstruiert, dass sie über einen gewissen Zeitraum hinweg abgebaut werden können und damit keine Fremdkörperreaktion auf lange Sicht hervorrufen. Ihre mechanische Stabilität kann dabei anhand des Grades der Polymer-Kristallinität, ihrem Molekulargewicht oder dem Verhältnis zu etwaigen Kopolymeren variiert werden [217]. Ähnliche Überlegungen waren auch die Grundlage der vorliegenden Studie. Das eingesetzte Rattenkollagen sollte in einem

ausreichenden Zeitrahmen im Zuge des Remodelingprozesses durch körpereigenes ersetzt werden. Uhlig konnte diesen Prozess bereits anhand immunhistochemischer Färbungen mit Ratten- und Schweineantikörpern für die Vorgängerstudie belegen [106]. Nach 6 Monaten konnte kein Rattenkollagen im neugebildeten ACL im Schwein nachgewiesen werden. Auch in der vorliegenden Arbeit ließ sich histologisch und biomechanisch diese beginnende Umstrukturierung des Transplantats erkennen. Inwieweit es zu Fremdkörperreaktionen o.ä. gekommen ist, ließ sich histologisch jedoch nicht abschließend aufarbeiten, da nach 6 Monaten bereits eine deutliche Gefäß- und Fibroblasteninfiltration des Implantats stattgefunden hatte. Anreicherungen von Fremdkörperriesenzellen oder Immunzellen waren hingegen in der Durchlichtmikroskopie nicht zu erkennen.

In einer von Lu et al. durchgeführten Studie, zeigten sich hinsichtlich Zellantwort, Biomechanik und Materialdegradation vor allem PLLA-Substanzen wie PGA und PLAGA als überlegen [218]. Bezüglich der Auswirkungen dieser Materialien auf Zellproliferation und Adhäsion, konnte Heckmann für PLA eine homogene Zellbesiedlung nachweisen, die in Zelldifferenzierungsgrad und Zusammensetzung der ECM (Extracellularmatrix) denen nativer Ligamente glich [219].

Laurencin et al. entwickelten auf dieser Basis ein dreidimensionales, geflochtenes, zellbesiedeltes Scaffold aus PLLA [85, 190, 218]. Die Kontrolle der Porengröße mittels der speziellen Flechttechnik, erlaubt dabei eine optimale Versorgung mit Nährstoffen, sowie ein beschleunigtes Einwachsen von Zellen und Gewebe in der Remodelingphase.

In einer in vivo Vorläuferstudie an Kaninchen, ließen sich keine Unterschiede in der Reißfestigkeit zwischen dem Konstrukt und dem nativen ACL nachweisen. Zudem gewährleistet die spezielle Flechttechnik einen gewissen Schutz vor Ruptur und Abrieb. Dabei scheint eine hierarchische Struktur, die sich an der anatomischen Ultrastruktur von Ligamenten orientiert und nicht nur aus parallel angeordneten Faserbündeln besteht, Hauptursache für die guten mechanischen Ergebnisse zu sein. Allerdings sind bei der Analyse des ACL Kaninchen als Tiermodell aufgrund der Größe und der sehr guten Regenerationsfähigkeit im Vergleich zu einer Studie am Großtier bei der Analyse des ACL eher ungeeignet.

Obwohl es noch keine validen Langzeitergebnisse, sowie humane Studien gibt, besitzen diese Konstrukte dennoch das Potential, bald als adäquater Kreuzbandersatz zu fungieren.

Trotz zahlreicher Untersuchungen von synthetischen Materialien für biomedizinische Anwendungen, gilt reines Kollagen aufgrund seiner niedrigen Antigenität [220] der Chemotaxis fördernden Oberfläche [221], der hohen Biokompatibilität und Degradationsfähigkeit [141, 222] immer noch als Trägersubstanz der Wahl bei der Entwicklung neuer Konstrukte im Bereich des Tissue Engineerings. Allerdings reichen die mechanischen Eigenschaften von Kollagengels, porösem Kollagen bzw. Kollagenscaffolds bisher nicht an die biologischen Verhältnisse heran. Zudem ist die Fähigkeit von Zellen, während des Remodelingprozesses schnell widerstandsfähiges Kollagen zu synthetisieren, begrenzt [223]. Dieser Sachverhalt war auch in der vorliegenden Arbeit zu erkennen, was die deutlichen Stabilitätsverluste insbesondere 6 Wochen nach Operation belegen.

In vergleichbaren anderen Arbeiten werden Kollagenscaffolds oder -fasern zu meist mittels eines Extrusionsverfahrens oder elektrochemischer Methoden, wie Elektrosinning aus Typ I Kollagen gebildet, das in der Regel aus Haut und Sehnen von Tieren gewonnen wird [224–227]. Diese werden nach vorgeschriebenen Prinzipien verknüpft und häufig einem Crosslinking unterzogen [89, 228–230]. Länge, Dicke und Molekulargewicht sind dabei vollständig variierbar.

In einer von Kato et al. durchgeführten Studie wiesen KF, die nach den o.g. Prinzipien gebildet wurden, ähnliche mechanische Eigenschaften auf wie KF aus Rattenschwänzen [140].

Dunn et al. konnten in einem darauf aufbauenden Rattenmodell 20 Wochen nach Implantation einen Anstieg der initialen Reißfestigkeit, sowie die Bildung von neoligamentären Strukturen nachweisen [135]. Allerdings wiesen mehr als 50 % der eingesetzten ACL Rupturen auf, was die Schwierigkeit beim Einsatz von Kollagenscaffolds in vivo unterstreicht. Es zeigte sich jedoch eine adäquate Einheilung des Implantats in den Knochen. Ähnliches konnte auch im Rahem der Vorgängerarbeiten von Bischofsberger et al. gesehen werden. Allerdings wies hier kein implantiertes Konstrukt weder nach 6 Wochen noch nach 6 Monaten eine Ruptur auf.

Cavallaro et al. nutzten daneben geflochtene Kollagenfasern als ACL-Ersatz und konnten in einer Pilotstudie eine gute zelluläre Infiltration, sowie 12 Wochen nach Operation eine Neoligamentbildung aufzeigen. Allerdings fehlen auch hier die Ergebnisse im Langzeitverlauf [231].

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Kollagenaufbereitungsverfahren, nutzten Chvapil et al. im Rahmen ihrer Studie an Ziegen präformierte, aus nativen Sehnen gewonnene und speziell wiederaufbereitete Kollagenfasern als Kreuzbandersatz [232]. Diese wurden im Vorfeld zusätzlich einem Crosslinking mit HMDI unterzogen.

Im Vergleich zu den Studien von Kato et al. und Dunn et al. konnte hier jedoch ein starker Abfall der maximalen Reißfestigkeit nach Implantation auf bis zu 10 % ermittelt werden. Diese Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. 6 Wochen nach Implantation waren Abnahmen der maximalen Reißfestigkeit auf weniger als 10 % des Ausgangswerts festzustellen. Diese stiegen jedoch bis 6 Monate nach Operation auf über 50 % der initialen Reißfestigkeit an, passend zum Befund von Chvapil, der 6 Monate nach Implantation histologisch bereits 50 % der Fasern durch Neoligament ersetzt vorfand. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch Crosslinking zwar die Resorptionsrate des Konstrukts, jedoch nicht die mechanische Stabilität in vivo beeinflusst werden kann.

Ähnliches wurde auch von Cabaud et al. beschrieben, deren ACL-Implantate aus PGA zwei Wochen nach Operation 17 %, 5 Wochen danach 9 % und 4 Monate danach 35 % der initialen Reißfestigkeit aufwiesen [233]. Möglicher Grund für diese Diskrepanzen zur Studie von Dunn et al. ist dabei evtl. die Wahl des Tiermodells (Ziege → Kaninchen) und die damit verbundene Variation der Heilungszeit.

Daneben konnten Chvapil et al. jedoch auch eine vom Verarbeitungsmodus abhängige Heilungs- und Remodelingtendenz der ACL in ihrer Studie erkennen. So wiesen KF, die ein geringes Ausmaß an Crosslinking erfahren hatten, nach 3 Monaten eine deutlich höhere zelluläre Infiltration und Neovaskularisation auf, was sich mit den histologischen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit deckte. Offensichtlich führen stark gecrosslinkte KF zu einer geringen Freisetzung an

Kollagen, was zu einer Beeinträchtigung der Chemotaxis von Zellen und damit einhergehend zu einer verstärkten Produktion von Wachstumsfaktoren durch einwandernde (Entzündungs-)Zellen führt.

Neben azellulären Scaffolds beschäftigt sich das Tissue Engineering jedoch überwiegend mit dem Einsatz von zellbesiedelten Trägermaterialien, sowie der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in der regenerativen Medizin. In Kombination mit Scaffolds zeigen diese positive Einflüsse auf Bandbildung und Zellwachstum [234]. So ließ sich beispielsweise durch TGF- β , ein signifikanter Unterschied in den mechanischen Eigenschaften regenerierter Sehnen in vivo erwirken [235]. Des Weiteren erhöhen auch IGF (Insulin-like Growth Factor), PDGF (Plated Derived Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) in vitro die Zellproliferation von intratendinösen Fibroblasten und besitzen gemeinsam sogar synergistische Effekte [236].

Steinert et al. zeigten für IGF-1 sogar eine vermehrte Kollagen I- und Matrixproteinsynthese in Kreuzbandstümpfen nach Ruptur [237].

Haddad-Weber et al. [238] konnten des Weiteren für MSCs und ACL-Fibroblasten mittels BMP-12 und BMP-13 die Fähigkeit zur Ligamentisierung nachweisen. Auch unter Stimulation mit CDMP (Cartilage-derived morphogenetic Protein) und VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor) konnte eine verbesserte Sehnenheilung beobachtet werden [239, 240]. Jedoch kann durch den alleinigen Einsatz von Wachstumsfaktoren keine adäquate ACL-Heilung in vivo erzeugt werden. Vielmehr dienen sie zur Unterstützung der Regeneration bei autologem ACL-Ersatz oder der Implantation von Scaffolds. Deren Besiedlung durch verschiedener Zelltypen, vornehmlich MSC und Fibroblasten, ist Gegenstand aktueller medizinischer Forschung.

Juncosa-Melvin et al. untersuchten an Kaninchen die Auswirkungen von MSC-Besiedlung auf Kollagen- und PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)-Scaffolds, bei Ersatz des mittleren Patellarsehnedrittels [171]. Neben einem besseren histologischen Erscheinungsbild, konnten sie dabei auch deutliche Verbesserungen der Biomechanik beobachten, die etwa 50 % des nativen PT-Drittels entsprachen.

Heckmann et al. konnten unter Besiedlung von PLA-Scaffolds mittels MSCs neben fibroblastären Zellen auch die Bildung einer ligamentösen ECM nachweisen,

was die Fähigkeit von MSCs unterstreicht, sich in die gewünschten Zelltypen differenzieren zu können [219].

Neben MSCs sind auch für Fibroblasten aus Sehnen positive Einflüsse auf die mechanische Stabilität von Scaffolds in der Literatur beschrieben [241–243].

Eine aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit und hohen Verfügbarkeit ebenfalls mögliche Zellgruppe bilden Hautfibroblasten bei der Besiedlung von Scaffolds.

Gentleman et al. konnten in diesem Zusammenhang eine deutliche Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von kollagenen Scaffolds in vitro erreichen [142]. Ihre maximale Reißfestigkeit lag mit 9 MPa dabei zwar signifikant höher als bei den azellulären Scaffolds, jedoch noch deutlich unter der hier gemessenen (20 - 40 MPa) oder unter der von menschlichen Bändern (30 – 50 MPa).

Auch Tremblay et al. nutzten in ihrer in vivo Studie an Ziegen mit Hautfibroblasten besiedelte Kollagen-I-Scaffolds. 6 Monate nach Implantation konnten vollständige ligamentisierte und vaskularisierte ACL-Implantate nachgewiesen werden [244]. Ähnliches ist auch in der vorliegenden Arbeit bzw. in den zugehörigen Vorläuferstudien zu erkennen. Hier zeigte sich nach 6 Monaten eine makroskopisch definierte, „ligamentäre“ Struktur, die histologisch mit zahlreichen Blutgefäßen und Fibroblasten durchsetzt und von einer Synovialmembran umgeben ist.

Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass für einen adäquaten ACL-Ersatz eine Kombination aus geeigneten Trägermaterialien, Zellen sowie Stimulationsfaktoren von essentieller Bedeutung ist. Trotz intensiver Bemühungen konnte bisher noch keines dieser Implantate in vivo eine ausreichende mechanische Stabilität über einen längeren Zeitraum aufweisen.

4.4.2.2.3 Xenografts

Aufgrund des hohen Bedarfs an alternativen Verfahren, sowie der Stagnation in manchen Forschungsbereichen, wurden in der letzten Zeit erneute Versuche unternommen, auch Xenografts als Kreuzbandersatz zu etablieren.

Bereits McMaster et al. hatten Mitte der 80er Jahre den Einsatz verschiedener Xenografts, vornehmlich Rindersehnen, im Tiermodell getestet und relativ gute mechanische Ergebnisse erzielen können [80, 245].

Van Steensel et al. implantierten in der Folge 40 Patienten Kreuzbänder aus Glutaraldehyd-gecrosslinkten Rindersehnen [83]. Zwar konnte keine Host-versus-Graft-Reaktion beobachtet werden, jedoch wiesen viele Knie deutliche Synovitiszeichen auf, die vermutlich auf das verwendete Glutaraldehyd zurückzuführen waren. In der Folge entwickelte sich zwei bis 24 Monate nach Implantation bei etwa 50 % der Patienten ein instabiles Knie, dessen vornehmliche Ursache Rupturen des Implantats waren. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz in der Kreuzbandchirurgie für viele Jahre kaum noch beachtet.

Erst Stone et al. konnten in ihren Studien zehn Patienten mit einem erfolgreichen Einsatz von Schweine-Patellarsehnen als Kreuzbandersatz vorstellen [190, 246–248]. Mehr als 80 % dieser Patienten wiesen dabei zwei Jahre nach Implantation ein zufriedenstellendes Ergebnis auf. Insgesamt wurden nur leichte Abstoßungserscheinungen beobachtet, mit einem Gipfel nach 6 Monaten. In einer Vorläuferstudie an 20 Rhesusaffen, konnte hierzu bereits gezeigt werden, dass die Xenografts sowohl den Remodelingprozess fördern, als auch vergleichbare mechanische Eigenschaften 12 Monate nach Implantation aufweisen [249]. Allerdings wurden insgesamt geringere UTS, Steifigkeits- und E-Modulwerte für die Schweinegrafts beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen des Tierversuchs dieser sowie der Vorläuferarbeit weitestgehend überein. Auch hier ließen sich sowohl histologische Remodelingvorgänge, als auch eine im Zeitverlauf zunehmende Stabilität des Implantats 6 Monate postoperativ nachweisen. Inwieweit allerdings dieser Prozess vorangeschritten ist und ob eine dem nativen ACL vergleichbare Reißfestigkeit erreicht worden wäre, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht geprüft werden und sollte deshalb Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.4.3 Ausblick

Trotz der Bemühungen des Tissue Engineering in den letzten Jahren adäquate Materialien für den Kreuzbandersatz zu entwickeln, konnte bisher noch kein entscheidender Durchbruch erzielt werden. Wegen ihrer optimalen Eigenschaften besitzen jedoch Scaffolds aus Kollagen das größte Potential auf lange Sicht hin dieses Ziel verwirklichen zu können. Allerdings bergen die hohe

dreidimensionale Komplexität des ACL, der starke Einfluss der ECM auf die Regeneration, sowie die einzigartigen mechanischen Anforderungen an das ACL Schwierigkeiten, die es zu überwinden gilt, um nachhaltig Fortschritte in der regenerativen Chirurgie des ACL zu erzielen.

5 Zusammenfassung

Aktueller Goldstandard bei der Rekonstruktion des ACL des Menschen sind autologe Transplantate. Diese sind allerdings je nach Entnahmeort mit einer mehr oder weniger hohen Entnahmemorbidität und dem Risiko für Folgeerkrankungen verbunden. Um dies zu umgehen, wurde ein xenogenes Kollagenimplantat aus Kollagen-I-Fasern von Ratten entwickelt und das native Konstrukt bereits in einer Vorläuferstudie getestet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Kreuzbandkonstrukte mit Hilfe diverser Crosslinker modifiziert und hinsichtlich ihrer Biomechanik, Biokompatibilität und ihres in-vivo Verhaltens untersucht.

Bewusst wurde dabei auf die Zellbesiedlung dieser Konstrukte verzichtet, da unter Berücksichtigung wirtschaftlicher Gesichtspunkte eines späteren humanen Einsatzes hierfür eine Arzneimittelzulassung notwendig gewesen wäre. Mit Hilfe der Crosslinker wurde versucht, die mechanische Stabilität sowie die Resistenz gegen kollagenabbauende Enzyme der Synovia zu erhöhen, um die Gefahr postoperativer Instabilitäten zu verringern. Dabei sollten Fragen bezüglich Immunantwort, Biokompatibilität sowie Biodegradierbarkeit genau berücksichtigt werden. Als Crosslinker wurden für einen Vergleich in vitro neben 0,5 % Genipin auch 10 % HMDI sowie Glukose und EDC/NHS herangezogen.

Dabei zeigten die Genipin-gecrosslinkten Einzelfasern die größte Reißfestigkeitszunahme, wohingegen auf Minikonstruktbasis 10 % HMDI zu den höchsten UTS-Werten führte. Ebenso ließen sich bezüglich der Biokompatibilität in vitro bei den Crosslinkern 0,5 % Genipin und 10 % HMDI Vorteile gegenüber den beiden anderen erkennen.

Schließlich erfolgte im Rahmen eines Tierversuchs an 16 Minipigs der Einbau von 0,5 % Genipin-gecrosslinkten Konstrukten als Kreuzbandersatz und anschließend die biomechanische Testung sowie nach Paraffineinbettung auch eine durchlichtmikroskopische deskriptive Auswertung der Transplantate.

Während nach 6 Wochen eine deutliche Reißfestigkeitsabnahme zu verzeichnen war, erreichte diese nach 6 Monaten wieder fast 60 % ihrer ursprünglichen UTS. Somit konnte ein Remodeling des eingesetzten Implantats angenommen werden. Dies bestätigte sich in der durchgeführten histologischen Untersuchung.

Hier war das Implantat deutlich vaskularisiert, von zahlreichen Fibroblasten durchsetzt und wies eine synoviale Deckschicht auf. Allerdings scheint vor allem wegen der Schwäche der Konstrukte nach 6 Wochen sowie den vermutlich aufgrund des Crosslinkers auftretenden Reaktionserscheinungen innerhalb des Kniegelenks ein Einsatz im humanen Bereich zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ausgereift.

Dennoch lässt sich gerade anhand des stattfindenden Remodelings das große Potential kollagenbasierter Materialien für den Kreuzbandersatz erkennen. Eine weitere Optimierung des bestehenden Konstrukts sollte deshalb forciert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Bollen S (2000) Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage. *Br J Sports Med*(34): 227–228
2. Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 für die Diagnose M23 (Binnenschädigung des Kniegelenks) nach Geschlecht und Behandlungsart
3. Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn. Krankheitskostenrechnung: Krankheitskosten 2008 für die Diagnose M23 (Binnenschädigung des Kniegelenks) in der Einrichtung Krankenhaus nach Geschlecht und Alter
4. Siegel L, Vandenakker-Albanese C, Siegel D (2012) Anterior Cruciate Ligament Injuries: Anatomy, Physiology, Biomechanics, and Management. *Clin J Sports Med*(22): 349–355
5. Garrick JG, Requa RK (2000) Anterior cruciate ligament injuries in men and women: How common are they? In: Griffin, L. Y. (ed) Prevention of non-contact ACL injuries. *Am Acad Orthop Surg*
6. Rupp S, Kohn D (2002) The anterior cruciate ligament as focus of interest. *Orthopäde*(31): 701
7. Strobel MJ, Zantop T (2010) Vorderes Kreuzband: Anatomie, Diagnostik und Operationstechnik. Endo-Press, Tuttlingen
8. Hughes G, Watkins J (2006) A risk model or anterior cruciate ligament injury. *Sports Med*(36): 411–428
9. Drenckhahn D, Benninghoff A (2003) Anatomie, 16., völlig neu bearb. Aufl, vol 1. Urban und Fischer, München
10. Müller W (1982) Das Knie: Form, Funktion und ligamentäre Wiederherstellungschirurgie. Springer-Verlag, Berlin, New York
11. Giuliani JR, Kilcoyne KG, Rue, J. P. H. (2009) Anterior cruciate ligament anatomy: a review of the anteriomedial and posterolateral bundles. *J Knee Surg*(22(1)): 148–154

12. Anderson AF, Dome DC, Gautam S et al. (2001) Correlation of anthropometric measurements, strength, anterior cruciate ligament size, and intercondylar notch characteristics to sex differences in anterior cruciate ligament tear rates. *Am J Sports Med*(29): 58–68
13. Gabriel MT, Wong EK, Woo, S. L. Y. et al. (2004) Distribution of in situ forces in the anterior cruciate ligament in response to rotatory loads. *J Orthop Res*(22): 85–89
14. Sakane M, Fox RJ, Woo SL et al. (1997) In situ forces in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads. *J Orthop Res*(15(2)): 285–293
15. Christel P (1994) Prosthetic replacement of the anterior cruciate ligament: A challenge. *Clinic Mat*(15): 3–13
16. Noyes FR, DeLucas JL, Torvick PJ (1974) Biomechanics of anterior cruciate ligament failure: an analysis of strainrate sensitivity and mechanisms of failures in primates. *J Bone Joint Surg Am*(56): 236–253
17. Woo, S. L. Y., Hollis JM, Adams DJ et al. (1991) Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex. *Am J Sports Med*(19): 217–225
18. Noyes FR, Butler DL, Grood ES et al. (1984) Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. *J Bone Joint Surg Am*(66(3)): 344–352
19. Georgoulis AD, Pappa L, Moebius U et al. (2001) The presence of proprioceptive mechanoreceptors in the remnants of the ruptured ACL as a possible source of re-innervation of the ACL autograft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*(9): 364–368
20. More RC, Karras BT, Neiman. R. et al. (1993) Hamstrings - an anterior cruciate ligament protagonist. An in vitro study. *Am J Sports Med*(21(2)): 231–237
21. O'Donoghue DH (1950) Surgical treatment of fresh injuries to the major ligaments of the knee. *J Bone Joint Surg Am*(32A): 721–738

22. Fu FH, Siebold R (2008) Assessment and augmentation of symptomatic anteromedial and posterolateral bundle tears of anterior cruciate ligament. *Arthroscopy*(24(11)): 1289–1298
23. Lobenhoffer P, Tscherne H (1993) Indikation zur vorderen Kreuzbandrekonstruktion - gegenwärtige Operationstechniken; Transplantatwahl. *Orthopäde*(22): 372–381
24. Noack W, Scharf HP (1987) Treatment of acute and chronic knee joint instability secondary to rupture of the ACL. *Sportverletz Sportschaden*(1): 13–19
25. Barrack RL, Bruckner JD, Kneisl J et al. (1990) The outcome of nonoperatively treated complete tears of the anterior cruciate ligament in active young adults. *Clin Orthop Relat Res*(259): 192–199
26. Hirshman HP, Daniel DM, Miyasaka K The fate of the unoperated knee ligament injuries. In: *Knee ligaments: structure & function*, pp 481–503
27. Kannus P, Järvinen M (1987) Conservatively treated tears of the anterior cruciate ligament. Long-term results. *J Bone Joint Surg Am*(69(7)): 1007–1012
28. Wittenberg RH, Oxort HU, Plafki C (1998) A comparison of conservative and delayed surgical treatment of anterior cruciate ligament ruptures: a matched pair analysis. *Int Orthop*(22): 145–148
29. Hinterwimmer S, Engelschalk M, Sauerland S et al. (2003) Operative and conservative treatment of anterior cruciate ligament rupture: a systematic review of the literature. *Unfallchirurg*(106(5)): 374–379
30. Johnson RJ, Beynon BD, Nichols CE et al. (1992) The treatment of injuries of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*(74(1)): 140–151
31. Meuffels DE, Favejee MM, Vissers MM et al. (2009) Ten-year follow-up study comparing conservative versus operative treatment of anterior cruciate ligament ruptures. A matched-pair analysis of high level athletes. *Br J Sports Med*(43(5)): 347–351
32. Cotton FJ, Morrison GM (2007) Artificial ligaments at the knee: a technique. *Clin Orthop Relat Res*(454): 15–16

33. Friedman MJ (1988) Arthroscopic semitendinosus (gracilis) reconstruction for anterior cruciate ligament deficiency. *Techniques in Orthopaedics*(2): 74–80
34. Howell SM (1993) Arthroscopically assisted technique for preventing roof impingement of an anterior cruciate ligament graft illustrated by the use of autogenous double-looped semitendinosus and gracilis graft. *Operative Techniques Sports Med*(1): 58–65
35. Jones KG (1970) Reconstruction of the anterior cruciate ligament using the central one-third of the patellar ligament. *J Bone Joint Surg Am*(52): 838–839
36. Marshall JL, Warren RF, Wickiewicz TL (1979) The anterior cruciate ligament. A technique of repair reconstruction. *Clin Orthop*(143): 97–106
37. McCulloch PC, Lattermann C, Boland AL et al. (2007) An Illustrated History of Anterior Cruciate Ligament Surgery. *J Knee Surg*(20): 95–104
38. Rubin RM, Marshall JL, Wang JH (1975) Prevention of knee instability: experimental model for prosthetic anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*(113): 212–236
39. Murray MM, Spindler KP, Abreu E et al. (2007) Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*(25(1)): 81–91
40. Woo, S. L. Y., Abramowitch SD, Kilger R et al. (2006) Biomechanics of knee ligaments: Injury, healing, and repair. *J Biomech*(39(1)): 1–20
41. Murray PG, Loitz BJ, Frank CB et al. (1993) Influence of exogenous growth factors on the expression of plasminogen activators by explants of normal and healing rabbit ligaments. *Biomech Cell Biol*(71(11-12)): 522–529
42. Bray RC, Leonard CA, Salo PT (2003) Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J Orthop Res*(21(6)): 1118–1123
43. Kobayashi K, Healey RM, Sah RL et al. (2000) Novel method for the quantitative assessment of cell migration: A study on the motility of rabbit anterior cruciate (ACL) and medial collateral ligament (MCL) cells. *Tissue Eng*(6): 29–38

44. Jones KG (1970) Reconstruction of the anterior cruciate ligament using the central one-third of the patellar ligament. *J Bone Joint Surg Am*(52): 838–839
45. Deehan DJ, Salmon LJ, Webb VJ et al. (2000) Endoscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament with an ipsilateral patellar tendon autograft. *J Bone Joint Surg Br*(82-B): 984–991
46. Järvelä T, Nyyssönen M, Kannus P et al. (1999) Bone-patellar tendon-bone reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Int Orthop*(23): 227–231
47. Strobel MJ, Eichhorn HJ (1996) Aktueller Stand und operative Technik der Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. *Act Chir*(30): 210–220
48. Aglietti P, Buzz R, D'Andria S et al. (1993) Patellafemoral problems after intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop*(288): 195–204
49. Bonamo JJ, Krinick RM, Sporn AA (1984) Rupture of the patellar ligament after use of its central third for anterior cruciate reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*(66A(8)): 1294–1297
50. Kartus J, Movin T, Karlsson J (2001) Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts. *Arthroscopy*(17(9)): 971–980
51. Frobell RB, Roos EM, Roos HP et al. (2010) A randomized trial of treatment for acute anterior cruciate ligament tears. *N Engl J Med*(363): 331–342
52. Hiemstra LA, Webber S, MacDonald PB et al. (2000) Knee strength deficits after hamstring tendon and patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction. *Med Sci Sports Exerc*(32(8)): 1472–1479
53. Aglietti P, Buzzi R, D'Andria S et al. (1994) Patellar tendon versus doubled semitendinosus and gracilis tendons for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*(22(2)): 211–217
54. Bartlett RJ, Clatworthy MG, Nguyen, T. N. V. (2001) Graft selection in reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Br*(83B): 625–634
55. Freedman KB, D'Amato MJ, Nedeff DD et al. (2003) Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: a metaanalysis comparing patellar tendon and hamstring tendon autografts. *Am J Sports Med*(31(1)): 2–11

56. Fulkerson J, Langeland R (1995) An alternative cruciate reconstruction graft: the central quadriceps tendon. Technical note. *Arthroscopy*(1): 252–254
57. Stäubli HU (1997) The quadriceps tendon-patellar bone construct for ACL reconstruction. *Sports Med Arthros rev*(5): 59–67
58. Chen CH, Chen WJ, Shih CH (1999) Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon-patellar bone autograft. *J Trauma*(46(1)): 678–682
59. Bach, B. R. Jr., Aadalén KJ, Dennis MG (2005) Primary anterior cruciate ligament reconstruction using fresh frozen, non-irradiated patellar tendon allograft: minimum 2 year follow-up. *Am J Sports Med*(33): 284–292
60. Indelli PF, Dillingham MF, Fanton GS et al. (2004) Anterior cruciate ligament reconstruction using cryopreserved allografts. *Clin Orthop Relat Res*(420): 268–275
61. Lawhorn KW, Howell SM (2003) Scientific justification and technique for anterior cruciate ligament reconstruction using autogenous and allogenic soft-tissue grafts. *Orthop Clin N Am*(34): 19–30
62. Busam M, Rue, J. P. H. (2007) Fresh frozen allograft anterior cruciate reconstruction. *Clin Sports Med*(26): 607–623
63. Prokopis PM, Schepesis AA (1999) Allograft use in ACL reconstruction. *The Knee*(6): 75–85
64. Cohen SB, Sekiya JK (2007) Allograft safety in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Sports Med*(26(4)): 597–605
65. Lange F (1907) Künstliche Bänder aus Seide. *Münch Med Wochenschrift*(52): 834–836
66. Lukianov AV, Richmond JC, Barret GR et al. (1998) A multicenter study on the results of anterior cruciate ligament reconstruction using a Dracon ligament prosthesis in "salvage" cases. *Am J Sports Med*(17): 380–386
67. Rostrup O (1964) Reconstruction of the anterior cruciate ligaments. *West J Surg Obstet Gynecol*(72): 199–202
68. Amis AA, Camburn M, Kepson SA et al. (1992) Anterior cruciate ligament replacement with polyester fibre. A long-term study of tissue reactions and joint stability in sheep. *J Bone Joint Surg Br*(74): 605–613

69. Amis AA, Kempson SA (1999) Failure mechanism of polyester fiber anterior cruciate ligament implants: a human retrieval and laboratory study. *J Biomed Mater Res*(48): 534–539
70. Bolton W, Bruchman B (1983) Mechanical and biological properties of the GORE-TEX expanded polytetrafluorethylene (PTFE) prosthetic ligament. *Aktuel Probl Chir Orthop*(26): 40–51
71. Krudwig WK (2002) Anterior cruciate ligament reconstruction using an alloplastic ligament of polyethylene terephthalate (PET-Trevira-hochfest). A follow-up study. *Biomed Mater Eng*(12): 9–65
72. Jenkins DH, Forster IW, McKibbin B et al. (1977) Induction of tendon and ligament formation by carbon implants. *J Bone Joint Surg Br*(59(1)): 53–57
73. Legnani C, Ventura A, Terzaghi C et al. (2010) Anterior cruciate ligament reconstruction with synthetic grafts. A review of literature. *Int Orthop (SICOT)*(34): 465–471
74. Henche HR (1990) Einbau eines Kreuzbandes aus Kunststoff - ein Arthrosemmodell? Editorial. *Arthroskopie* 3
75. Fujikawa K Clinical study of anterior cruciate ligament reconstruction with the Leeds-Keio artificial ligament. In: Friedman MJ, Ferkel RD (eds) *Prosthetic ligament reconstruction of the knee*. Saunders WB, Philadelphia
76. Lavoie P, Fletcher J, Duval N (2000) patient satisfaction needs as related to knee stability and objective findings after ACL reconstruction using LARS artificial ligament. *The Knee*(7(3)): 157–163
77. Bircher E (1930) Über Kreuzbandverletzungen. *Zentralbild Chir*(57): 2207
78. Chvapil M, Gibeault D, Wang TF (1987) Use of chemically purified and cross-linked bovine pericardium as a ligament substitute. *J Biomed Mater Res*(21): 1383–1393
79. Good L, Odensten M, Pettersson L et al. (1989) Failure of a bovine xenograft for reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Acta Orthop Scand*(60): 8–12
80. McMaster WC (1985) A Histologic Assessment of Canine Anterior Cruciate Substitution with Bovine Xenograft. *Clin Orthop Relat Res*(196): 196–201

81. Micheli E (1933) Riconstruzione di ligamenti cociate del ginocchio con tendine di canguro. *Boll Soc Piemont Chir*(3): 874–883
82. Sternemann HO, Voorhoeve A (1973) Die Kreuzbandplastiken des Kniegelenks. Ein vereinfachtes Verfahren durch Verwendung freier kryokonservativer Sehnentransplantate. *Arch Orthop Unfallchir*(74): 329–337
83. Van Steensel, C. J., Schreuder O, Van den Bosch, B. F. et al. (1987) Failure of anterior cruciate-ligament reconstruction using tendon xenograft. *J Bone Joint Surg Am*(69(6)): 860–864
84. Bell E (1995) Strategy for the selection of scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng*(1): 163–179
85. Cooper JA, Lu HH, Ko FK et al. (2005) Fiberbased tissue-engineered scaffold for ligament replacement: Design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials*(26): 1523–1532
86. Goh JC, Ouyang HW, Teoh SH et al. (2009) Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Eng*(9): 31–44
87. Skalak R, Fox CF (1988) *Tissue-Engineering*, Liss, New York
88. Bischofsberger S (2013) Biomechanische Untersuchungen von biomaterialbasierten Kreuzbandkonstrukten. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität
89. Zeugolis DI, Paul RG, Attenburrow G (2009) Crosslinking of extruded collagen fibers: a biomimetic three-demensional scaffold for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res*(89(4)): 895–908
90. Lucas GL, Cooke FW, Friis EA (1999) *A primer of biomechanics*. Springer, New York
91. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*(193): 265–275
92. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ et al. (1993) The use of ATB bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*(160): 81–88
93. Schabus R, Bosina E (2007) *Das Knie: Der Ratgeber für das verletzte Knie ; Diagnostik, Therapie und Rehabilitation bei Verletzungen des Kniegelenks*. Springer-Verlag/Wien, Vienna

94. lam MH, Fong DT, Yung LY et al. (2009) Knee stability assessment on anterior cruciate ligament injury: Clinical and biomechanical approaches. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*(1(1)): 20
95. Warren RF (1983) Primary repair of the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*(172): 65–70
96. Amiel D, Ishizue K, Harwood FL et al. (1989) Injury of the Anterior Cruciate Ligament: The Role Of Collagenase in Ligament Degeneration. *J Orthop Res*(7): 486–493
97. Akesen B, Demirag B, Budak F (2009) Evaluation of intra-articular collagenase, TIMP-1, and TNF-alpha levels before and after anterior cruciate ligament reconstruction. *Acta Orthop Traumatol Turc*(43): 214–218
98. Spindler KP, Clark SW, Nanney LB et al. (1996) Expression of Collagen and Matrix Metalloproteinase in Ruptured Human Anterior Cruciate Ligament: An In Situ Hybridization Study. *J Orthop Res*(14): 857–861
99. Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N et al. (2005) MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*(64(5)): 694–698
100. Gulotta LV, Rodeo SA (2007) Biology of autograft and allograft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Sports Med*(26): 509–524
101. Woo, S. L. Y., Vogrin TM, Abramowitch SD (2000) Healing and repair of ligament injuries in the knee. *J Am Acad Orthop*(8): 364–372
102. Xerogeanes JW, Fox RJ, Takeda Y et al. (1998) A functional comparison of animal anterior cruciate ligament models to the human anterior cruciate ligament. *Ann Biomed Eng*(26(3)): 345–352
103. Fan H, Liu H, Toh SL et al. (2009) Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model. *Biomaterials*(30(28)): 4967–4977
104. Carpenter JE, Hankenson KD (2004) Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Biomaterials*(25(9)): 1715–1722
105. Yamano T, Tsuijimoto Y, Noda T et al. (1990) Hepatotoxicity of geniposide in rats. *Food Chem Toxicol*(28): 515–519

106. Uhlig M Histologische Untersuchung eines aus Ratenkollagen gefertigten Implantates zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes beim Minipig. univ. Diss., Charité-Universität
107. Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Damink, L. H. H. O. et al. (1992) Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. *J Biomed Mater Res*(26(8)): 1091–1110
108. Avila MY, Navia JL (2010) Effect of genipin collagen crosslinking on porcine corneas. *J Cataract Refract Surg*(36): 663
109. Sung HW, Chang Y, Chiu CT et al. (1999) Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Biomaterials*(20): 1759–1772
110. Xu B, Chow MJ, Zhang Y (2011) Experimental and Modeling Study of Collagen Scaffolds with the Effects of nCrosslinking and Fiber Alignment. *Int J Biomat*: 1–12
111. Caruso AB, Dunn MG (2005) Changes in mechanical properties and cellularity during long-term culture of collagen fiber ACL reconstruction scaffolds. *J Biomed Mater Res*(73): 388–397
112. Ivanov IT (2001) Rapid method for comparing the cytotoxicity of organic solvents and their ability to destabilize proteins of the erythrocyte membrane. *Pharmazie*(56(10)): 808–809
113. Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M (2001) The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials*(22): 3145–3154
114. Nishi C, Nakajima N, Ikada Y (1995) In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J Biomed Mater Res*(29(7)): 829–834
115. Park SN, Lee HJ, Lee KH et al. (2003) Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. *Biomaterials*(24(9)): 1631–1641

116. Van Wachem, P. B., Van Luyn, M. J. A., Olde-Damink, L. H. H. et al. (1994) Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen. *J Biomed Mater Res*(28(3)): 353–363
117. Andreassen TT, Oxlund H (1985) Thermal stability of collagen in relation to non-enzymatic glycolisation and browning in vitro. *Diabetologia*(28(9)): 687–691
118. Bailey AJ, Rhodes DN, Cater CW (1964) Irridation-induced crosslinking of collagen. *Radiat Res*(22): 606–621
119. Bailey AJ, Tromans WJ (1990) Effects of ionizing radiation on the ultrastructure of collagen fibrils. *Radiat Res*(23): 145–155
120. Bowes JH, Moss JA (1962) The effect of gamma irradiation on collagen. *Radiat Res*(16): 211–223
121. Braams R (1960) The effect of electron radiation on the tensile strength of tendon. *Int J Rad Biol*(4): 27–31
122. Girton TS, Oegema TR, Grassl ED et al. (2000) Mechanisms of stiffening and strengthening in media-equivalents fabricated using glycation. *J Biomech Eng*(122(3)): 216–223
123. Grant RA, Cox RW, Kent CM (1973) The effects of gamma irradiation on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres. *J Anat*(115): 29–43
124. Kent MJ, Light ND, Bailey AJ (1985) Evidence for glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosylation in vitro. *Biomech J*(225(3)): 745–752
125. Kohn RR, Cerami A, Monnier VA (1984) Collagen aging in vitro by nonenzymatic glycosylation and browning. *Diabetes*(33(1)): 57–59
126. Ohan MP, Dunn MG (2003) Glucose stabilizes collagen sterilized with gamma irradiation. *J Biomed Mater Res*(67): 1192
127. Ohan MP, Weadock KS, Dunn MG (2002) Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen. *J Biomed Mater Res*(60): 384–391

128. Charulatha V, Rajaram A (2002) Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*(24): 764
129. Arumgam V, Naresh MD, Somanathan N et al. (1992) Effect of the strain rate on the fracture behaviour of collagen. *J Mater Sci*(27): 2649–2652
130. Chen RN, Ho HO, Sheu MT (2005) Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials*(26): 4229–4235
131. Dunn MG, Avasarala PN, Zawadsky JP (1993) Optimization of extruded collagen fibers for ACL reconstruction. *J Biomed Mater Res*(27): 1545–1552
132. Duan X, Sheardown H (2006) Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions. *Biomaterials*(27(26)): 4608–4617
133. Vader D, Kabla A, Weitz D et al. (2009) Strain-Induced Alignment in Collagen Gels. *PLoS ONE*(Article ID e5902)
134. Bajpai PK, Stull PK (1980) Glutaraldehyde cross-linked porcine heart valve xenografts and cell-mediated immune response. *Int Res Comm Syst Med Sci*(8): 642
135. Dunn MG, Tria AJ, Kato YP et al. (1992) Anterior cruciate ligament reconstruction using a composite collagenous prosthesis. A biomechanical and histologic study in rabbits. *Am J Sports Med*(20(5)): 507–515
136. Eyble E, Griesmacher A, Grimm M et al. (1989) Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells. *J Biomed Mater Res*(23): 1355–1365
137. Gendler E, Gendler S, Nimni ME (1984) Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. *J Biomed Mater Res*(18): 727
138. Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD et al. (1980) Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res*(14(6)): 753–764
139. Goldstein JD, Tria AJ, Zawadsky JP et al. (1989) Development of an reconstituted Collagen tendon prosthesis. A preliminary implantation study. *J Bone Joint Surg Am*(71(8)): 1183–1191

140. Kato YP, Christiansen D, Hahn RA et al. (1989) Mechanical properties of collagen fibres: a comparison of reconstructed and rat tail tendon fibres. *Biomaterials*(10(1)): 38–42
141. Weadock KS, Miller EJ, Keuffek EL et al. (1996) Effect of physical cross-linking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J Biomed Mater Res*(32): 221–226
142. Gentleman E, Livesay GA, Dee KC et al. (2006) Development of ligament-like structural organization and properties in cell-seeded collagen scaffolds in vitro. *Ann Biomed Eng*(34): 726–736
143. Kew SJ, Gwynne JH, Enea D et al. (2011) Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. *Acta Biomaterialia*(7(9)): 3237–3247
144. Zeugolis DI, Panengad PP, Yew, E. S. Y. et al. (2010) An in situ and in vitro investigation for the transglutaminase potential in tissue engineering. *J Biomed Mater Res*(92A): 1310–1320
145. Olde-Damink, L. H. H., Dijkstra PJ, Van Luyn, J. A. et al. (1995) Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate. *J Mater Sci Mater Med*(6): 429–434
146. Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Olde-Damink, L. H. H. et al. (1993) Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts. *Biomaterials*(13): 1017–1024
147. Yoo JS, Kim YJ, Kim SH et al. (2011) Study on genipin: a new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*(44(3)): 197–207
148. Sung HW, Huang RN, Huang LL et al. (1998) Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *J Biomed Mater Res*(42): 560–567
149. Chang Y, Hsu CK, Wei HJ et al. (2005) Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: in vitro and in vivo studies. *J Biotechnol*(120): 207–219

150. Sung HW, Huang RN, Huang LL et al. (1999) In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *J Biomater Sci Polym Ed*(10(1)): 63–78
151. Tsai CC, Huang RN, Sung HW et al. (2000) In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation. *J Biomed Mater Res*(52(1)): 58–65
152. Ekdahl M, Wang JH, Ronga M et al. (2008) Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*(16(10)): 935–947
153. Müller A, Fuchs S, Wurm M et al. (2007) Vordere Kreuzbandersatzplastik. *Trauma und Berufskrankheit*(9(2)): 122–127
154. Amiel D, Billings E, Harwood FL (1990) Collagenase activity in anterior cruciate ligament: protective role of the synovial sheath. *J Appl Physiol*(69(3)): 902–906
155. Higuchi H, Shirakura K, Kimura M et al. (2006) Changes in biochemical parameters after anterior cruciate ligament injury. *Int Orthop*(30(1)): 43–47
156. Lipowitz AJ, Wong PL, Stevens JB (1985) Synovial membrane changes after experimental transection of the cranial cruciate ligament in dogs. *Am J Vet Res*(46(5)): 1166–1170
157. Walakovitis LA, Moore VL, Bhardwaj N et al. (1992) Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum*(35(1)): 35–42
158. Hiraoka Y, Kimura Y, Ueda H et al. (2003) Fabrication and Biocompatibility of Collagen Sponge Reinforced with Poly(glycolic acid) Fiber. *Tissue Eng*(9(6)): 1101–1112
159. Pati F, Datta P, Adhikari B et al. (2012) Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *J Biomed Mater Res Part A*(100A(4)): 1068–1079
160. Rahmanian-Schwarz A, Held M, Knoeller T et al. (2014) In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold. *J Biomed Mater Res Part A*(102(4)): 1173–1179

161. Claes S, Verdonk P, Forsyth R et al. (2011) The "ligamentization" process in anterior cruciate ligament reconstruction: what happens to the human graft? A systematic review of the literature. *Am J Sports Med*(39(11)): 2467–2483
162. Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A (2008) Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*(16): 834–842
163. Song E, Yeon Kim S, Byun HJ et al. (2006) Collagen scaffolds derived from marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*(27(15)): 2951–2961
164. Carpenter JE, Thomopoulos S, Soslowsky LJ (1999) Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl): 296–311
165. Vavken P, Murray MM (2010) Translational studies in anterior cruciate ligament repair. *Tissue Eng Part B*(16(1)): 5–11
166. Shino K, Kawasaki T, Hirose H et al. (1984) Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogenic tendon graft. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br*(66(5)): 672–681
167. Abramowitch SD, Papageorgiou CD, Withow JD et al. (2003) The effect of initial graft tension on the biomechanical properties of a healing ACL replacement graft: A study in goats. *J Orthop Res*(21): 708
168. Ahn JH, Yoo JC, Ynag HS et al. (2007) Second-look arthroscopic findings of 208 patients after ACL reconstruction. *Sports Traumatol Arthrosc*(15(3)): 242–248
169. Meller R, Brandes G, Drögemüller C et al. (2009) Graft remodeling during growth following anterior cruciate ligament reconstruction in skeletally immature sheep. *Arch Orthop Trauma Surg*(129(8)): 1037–1046
170. Shino K, Nakata K, Horibe S et al. (1993) Quantitative evaluation after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. Allograft versus autograft. *Am J Sports Med*(21(4)): 609–616

171. Juncosa-Melvin N, Boivin JP, Gooch C et al. (2006) The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gelcollagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng*(12(2)): 369–379
172. Petersen W, Unterhauser FN, Pufe T et al. (2003) The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg*(123(4)): 168–174
173. Shrive N, Chimich D, Marchuk L et al. (1995) Soft-tissue "flaws" are associated with the material properties of the healing rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res*(13(6)): 923–929
174. Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL (1986) Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am*(64): 217–224
175. Kleiner JB, Amiel D, Harwood FL et al. (1989) Early histologic, metabolic, and vascular assessment of anterior cruciate ligament autografts. *J Orthop Res*(7(2)): 235–242
176. Amiel D, Kleiner JB, Poux RD et al. (1986) The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous tendon. *J Orthop Res*(4): 162–172
177. Bosch, U., Kasperczyk, W. J. (1992) Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction - a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model. *Am J Sports Med*(20): 558–566
178. Andrews M, Noyes FR, Barber-Westin SD (1994) Anterior cruciate ligament allograft reconstruction in the skeletally immature athlete. *Am J Sports Med*(22(1)): 48–54
179. Indelicato PA, Bittar ES, Prevot TJ et al. (1990) Clinical comparison of freeze-dried and fresh frozen patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament reconstruction of the knee. *Am J Sports Med*(18(4)): 335–342

180. Levitt RL, Malinin TI, Posada A et al. (1994) Reconstruction of anterior cruciate ligaments with bone-patellar tendon-bone and chilles tendon allografts. *Clin Orthop*(303): 67–78
181. Noyes FR, Barber-Westin S. D. (1996) Reconstruction of the anterior cruciate ligament with human allograft. Comparison of early and later results. *J Bone Joint Surg Am*(78(4)): 524–537
182. Peohling GG, Curl WW, Lee CA et al. (2005) Analysis of outcomes of anterior cruciate ligament repair with 5-year follow-up: allograft versus autograft. *Arthroscopy*(21(7)): 774–785
183. Jackson DW (1993) *The Anterior cruciate ligament: Current and future concepts*. Raven Press, New York
184. Malinin TI, Levitt RL, Mnaymneh W et al. Study of the retrieved whole ACL replacement allografts five year post implantation. In: Presented at the 19th meeting of the Arthroscopy Association of North America
185. Nikolaou PK, Seaber AV, Glisson RR et al. (1986) Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique. *Am J Sports Med*(14(5)): 348–360
186. Dustmann M, Schmidt T, Gangey I et al. (2008) The extracellular remodeling of free-soft-tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: a comparison study in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*(16(4)): 360–369
187. Tischer T, Aryee S, Wexel G et al. (2010) Tissue engineering of the anterior cruciate ligament-sodium dodecyl sulfate-acellularized and revitalized tendons are inferior to native tendons. *Tissue Eng Part A*(16(3)): 1031–1040
188. Jackson DW, Grood ES, Goldstein JD et al. (1993) A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med*(21(2)): 176–185
189. Cole DW, Ginn GJ, Chen GJ et al. (2005) Cost comparison of anterior cruciate ligament reconstruction: autograft versus allograft. *Arthroscopy*(21(7)): 786–790
190. Laurencin CT, Freeman JW (2005) Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach. *Biomaterials*(26(36)): 7530–7536

191. Dandy DJ, Flanagan JP, Steemeyer V (1982) Arthroscopy and the management of the ruptured anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*(167): 43–49
192. Chen J, Xu J, Wang A et al. (2009) Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices*(6(1)): 61–73
193. Ferkel RD, Fox JM, Wood D et al. (1989) Arthroscopic "second look" at the Gore-Tex ligament. *Am J Sports Med*(17): 147–153
194. Paulos LD, Rosenberg TD, Grewe SR et al. (1992) The GORE-TEX anterior cruciate ligament prosthesis. A long-term follow-up. *Am J Sports Med*(20): 245–252
195. Sledge SL, Steadman JR, Silliman JF et al. (1992) Five-year results with the Gore-Tex anterior cruciate ligament prosthesis. *Am J Knee Surg*(5): 65–70
196. McCarthy DM, Tolin BS, Schwenderman L et al. Prosthetic replacement for the anterior cruciate ligament. In: *The anterior cruciate ligament: current and future concepts*, pp 343–356
197. Arnauw G, Verdonk R, Harth A et al. (1991) Prosthetic versus tendon allograft replacement of ACL-deficient knees. *Acta Orthop Belg*(57(suppl II)): 67–74
198. Noble CA (1989) The Stryker Dracon ligament in chronic anterior cruciate ligament tears. *Am J Sports Med*(17): 723
199. Wilk RM, Richmond JC (1993) Dracon ligament reconstruction for chronic anterior cruciate ligament insufficiency. *Am J Sports Med*(21): 374–380
200. Barret GR, Line LL, Shelton WR et al. (1993) The Dracon ligament prosthesis in anterior cruciate ligament reconstruction. A four-year review. *Am J Sports Med*(21): 367–373
201. Maletius W, Gillquist J (1997) Long-term results of anterior cruciate ligament reconstruction with a Dracon prosthesis. The frequency of osteoarthritis after seven to eleven years. *Am J Sports Med*(25): 288–293
202. Letsch R, Garcia-Schumann JM (1993) Experimental evaluation of various anchoring techniques for synthetic ligaments. *Unfallchirurgie*(19(2)): 74–80

203. Lanzetta A, Capitani D, Ventura A (1991) Réparation combinée auto-hétéroplastique ligamentaire dans les laxités chroniques antérieures du genou. *Acta Orthop Belg*(4): 420–426
204. Guidoin MF, Marois Y, Bejui J et al. (2000) Analysis of retrieved polymer fiber based replacements for the ACL. *Biomaterials*(21): 2461–2474
205. Mowbray, M. A. S., McLeod, R. A. M., Barry M et al. (1997) Early failure in an artificial anterior cruciate ligament scaffold. *The Knee*(4): 35–40
206. Marcacci M, Zaffagnini S, Visani A et al. (1996) Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament with Leeds-Keio ligament in non-professional athletes. Results after a minimum 5-years follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*(4): 9–13
207. Murray AW, Macnicol MF (2004) 10-16 year results of Leeds-Keio anterior cruciate ligament reconstruction. *The Knee*(11): 9–14
208. Nau T, Lavoie P, Duval N (2002) A new generation of artificial ligaments in reconstruction of the anterior cruciate ligament. Two-year follow-up of a randomized trial. *J Bone Joint Surg Br*(84(3)): 356–360
209. Liu ZT, Zhang XL, Jiang Y et al. (2009) Four-strand hamstring tendon autograft versus LARS artificial ligament for anterior cruciate ligament reconstruction. *Int Orthop*(34): 45–49
210. Kennedy JC, Roth JH, Mendenhall HV et al. (1980) Presidential address. Intraarticular replacement in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *Am J Sports Med*(8(1)): 1–8
211. Laurencin CT, Ambrosio, A. M. A., Borden MD et al. Tissue engineering: Orthopedic applications. In: *Annual review of biomedical engineering*, pp 19–46
212. Silver FH, Tria AJ, Zawadsky JP et al. (1991) Anterior cruciate ligament replacement: A review. *J Long-Term Eff Med Implants*(1(2)): 135–154
213. Altman GH, Horan RL, Lu HH et al. (2002) Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials*(23): 4131–4141
214. Chen FH, Altman GH, Karageorgiou V et al. (2003) Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses and RGD-modified silk fibers. *J Biomed Mater Res*(67(A)): 559–570

215. Vunjak-Novakovic G, Altman GH, Horan RL et al. (2004) Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng*(6): 131–156
216. Sonnery-Cottet B, Lavoie P, Ogassawara R et al. (2010) Clinical and operative characteristics of cyclops syndrome after double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*(26(11)): 1483–1488
217. Freeman JW, Kwansa AL (2008) Recent Advancements in Ligament Tissue Engineering: The Use of Various Techniques and Materials for ACL Repair. *Biomed Engineering I*(18-23)
218. Lu HH, Cooper, J. A. Jr., Manuel S et al. (2005) Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials*(26(23)): 4805–4816
219. Heckmann L, Schlenker HJ, Fiedler J et al. (2007) Human mesenchymal progenitor cell responses to a novel textured poly(L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*(81(1)): 82–90
220. Liu Y, Ramanath HS, Wang DA (2008) Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. *Trends Biotechnol*(26(4)): 201–209
221. Zhang ZG, Bothe I, Hirche F et al. (2006) Interactions of primary fibroblasts and keratinocytes with extracellular matrix proteins: contribution of alpha2beta1 integrin. *J Cell Sci*(119(Pt 9)): 1886–1895
222. Yahyouché A, Zhidao X, Czernuska JT et al. (2011) Macrophage-mediated degradation of cross-linked collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*(7(1)): 278–286
223. Cheema U, Nazhat SN, Alp B et al. (2007) Fabricating tissues: analysis of farming versus engineering strategies. *Biotechnol Bioprocess Eng*(12(1)): 9–14
224. Cheng X, Gurkan UA, Dehen CJ et al. (2008) An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles. *Biomaterials*(29(22)): 3278–3288
225. Matthews JA, Wnek GE, Simpson GJ et al. (2002) Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*(3(2)): 232–238

226. Yang L, Fitie, C. F. C., Van der Werf, O. K. et al. (2008) Mechanical properties of single electrospun collagen type I fibers. *Biomaterials*(29(8)): 955–962
227. Zeugolis DI, Khew ST, Yew, E. S. Y. et al. (2008) Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials*(29(15)): 2293–2305
228. Pins GD, Silver FH (1995) A self-assembled collagen scaffold suitable for use in soft and hard tissue replacement. *Mater Sci Eng*(3(5)): 101–107
229. Zeugolis DI, Paul RG, Attenburrow G (2008) Engineering extruded collagen fibers for biomedical applications. *J Appl Polym Sci*(108(5)): 2886–2894
230. Zeugolis DI, Paul RG, Attenburrow G (2008) Extruded collagen-polyethylene glycol fibers for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*(85(2)): 343–352
231. Cavallaro JF, Kemp PD, Kraus KH (1994) Collagen fabrics as biomaterials. *Biotechnol Bioeng*(43(8)): 781–791
232. Chvapil M, Speer DP, Holubec H et al. (1993) Collagen fibers as a temporary scaffold for replacement of SCL in goats. *J Biomed Mater Res*(27(3)): 313–325
233. Cabaud HE, Feagin JA, Rodkey WG (1982) Acute anterior cruciate ligament injury and repair reinforced with biodegradable intraarticular ligament. *Am J Sports Med*(10): 259–263
234. Sahoo S, Toh SL, Goh JC (2010) A bFGF-released silk/PLGA-based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesenchymal progenitor cells. *Biomaterials*(31(11)): 2990–2998
235. Anaguchi Y, Yasuda K, Majima T et al. (2005) The effect of transforming growth factor-beta on mechanical properties of the fibrous tissue regenerated in the patellar tendon after resecting the central portion. *Clin Biomech*(20(9)): 959–965
236. Costa MA, Wu C, Pham BV et al. (2006) Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. *Tissue Eng*(12(7)): 1973

237. Steinert AF, Weber M, Kunz M et al. (2008) In situ IGF-1 gene delivery to cells emerging from the injured anterior cruciate ligament. *Biomaterials*(29(7)): 904–916
238. (2010) Haddad-Weber, M.;Prager, P.; Kunz, M.; Seefried, L.; Jakob, F.; Murray, M. M.; Evans, C. H.; Nöth, U.; Steinert, A. F.: BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells. *Cytherapy*(12(4)): 505–523
239. Virchenko O, Fahlgren A, Skolund B et al. (2005) CDMP-2 injection improves early tendon healing in a rabbit model for surgical repair. *Scand J Med Sci Sports*(15(4)): 260–264
240. Wang XT, Liu P. J., Tang JB (2005) Tendon healing in vitro: modification of tenocytes with exogenous vascular endothelial growth factor gene increases expression of transforming growth factor beta but minimally affects expression of collagen genes. *J Hand Surg Am*(30(2)): 222–229
241. Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N et al. (2005) Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue-engineering. *J Biomed Mater Res Part A*(74A(3)): 338–346
242. Majima T, Funakoshi T, Iwasaki N et al. (2005) Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering. *J Orthop Sci*(10(3)): 302–307
243. Robayo LM, Moulin VJ, Tremblay P et al. (2011) New ligament healing model based on tissue-engineered collagen scaffolds. *Wound Repair Regen*(19(1)): 38–48
244. Tremblay P, Cloutier R, Lamontagne J et al. (2011) Potential of skin fibroblasts for application to anterior cruciate ligament tissue engineering. *Cell Transplant*(20(4)): 535–542
245. McMaster WC (1985) Bovine Xenograft Collateral Ligament Replacement in the Dog. *J Orthop Res*(3): 492–498
246. Kainer MA, Linden JV, Whaley DN et al. (2004) Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med*(350(25)): 2564–2571

247. Stone KR, Abdel-Motal UW, Walgenbach AW et al. (2007) Replacement of human anterior cruciate ligaments with pig ligaments: A model for anti-non-gal antibody response in long-term xenotransplantation. *Transplantation*(83(2)): 211–219
248. Stone KR, Ayala G, Goldstein JD et al. (1989) Porcine cartilage transplants in the cynomolgus monkey. III. Transplantation of alpha-galactosidase-treated porcine cartilage. *Transplantation*(65(12)): 1577–1583
249. Stone KR, Walgenbach AW, Turek TJ et al. (2007) Anterior cruciate ligament reconstruction with a porcine xenograft: A serologic, histologic, and biomechanical study in primates. *Arthroscopy*(23(4)): 411–419

7 Anhang

7.1 Verwendete Entwässerungsprotokolle

Entwässerungsprotokoll der Paraffinschnitte

| | |
|--------------------|-------|
| Wasser | 0,5 h |
| EDTA | 48 h |
| Wasser | 0,5 h |
| Ethylalkohol 70 % | 24 h |
| Ethylalkohol 80 % | 24 h |
| Ethylalkohol 80 % | 24 h |
| Ethylalkohol 96 % | 24 h |
| Ethylalkohol 96 % | 4 d |
| Ethylalkohol 100 % | 7 d |
| Xylol | 24 h |

Entwässerungsprotokoll der Paraffinschnitte im Entwässerungsautomaten

| | |
|--------------------|-------|
| Ethylalkohol 70 % | 8 h |
| Ethylalkohol 80 % | 4 h |
| Ethylalkohol 80 % | 4 h |
| Ethylalkohol 96 % | 8 h |
| Ethylalkohol 96 % | 10 h |
| Ethylalkohol 100 % | 10 h |
| Ethylalkohol 100 % | 10 h |
| Ethylalkohol 100 % | 10 h |
| Xylol | 1 h |
| Xylol | 1,5 h |
| Paraffin | 2,5 h |
| Paraffin | 2 h |

7.2 Verwendete Färbeprotokolle

Färbeprotokoll HE-Färbung

| | | |
|-----|--|----------------|
| 1. | entplasten in MEA* | 3 x 30 Minuten |
| 2. | oder entparaffinieren in Xylol | 3 x 5 Minuten |
| 3. | absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %) | je 2 Minuten |
| 4. | Aqua dest. | 2 Minuten |
| 5. | Hämatoxylin nach Harris | 7 Minuten |
| 6. | Spülen mit Aqua dest. | 3 x |
| 7. | HCL Alkohol (0,25 %) kurz eintauchen | |
| 8. | Wässern in Leitungswasser | 10 Minuten |
| 9. | Eosin* * 1 Minute eintauchen | |
| 10. | Entwässern mit 96%igen Alkohol | 2 x |
| 11. | Entwässern mit 100%igen Alkohol | 2 x |
| 12. | Xylol | 2 x 5 Minuten |

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

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

Färbeprotokoll Movat´s Pentachrom-Färbung

| | | |
|-----|--|------------|
| 1. | entplasten in MEA | 3 x 30 min |
| 2. | absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %) | je 2 min |
| 3. | Aqua dest. | 2 min |
| 4. | Alcianblau | 10 min |
| 5. | Mit Leitungswasser spülen | |
| 6. | Alkalischer Ethylalkohol | 1 h |
| 7. | Leitungswasser, fließend | 10 min |
| 8. | In Aqua dest. eintauchen | |
| 9. | Weigert´s Eisenhämatoxylin | 10 min |
| 10. | Leitungswasser, fließend | 10 min |

| | | |
|-----|-------------------------------|-------------|
| 11. | Aqua dest. | 2 min |
| 12. | Brilant Crocein-Säurefuchsin | 10 – 15 min |
| 13. | Essigsäure 0,5%ig kurz spülen | |
| 14. | PWS (Phosphorwolframsäure) 5% | 20 min |
| 15. | Essigsäure 0,5%ig kurz spülen | |
| 16. | Ethylalkohol 100 % | 3 x 5 min |
| 17. | Saffron du Gatinais | 1 h |
| 18. | Ethylalkohol 100 % | 3 x spülen |
| 19. | Ethylalkohol 100 % | 2 min |
| 20. | Xylol | 2 x 5 min |

Masson Goldner Trichromfärbung

Vorbereitung der Lösungen zum Färben:

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

Färbeprotokoll:

| | | |
|-----|--|---------------|
| 1. | Entparaffinieren in Xylol | 3 x 5 min |
| 2. | absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %) | je 2 min |
| 3. | Aqua dest. | 2 min |
| 4. | Weigert´s Eisenhämatoxylin | 4 min |
| 5. | Leitungswasser | 10 min |
| 6. | Säurefuchsin-Ponceau | 5 min |
| 7. | Essigsäure 1%ig abspülen | |
| 8. | Differenzieren unter Sicht in PMS-Orange-G | 15 s – 30 min |
| 9. | Essigsäure 1 %ig abspülen | |
| 10. | Aqua dest. spülen | |

- | | | |
|-----|---------------------------|------------|
| 11. | Lichtgrün | 5 – 10 min |
| 12. | Essigsäure 1 %ig abspülen | |
| 13. | Ethylalkohol 100 % | 3 x spülen |
| 14. | Xylol | 2 x 5 min |

Van Gieson- Färbung

- | | | |
|----|----------------------------------|-----------|
| 1. | Weigerts Eisenhämatoxylin*** | 5 min |
| 2. | in Aqua dest. spülen | |
| 3. | Salzsäurealkohol | 3 sec |
| 4. | in Aqua dest. spülen | |
| 5. | Fließwasser | 15 min |
| 6. | in Aqua dest. spülen | |
| 7. | van Gieson-Gemisch | 30 sec |
| 8. | in Aqua dest. abspülen | |
| 9. | aufsteigende Alkoholreihe, Xylol | 2 x 5 min |

Ansätze:

van Gieson-Gemisch: 100 ml gesättigte wäßrige Pikrinsäurelösung (= 1,2%ig) werden mit 10 ml 1%iger Säurefuchsinlsg. versetzt (dunkelgranatrote Färbung).

Salzsäurealkohol: 100 ml 70%iger Isopropylalkohol + 2 ml 25%ige Salzsäure

***Lösung A: 1 g Hämatoxylin in 100 ml 96%igem Ethanol lösen. Eventuell etwas erwärmen. Die Lösung sollte eine Woche reifen.

***Lösung B (Methode 1): 1.16 g Eisen(III)-chlorid in 99 ml Aqua dest. Lösen, dann 1 ml 25%ige Salzsäure zusetzen. (Methode 2): 4 ml 29%ige Eisen(III)-chloridlösung (=Ferrum sesquichloratum) und 1 ml 25%ige Salzsäure zu 95 ml Aqua dest. geben.)

Azan- Färbung

- | | | |
|----|---|------------|
| 1. | Schnitte entparaffinieren und in Wasser bringen | |
| 2. | Schnitte kurz in Anilinalkohol einstellen | |
| 3. | Färben in Azokarminlösung | 10-15 min. |

4. in Aqua dest. abspülen
5. Differenzieren in Anilinalkohol bis nur noch die Zellkerne gefärbt sind
6. Kurz auswaschen in essigsaurem Alkohol ½ - 1 min.
7. in Aqua dest. abspülen
8. 5%ige Wolframatophosphorsäure ca. 2 Std.
9. in Aqua dest. kurz abspülen
10. 1 Teil Anilinblau-Orange-Gemisch + 2 Teile Aqua dest. 1 - 2 Std.
11. in Aqua dest. kurz abspülen
12. Differenzieren mit 96%igem Ethanol
13. Entwässern in abs. Isopropanol
14. Xylol 2 x 5 min

Ansätze:

Azokarminlösung: 0.1 g Azokarmin G in 100 ml Aqua dest. aufschwemmen, kurz aufkochen und durch einen nicht gehärteten Filter abfiltrieren, dann je 100 ml Filtrat 1 ml Eisessig zugeben.

Anilinblau-Orange-Gemisch: 0.5 g Anilinblau, 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. lösen und 8 ml Eisessig zugeben, kurz aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren.

Anilinalkohol: 100 ml 90%iger Ethanol werden mit 0.1 ml Anilin versetzt.