

Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Heike Walles

Biomechanische Eigenschaften eines biomaterialbasierten
Kreuzbandkonstruktes in-vivo und in-vitro

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johannes Konrad
aus Warburg

Würzburg, Februar 2019

Referentin: Prof. Dr. Heike Walles

Korreferent: PD Dr. med. Thomas Barthel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2021

Der Promovend ist Arzt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet. Alle nicht von mir angefertigten Abbildungen wurden als solche gekennzeichnet und die Nutzungsrechte wurden von den entsprechenden Verlagen eingeholt.

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 / Vorderes Kreuzband
AM	Anteriomedial
ANOVA	Analysis of Variance
BEAR	Bridge Enhanced ACL Repair
BFL	Button Failure Load
BMP	Bone Morphogenic Protein
BTB	Bone-Tendon-Bone
DMOAD	Disease Modifying Osteoarthritic Drugs
Fa.	Firma
GAG	Glykosaminoglykan
GMP	Good manufacturing practice
ICRS	International Cartilage Repair Society
IGF	Insulin Like Growth Factor
K-Draht	Kirschnerdraht
KF	Kollagenfaser
LCL	Lateral Collateral Ligament / Ligamentum Collaterale Laterale / Laterales Seitenband
Lig.	Ligamentum
MCL	Medial Collateral Ligament / Ligamentum Collaterale Mediale / Mediales Seitenband
MFL	Maximum Failure Load
MP	Minipig
MPC	Mesenchymal Progenitor Cells
MRI	Magnetic Resonance Imaging / Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
OA	Osteoarthritis / Arthrose
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
PDS	Poly-p-dioxanon
PFA	Paraformaldehyd
PL	Posterolateral
PRP	Platelet Rich Plasma
RS	Rattenschwanz
PTOA	Post Traumatic Osteoarthritis
SOP	Standard Operating Procedure
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
uPA	Urokinase-Type Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Funktion des Kniegelenks	1
1.1.1	Ossäre Strukturen und Gelenkfläche	1
1.1.2	Muskuläre Strukturen	2
1.1.3	Ligamentäre Strukturen	3
1.2	Verletzung des vorderen Kreuzbands	5
1.2.1	Epidemiologie	5
1.2.2	Verletzungsmechanismus	6
1.3	Heilung von Sehnen und Bändern	6
1.4	Arthroseentstehung	8
1.5	Geschichte der Kreuzbandchirurgie	9
1.6	Aktuelle Therapieoptionen	10
1.6.1	Lig. patellae (BTB) Plastik	10
1.6.2	Hamstring Plastik	10
1.6.3	Allograft	11
1.6.4	Synthetische Verfahren	11
1.6.5	Kreuzbandreparatur (ACL repair)	12
1.7	Tissue Engineering	13
1.8	Fragestellung	14
1.9	Abgrenzung zu vorausgegangenen Studien	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Konstruktherstellung	16
2.1.1	Kollagenfaserisolierung	16
2.1.2	Herstellung eines Kollagenfadens	17
2.1.3	Bau eines ACL-Konstruktes	17
2.1.4	Zeitplan der Fertigung	18
2.1.5	Fibertapeuntersuchung	19
2.1.6	Gammasterilisation von Fasern und Konstrukten	20
2.2	Lagerung der Konstrukte	21
2.2.1	Lagerbedingungen	21
2.2.2	Lagerungsprotokoll	22
2.2.3	Auslegen der Kultur zu Bestimmung von Kontamination	22
2.3	Großtierversuch	22
2.3.1	OP-Technik	23
2.3.2	Euthanasie und Präparation	25

2.4	Makroskopisches Arthrosescoreing	27
2.5	Histologie	28
2.6	MRT Analyse	29
2.6.1	Bohrkanalmessung	30
2.7	Statistische Auswertung	33
2.8	Verwendete Lösungen und Medikamente	33
2.9	Verwendete Geräte	34
3	Ergebnisse	38
3.1	Biomechanische Ergebnisse der Kollagenkonstrukte	38
3.2	Einfluss der Lagerungsbedingung	38
3.3	Sterilität der gelagerten Kontrukte	41
3.4	Biomechanik der Fibertapekonstrukte	42
3.4.1	Unterschiede der Reißfestigkeit	42
3.4.2	Unterschiede der Steifigkeit	42
3.5	Ergebnisse des Tierversuchs	43
3.5.1	Materialtestung	43
3.5.2	Arthrosescoreing	46
3.5.3	Qualitative Histologie des Knorpel	49
3.5.4	MRT-Messung	52
4	Diskussion	54
4.1	Konstruktherstellung	55
4.2	Lagerung	56
4.3	Tierversuch	58
4.4	Fibertape	62
5	Zusammenfassung	65
6	Anhang	67
6.1	Entwässerungsprotokoll	67
6.2	Färbeprotokoll Movat-Pentachrom-Färbung	67

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion des Kniegelenks

Das Kniegelenk ist ein bikondyläres Gelenk, das über das Zusammenspiel von knöchernen, muskulären und ligamentären Strukturen die Bewegung der unteren Extremität in 6 Freiheitsgraden gestattet (siehe Abb. 1). Es besteht aus zwei Gelenken dem Kniescheibengelenk (*articulatio femoropatellaris*) und dem Kniekehlgelenk (*articulatio femorotibialis*). Als sogenanntes Dreh-Scharniergelenk (*Trochoginglymus*) gestattet letzteres eine anterior-posteriore, medial-laterale und Traktions-Kompressions-Verschieblichkeit ebenso wie eine axiale, Varus-Valgus- Rotation und vor allem Extension und Flexion.

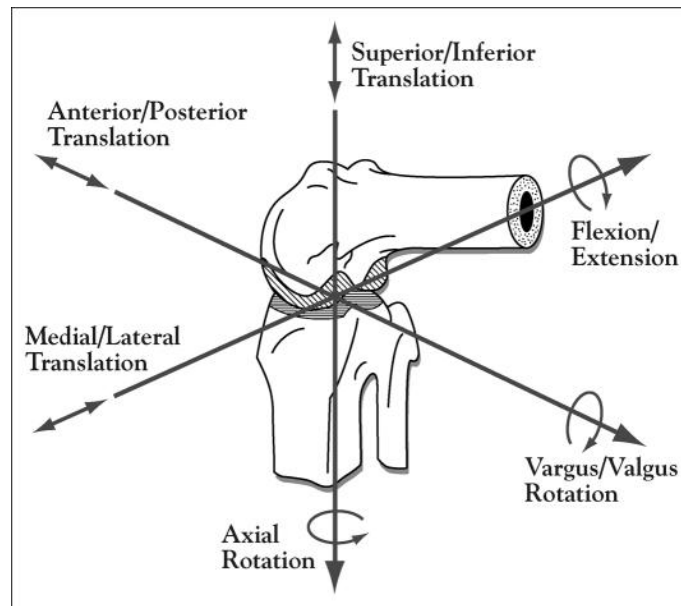


Abb. 1: 6 Freiheitsgrade des Kniegelenks aus [1], mit freundlicher Genehmigung durch den Herausgeber.

1.1.1 Ossäre Strukturen und Gelenkfläche

Knöchern wird das Kniegelenk von dem Oberschenkelknochen (Femur), dem Schienbeinknochen (Tibia) und der Kniescheibe (Patella) gebildet, die durch eine gemeinsame Gelenkkapsel verbunden werden.

Der Femur läuft distal in die beiden Kondylen (*Condylus medialis et lateralis femoris*) aus, die von einer Grube der *Fossa intercondylaris* von vorne nach hinten durchzogen werden. Die mediale Femurkondyle besitzt eine gleichmäßige Breite, wohingegen die laterale Kondyle sich von frontal zu distal verjüngt. Beide Kondylen sind in der Sagittalebene spiralförmig angelegt, wobei die mediale Kondyle um 1-2 cm

größer ist. Nach vorne findet sich auf dem distalen Femur eine Gleitrinne die mit der Patella artikuliert, die sogenannte *Facies patellaris femoris* bzw. *Trochlea ossis femoris*. Sowohl Gleitrinne als auch Kondylen sind mit hyalinem Gelenkknorpel unterschiedlicher Dicke überzogen, der die Kontaktfläche des Gelenkes bildet und der Kraftübertragung dient.

Die Tibia zeichnet sich ebenso durch zwei leicht nach innen verlaufende Kondylen (*Condylus medialis et lateralis tibiae*) aus, die zentral von der knöchernen *Eminentia intercondylaris* unterbrochen werden. Vor und hinter der *Eminentia intercondylaris* sind zwei Gruben die *Area intercondylaris anterior* und *posterior* zu finden. Die an der Gelenkfläche beteiligten beiden Kondylen sind ebenfalls mit hyalinem Gelenkknorpel überzogen und werden als *Tibiaplateau* bezeichnet.

Die Kniescheibe (*Patella*) ist als dreieckiges knöchernes Sesambein ligamentär mit der Oberschenkelmuskulatur (*M. quadriceps femoris*) und der Tibiaapophyse (*Tuberositas tibiae*) verbunden. Dorsal läuft sie keilförmig zu einem First aus und ist mit hyalinem Knorpel überzogen (*Facies articularis patellae*). Sie artikuliert je nach Streckung des Kniegelenkes entweder mit der Gelenkfurche zwischen Femur und Tibia (bei Flexion) oder wandert weiter proximal an der *Trochlea* zum Femur (bei Extension).

Zur Vergrößerung der Kontaktfläche des Femorotibialgelenkes dienen die beiden Menisken, die C-förmig aus Faserknorpel angelegt und mit keilförmigem Querschnitt (Innen schmaler als Außen) die Artikulation unterstützen. Der Innenmeniskus (*Meniscus medialis*) ist größer und mit dem medialen Kollateralband verwachsen. Der laterale Meniskus (*Meniscus lateralis*) ist kleiner und scheibenförmiger ausgeprägt. In Position gehalten werden die Menisken durch weitere Bandstrukturen die *Ligg. meniscotibiale anterius et posterius*, *Lig. transversum genus* und *Ligg. meniscofemorale anterius et posterius* [2].

1.1.2 Muskuläre Strukturen

Das Knie wird neben ossären und ligamentären Strukturen besonders funktionell durch die umgebende Muskulatur stabilisiert und aktiv bewegt. Unterteilen kann man die Muskulatur in Beuger (Flexoren) und Strecker (Extensoren). Der wichtigste Strecker im Kniegelenk ist der *M. quadriceps femoris* der mit seiner Sehne über die Patella als *Hypomochlion* mit der *Tuberositas tibiae* verbunden ist. Als Gegenspieler agieren zur Flexion der *M. sartorius*, *M. gracilis* und *M. semitendinosus* (die alle medial am Schienbein dem sogenannten *Pes anserinus superficialis* ansetzen) ebenso wie der *Musculus biceps femoris* und der zweiköpfige Wadenmuskel (*M. gastrocnemius*). Zusätzlich zur Flexion übernehmen der *M. semimembranosus*, *M. gracilis* und *M.*

popliteus noch eine Rotationsbewegung [3]. In der Kreuzbandchirurgie kommt den im englischen Sprachgebrauch üblichen "Hamstrings" (Muskelgruppe aus *M. semitendinosus*, *M. semimembranosus* und *M. biceps femoris*) eine besondere Bedeutung zu. Sie verhindern zum einen antagonistisch durch Anspannung ein nach vorne Gleiten (ventrale Translation) der Tibia gegenüber dem Femur. Dadurch nehmen sie eine ähnliche Funktion wie das vordere Kreuzband ein [4]. Ihre zweite Funktion ist in der Behandlung der Kreuzbandruptur als Hamstring-Graft zur Implantation.

1.1.3 Ligamentäre Strukturen

Die Bewegung der gelenkbildenden Knochen zueinander wird durch zusätzliche ligamentäre Strukturen eingeschränkt. Dabei lassen sich die Seiten- und Binnenbänder unterscheiden.

Die Seitenbänder gliedern sich in ein laterales (*Lig. collaterale laterale*, LCL) und ein mediales (*Lig. collaterale mediale*, MCL) Seitenband. Das MCL ist mit der medialen Gelenkkapsel und dem Innenmeniskus verwachsen und verbindet den Epicondylus femoris medialis mit dem medialen Schienbeinkopf. Das LCL hat weder Kontakt zu Außenmeniskus noch Gelenkkapsel und verläuft frei zwischen Epicondylus femoris lateralis und Wadenbeinkopf (*Caput fibularis*). In Extension sind beide Bänder gespannt und erlauben keine Beweglichkeit in Ab- und Adduktion. In Flexion hingegen zeigt sich durch eine Entspannung der Bänder eine leichte mediale und laterale Aufklappbarkeit des Gelenkes.

Die Kreuzbänder auch *Ligg. cruciata genus* stellen als Binnenbänder eine ligamentäre Verbindung von Femur und Tibia im menschlichen Kniegelenk dar. Sie werden in ein vorderes und ein hinteres Kreuzband unterteilt. Sie sind entwicklungsgeschichtlich von dorsal in die *Fossa intercondylaris* eingewandert und nur von der *Membrana synovialis*, nicht aber der *Membrana fibrosa* der Kniegelenkkapsel umgeben. Daher liegen sie intraartikulär aber extrasynovial.

Das vordere Kreuzband (auch *anterior cruciate ligament*, ACL) entspringt am Condylus lateralis des Femurs und verläuft nach distal, ventral, medial zur *Area intercondylaris anterior* der Tibia [2]. Es hat eine durchschnittliche Länge von 38 mm (32-44 mm) [5] und eine Dicke von 11 mm [6].

Funktionell lässt es sich in zwei Bündel, ein anteromediales (AM) und ein posterolaterales (PL) Bündel unterteilen, wobei das AM-Bündel unter Extension des Kniegelenks gespannt ist und das PL-Bündel bei Flexion spannt. Außerdem unterscheiden sich beide Bündel hinsichtlich ihrer Länge ($AM \triangleq 38 \text{ mm}$ | $PM \triangleq 20 \text{ mm}$) und ihrer intraartikulären Lage (siehe Namensgebung) [7]. Die Blutversorgung des ACL speist sich aus der *A. genus media*, sowie den durch den Hoffaschen Fettkörper

ziehenden Aa. inferior medialis et lateralis genu.

Das hintere Kreuzband (auch posterior cruciate ligament, PCL) entspringt an der Innenfläche des medialen Femurkondylus und zieht nach dorsal lateral zu der Area intercondylaris posterior wo es inseriert. Ebenso wie das ACL besteht das PCL aus zwei Bündeln. Das anterolaterale Bündel spannt sich in Flexion während das posteromediale Bündel in Extension angespannt ist.

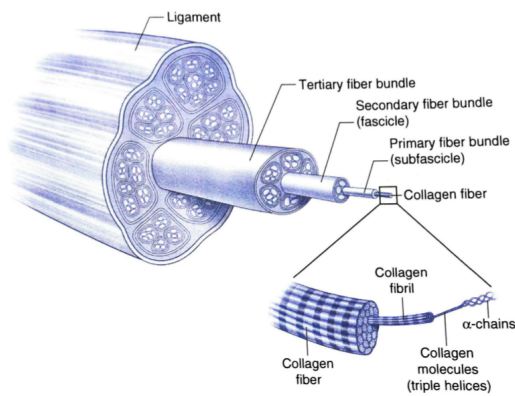
Durch den Verlauf der Kreuzbänder mit ihren Bündeln erklärt sich ihre Funktion:

- Verhinderung der Hyperextension durch das AM-Bündel des ACL [3]
- Begrenzung der Translation der Tiba gegen den Femur in Flexion (vor allem durch das ACL) und in Extension hauptsächlich durch das PCL [3]
- Einschränkung der Rotation durch den überkreuzenden Verlauf der Bänder und Verdrillung beider besonders bei Innenrotation und bei Außenrotation durch das PCL zusammen mit den Kollateralbändern [8]

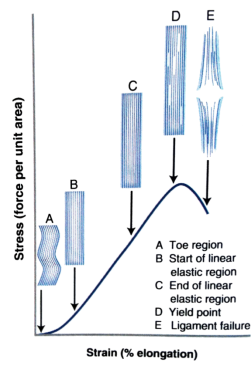
Histologisch betrachtet setzt sich das Kreuzband zum überwiegenden Anteil aus straffem Bindegewebe zusammen, welches aus Kollagen besteht. Über 90% des Kollagens ist Typ I Kollagen, das aus drei miteinander verflochtenen Aminosäureketten besteht, welche parallel angeordnet und quervernetzt die Fibrillen der einzelnen Fasern bilden, die sich wiederum in Primär-, Sekundär- und Tertiärbündel gliedern (siehe Abb. 2a). Der Rest entfällt auf Typ III Kollagen. Hinzu kommen Glykoproteine wie Elastin und Fibronectin und in einem geringen Anteil (<1%) Proteoglykane. 70% des Feuchtgewichts eines Ligaments entsteht durch gebundenes Wasser.

Zwischen den Kollagenfasern liegen Kreuzbandzellen (sog. ACL Fibroblasten). Diese für die Synthese des Kollagens zuständigen Zellen sind für die Erneuerung des Kreuzbandes (mit einer Halbwertszeit von 300-500 Tagen [9]) zuständig und variieren in ihrer Form je nach Position in dem ACL. In dem proximalen Viertel liegen die ACL Zellen noch spindelförmig vor und werden weiter distal zuerst ovoid und später fusiform [10]. Außerdem verlaufen zwischen den Kollagenbündeln die Endäste der Gefäße zusammen mit den Nerven welche Mechanorezeptoren (Ruffini-, Pacini- und Golgi-Rezeptoren) beinhalten und neben Dehnung auch Propiozeption und Schmerz vermitteln [11, 12].

Mikroskopisch betrachtet fällt die Wellenform der Kollagenfasern auf, die eine Verlängerung des Bandes bedingt zulässt (siehe Abb. 2b). Dadurch ergibt sich die charakteristische Kraft-Dehnungskurve unter Zugbelastung, wobei für das humane Kreuzband eine Steifigkeit von $242 \pm 28 \text{ N/mm}$ und eine maximale Reißfestigkeit von $2160 \pm 157 \text{ N}$ ermittelt wurden [13].



(a) Schematischer Aufbau von Kollagen



(b) Verformung des Kollagens bei Krafteinwirkung

Abb. 2: Mikrostruktureller Aufbau von Bändern und Sehnen aus [10], mit freundlicher Genehmigung durch den Herausgeber.

1.2 Verletzung des vorderen Kreuzbands

1.2.1 Epidemiologie

Die Kreuzbandruptur stellt eine typische und vorwiegend als solche auftretende Sportverletzung dar. Die Inzidenz liegt zwischen 1-10 Verletzungen pro 1000 Einwohner in den westlichen Industrienationen [10]. Auf Deutschland berechnet wäre das eine Kreuzbandruptur alle 6 Minuten. Das Verhältnis von Frauen zu Männern liegt dabei etwa bei 3:1, was sich je nach Sportart unterscheidet. Gründe für diese Geschlechterdifferenz werden in dem geringeren Raum für das ACL in der Fossa intercondylaris, dem Menstruationszyklus, und besonders einer ausgeprägteren Valgusstellung des Knies bei Landung gesehen [14]. Das größte Verletzungsrisiko entfällt auf die Sportarten Fußball, Basketball, American Football und Skiabfahrtslauf. Einen zusätzlichen Risikofaktor stellt die Art der Sportausübung (Amateur oder Profi) dar, wobei professionelle Skifahrer ein 16-fach geringeres Risiko einer Kreuzbandverletzung besitzen. Dieses Verhältnis ist bei Fuß- und Basketball zugunsten der Amateure wiederum verschoben [14]. Besonders Fußball und Basketball zeigen zusätzlich zu dem typischen Verletzungsmuster einen Zusammenhang zu der Beschaffenheit des Bodens und der getragenen Schuhe [15].

Die Kreuzbandverletzung ist generell eine Verletzung des jungen Menschen. Rund 50% ereignen sich zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr (siehe Abb. 3). Etwa 38 von 100.000 Menschen werden operiert, wobei bei rund einem Drittel eine zusätzliche Meniskusverletzung vorliegt [16]. Das anschließende Risiko für eine Ruptur der gesunden Gegenseite wird auf 8-16% in 5 Jahren geschätzt [17]. Demgegenüber besteht ein Rerupturrisiko in zwei Jahren von 6% [18], dann jedoch hauptsächlich

aufgrund einer Kontaktverletzung [19].

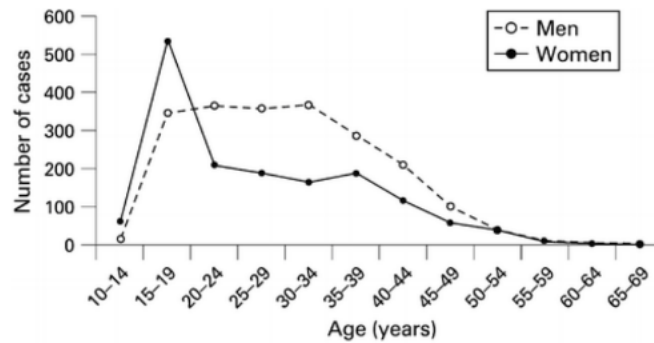


Abb. 3: Anzahl der ACL Rupturen nach Geschlecht und Alter in einem 18-monatigen Untersuchungszeitraum aus [14], mit freundlicher Genehmigung durch den Herausgeber.

1.2.2 Verletzungsmechanismus

Die vordere Kreuzbandruptur ereignet sich meist in Folge eines typischen Verletzungsmechanismus beim Sport. Ursächlich ist meist ein Valgusstress und/oder eine Extension des Beines bei zusätzlich vorliegender Innenrotation der Tibia. Dies ist z.B. bei fixiertem Unterschenkel durch Stollenschuhe oder Skibindungen der Fall. Dabei liegt in mehr als 70% der Fälle eine Nicht-Kontakt-Verletzung vor, d.h. die Verletzung ereignet sich abseits einer direkten Auseinandersetzung mit einem anderen Sportler [14]. Des Weiteren sind abrupte Richtungswechsel wie beim Fußball oder Basketball häufig und Landung bei Streckung des Knies und starker Quadricepsanspannung ohne gegenläufige Aktivität der Hamstrings mitverursachend. Je nach Sportart treten diese Bewegungsmuster häufiger auf (siehe Abb. 4).

1.3 Heilung von Sehnen und Bändern

Sehnen und Bänder durchlaufen nach Verletzung die Stadien der Wundheilung charakterisiert durch 1) Entzündung 2) Proliferation und 3) Remodellierung [20]. Die Entzündungsphase ist geprägt von der Formung eines Blutplaques durch Homöostase, der Einwanderung von Entzündungszellen wie Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten aus umgebendem Gewebe und der Ausschüttung von Chemokinen und Entzündungsmediatoren wie insulin-like growth factor I (IGF-I), transforming growth factor ($TGF-\beta$), platelet derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) und einer Vielzahl von BMPs [21]. Nach zwei Tagen beginnt die zweite Phase, in der es zu einem Einwandern von Fibroblasten/Tenozyten und Neovaskularisation kommt. Zu dieser Zeit produzieren die Fi-

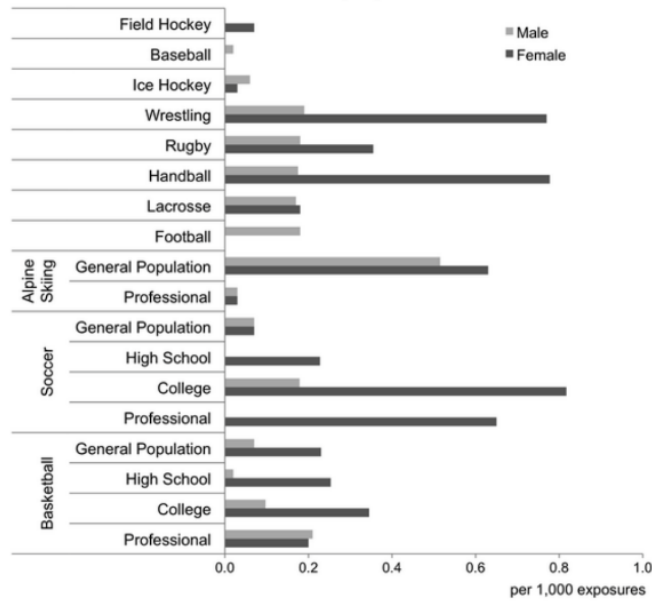


Abb. 4: Risiko einer ACL Ruptur nach Sportart und Geschlecht aus [10, 14], mit freundlicher Genehmigung durch den Herausgeber.

broblasten hauptsächlich Kollagen Typ III [22]. 1-2 Monate nach initialer Verletzung schließt sich die Remodellierungsphase an, in der nun vermehrt Kollagen Typ I synthetisiert wird und es zur gleichmäßigen Orientierung und Quervernetzung der Kollagenfasern kommt. Der Anteil an Typ III Kollagen und Glykosaminoglykanen im teilweise narbig umgebauten Gewebe sinkt und besitzt selbst nach 12 Monaten weder dieselbe Struktur noch die biomechanischen Eigenschaften des ursprünglichen Bandes [23].

Die Heilung des ACL nach einer Ruptur unterscheidet sich von anderen Bändern und Ligamenten und endet meistens in der "non-union" (fehlenden Defektüberbrückung). Lange Zeit wurde angenommen, dass dies auf einen geringeren zellulären Metabolismus und geringer Vaskularisation [24] sowie die umgebende Synovialflüssigkeit zurückzuführen ist. Neuere Forschungsergebnisse des letzten Jahrzehnts zeigen jedoch, dass die ACL Fibroblasten sehr wohl ein hohes Migrations- und Proliferationspotential haben (sogar noch nach 16-20 Monaten) [25] und ein erhöhtes Kollagen-Genexpressionslevel aufweisen [26]. Auch die Blutgefäßdichte ist vergleichbar zu der des MCL nach Verletzung [25]. Außerdem zeigt sich ein höheres Heilungspotential mit erhöhter Zelldichte bei jüngeren Individuen [27].

Dem gegenüber steht die hohe Versagensquote von klassischen Reperaturverfahren durch Naht von 90% bei dem vorderen Kreuzband [28] (95% bei Rotatorenmanschettenrupturen [29] die ebenfalls intraartikulär liegt) verglichen mit der vollständigen Heilung von extraartikulär liegenden ligamentären Strukturen wie dem MCL nach

6 wöchiger Ruhigstellung [30]. Daher wurde von Murray et. al eine zusätzliche Heilungsphase für das intraartikulär liegende Kreuzband postuliert, die "epiligamentäre Regenerationsphase" in der es zur Umschließung der frei liegenden Enden des Kreuzbandes mit vaskularisiertem Synovialgewebe über 8-12 Wochen kommt und der intraartikuläre Defekt nicht überbrückt werden kann [25]. Während der normalen Wundheilung eines Ligaments kommt es zur Formung eines fibringebundenen Blutplaques, welcher nach Migration von Fibroblasten mit Kollagenfasern durchsetzt wird und den Defekt füllt. Intraartikulär kommt es jedoch nicht zu der Bildung eines stabilen Fibringerüsts und normaler Homöostase [31], da das Enzym Plasminogen durch Plasminogenaktivatoren (uPA) zu dem wirksamen Plasmin gespalten wird. Der Plasminogenaktivator wird nach Verletzung vom Synovium produziert und das resultierende Plasmin spaltet Fibrin und wirkt der Plaquetbildung somit entgegen [32].

1.4 Arthroseentstehung

Der Begriff Arthrose (engl. osteoarthritis OA) bezeichnet eine degenerative Erkrankung des Knorpels die sich vorwiegend bei dem älteren Menschen (über dem 50. Lebensjahr) manifestiert. Im alltäglichen Sprachgebrauch spricht man häufig von Gelenkverschleiß (eng. "wear and tear"), was jedoch besonders in den letzten Jahren mit der Betrachtung zellulärer Vorgänge in Frage gestellt wurde [33]. Radiologisch zeigen sich im Sinne der Kellgren Lawrence Klassifikation eine Gelenkspaltverschmälerung (Abnahme der Knorpeldicke), Osteophyten, eine subchondrale Sklerosierung und Geröllzystenbildung [34]. Klinisch manifestiert sich das Krankheitsbild erst sehr spät durch eingeschränkte Mobilität und Beweglichkeit des betroffenen Gelenkes mit Schmerzen. Da der Knorpel nicht neural innerviert ist, sind für die Schmerzen die Nerven des ebenfalls betroffenen Synoviums, der Bänder, Menisken und Kapseln zuständig [35].

Oftmals wird zwischen der primären (altersbedingten) und der sekundären (posttraumatischen) Arthroseentstehung unterschieden. Letztere entsteht häufig nach Verletzung der Knieinnenstrukturen (Meniskus und Kreuzbänder), weshalb durch Verletzung dieser Strukturen regelmäßig OA im Tiermodell [36] wie auch im Menschen mit Raten von bis zu 78% [37] beobachtet werden kann. Bisher konnte keine Überlegenheit einer chirurgischen Intervention nach Kreuzbandruptur gegenüber konservativer Therapie auf die Entstehung von posttraumatischer Arthrose gezeigt werden [38]. Neben der rein biomechanischen Betrachtung wurden in den letzten Jahren von einer Vielzahl an Gensignaturen [35, 36, 39] des Knorpels und weiterer umliegender Gewebe nach Trauma berichtet, ohne jedoch bisher Biomarker oder

krankheitsbeeinflussende Zielstrukturen / Medikamente (DMOADs) hervorzubringen [40]. Goldstandard in der Diagnosestellung ist nach wie vor die herkömmliche Röntgenaufnahme in zwei Ebenen und in präklinischen Studien die Kombination aus Histologie [41] und MRT [42].

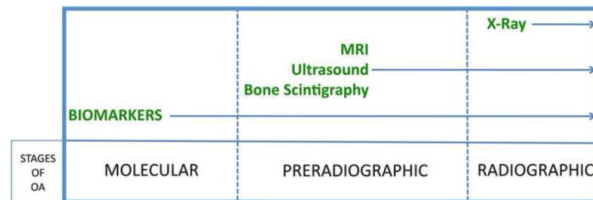


Abb. 5: Stadien der Arthroseentstehung und ihrer Detektion aus [42], mit freundlicher Genehmigung durch den Herausgeber.

1.5 Geschichte der Kreuzbandchirurgie

Die Begründung der Kreuzbandchirurgie geht auf A.W. Mayo Robson im Jahr 1895 zurück, der als Erster von der Naht des vorderen und hinteren Kreuzbandes in einem Mienenarbeiter berichtet [43]. 1938 wurde die fehlende Heilung und dahingehende Indikation zur primären Reparatur von Ivar Palmer publiziert und wissenschaftlich von D.H. O'Donoghue in den 50er und 60er Jahren in Kreuzbandnahttechniken an Hunden aufgegriffen, welche jedoch in nur 10% der ursprünglichen Kraft resultierten [44]. In den 70er und 80er Jahren zeigten von John Marshall, John Feagin und Walter Curl berichtete Nahttechniken unterschiedliche Ergebnisse von keinem Instabilitätsgefühl nach 2,5 Jahren bis zu 94% Knieinstabilität nach 5 Jahren in anderen Studien [45, 46]. Erste prospektiv randomisierte Studien von Odensten et al 1985 [47] und Sandberg et al. 1987 [48] zeigten keinen Unterschied in dem funktionellen Ergebnis zwischen Kreuzbandnaht und konservativer Therapie. Jedoch zeigte sich bessere Kniestabilität (im Pivot Shift Test) und Erhalt der Menisken in den operativen Gruppen. Parallel zu der technischen Entwicklung der primären Kreuzbandnaht wurde beginnend im Jahr 1917 von Ernest W. Hey Groves ein Teil des Tractus iliotibialis (IT Band) als Transplantat verwendet [43]. Ab 1935 folgte der Gebrauch der Patellarsehne und ab den 1970er Jahren die extraartikuläre Rekonstruktion nach MacIntosh mit Hilfe des IT Bandes [49]. In den 1980er Jahren etablierte sich die intraartikuläre Kreuzbandrekonstruktion mittels Transplantat durch John Insall [50], die sich aufgrund besserer klinischer Ergebnisse und der Möglichkeit der Operation im späteren verletzungsfreien Intervall gegenüber der primären Kreuzbandnaht durchsetzte [51]. Zunächst wurde eine isometrische Positionierung der Bohrkanäle favorisiert was heute jedoch zugunsten der möglichst anatomischen Implantation

verlassen wurde [52]. Heutiger Goldstandard ist die intraartikuläre anatomische ACL Rekonstruktion mittels Hamstring-, Bone-Tendon-Bone- (abgekürzt BTB-) oder Allograft.

1.6 Aktuelle Therapieoptionen

Heutigen Goldstandard in der Therapie einer Kreuzbandruptur stellt der autogene Ersatz dar. Zum Einsatz kommen klinisch hauptsächlich die Hamstring- oder BTB-Plastik, daneben wird auf Quadrizepssehnen besonders bei Revisionen sowie Allografts (welche in Deutschland nur eine geringe Rolle spielen) und neuere Verfahren der Kreuzbandreparatur (siehe unten) zurückgegriffen. Es konnte keine Überlegenheit eines dieser Verfahren (Hamstring oder BTB) in Metaanalysen gezeigt werden [53, 54]. Eine Überlegenheit der operativen Therapie gegenüber konservativer Therapie (physiotherapeutische Rehabilitation) konnte mit Ausnahme einer erhöhten Rate an Meniskusrissen in der konservativen Therapiegruppe bisher nicht bestätigt werden [48, 55]. Daher stellt die Therapieentscheidung eine Abwägung des Patientenwillens und -anspruchs, des Könnens des Operateurs und weiterer behandlungsbedürftiger Begleitverletzungen dar.

1.6.1 Lig. patellae (BTB) Plastik

Bei der Verwendung des Lig. patellae (wie erstmalig von Jones [56] berichtet) wird das mittlere Drittel der Patellarsehne mitsamt einem Knochenstück aus Patellar und Tuberositas tibiae entnommen, daher der Name Bone-Tendon-Bone-Graft. Das Transplantat wird anschließend mit den Knochenankern in den Bohrkanälen fixiert. Die Vor- und Nachteile dieser Technik ergeben sich aus der Transplantatentnahme: gute Knochenintegration innerhalb des Bohrkanals, frei wählbare Transplantatbreite und Erhalt der Rotationsstabilität durch Schonung der Muskulatur, gegenüber vorderem Knieschmerz (besonders bei kniender Tätigkeit) und Streckdefizit des M. quadrizeps (bis zu 15% nach einem Jahr) [57, 58]. Durch die Entnahmemobidität erklärt sich auch die um 9% erhöhte langfristige Rate an berichtetem anterioren Knieschmerz verglichen zur Hamstring Plastik [59].

1.6.2 Hamstring Plastik

Die Sehnen des M. semitendinosus und M. gracilis werden über einen separaten Zugang reseziert, vierfach gelegt und vernäht. Die Verankerung erfolgt analog je nach Operateur mit bioabsorbierbaren Interferenzschrauben oder Endobuttons außerhalb des Bohrkanals. Durch die minimalinvasive Entnahmetechnik ergeben

sich die Vor- und Nachteile dieser Technik: geringe Entnahmemorbidität, Erhalt der Streckfähigkeit gegenüber schlechterer Bohrkanaalintegration, mögliche Transplantatelongation, eingeschränkte Flexion, mediale Stabilisation und Innenrotation durch Entnahme und Schädigung der Hamstrings (auch 2 Jahre postoperativ) [57, 60, 61]. Außerdem kann das Transplantat nicht immer in ausreichender Länge und Dicke gewonnen werden, sodass eventuell auf andere Grafts zurückgegriffen werden muss. Da für die initiale Stabilität jedoch vor allem die Verankerung wichtig ist, ist die geringere Reißfestigkeit gegenüber der BTB Plastik nicht entscheidend [61]. Neben der Einzelbündeltechnik wurde auch versucht durch eine Doppelbündeltechnik den anatomischen Verlauf des AM- und PL-Bündels nachzuvollziehen. Erstmals 2003 von Marccacci et al. berichtet [62], versprach die Technik eine bessere Rekonstruktion der ursprünglichen Anatomie. Nach einigen Modifikationen von Verfechtern wie Freddie Fu aus Pittsburgh und uneinheitlichen Studienergebnissen ist der genaue Einsatz dieser Technik immer noch nicht abschließend geklärt [63].

1.6.3 Allograft

Zur Lösung der Probleme der Autografts (Verfügbarkeit, Entnahmemorbidität, Extensions-/Flexionseinschränkung, chronischer Knieschmerz, zweiseitiger Eingriff etc.) werden vor allem in den USA auch vermehrt Allografts, d.h. Sehnentransplantate (meist Patellar-, Achilles- oder Tibialis-anterior-Sehne) von einem nicht genetisch identischen Spender verwendet [61]. Dadurch ergeben sich jedoch die Risiken der Immunreaktion und Übertragung von Infektionskrankheiten [64, 65] ebenso wie geringere Reißfestigkeit nach Lagerung und Gammasterilisation [66, 67] sowie erhöhte Kosten durch Qualitätskontrollen. Daher wird dieses Verfahren besonders bei schwieriger Eigentransplantatgewinnung und bei alten Patienten angewandt, da das Transplantatversagen mit dem Alter des Patienten abnimmt (siehe Abb. 6).

1.6.4 Synthetische Verfahren

Auch der Ersatz des Kreuzbandes mit synthetischen Bändern wurde im letzten Jahrhundert vielfach erprobt. Begonnen mit F. Lange in München (1907) mittels eines Seidekonstruktes [68] wurde eine Vielzahl an Materialien wie Supramid, Teflon, Dacron, Proplast, Kohlefaser, ABC, Kennedy-LAD, Trevira, Leeds-Keio, Gore-Tex, PDS, EULIT oder Polyflex entwickelt [69]. Vorteile wie gute initiale Stabilität, Verfügbarkeit, Qualitätskontrolle und leichte Produktion sollten die Nachteile biologischer Implantate überwinden.

Einfache synthetische Bänder wie Dacron zeigten jedoch über die Zeit Materialer-

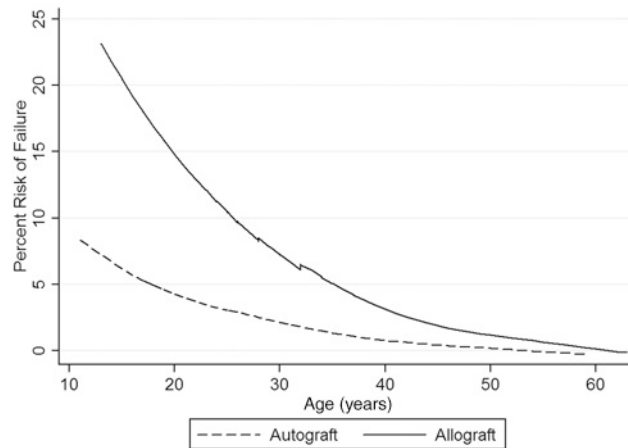


Abb. 6: Rerupturrate nach ACL Rekonstruktion mit Autograft und Allograft aus [66], mit freundlicher Genehmigung durch den Herausgeber.

müdung und versagten in Langzeitstudien [70]. Daraufhin wurde versucht durch den Einsatz von synthetischen Bändern die Initialstabilität in Kombination mit einer herkömmlichen ACL Rekonstruktion zu erhöhen und diese zu entlasten, wie bei dem Kennedy Ligament Augmentation Device (LAD), welches jedoch keinen Vorteil zeigte und sogar ganz im Gegenteil zu reaktiven Entzündungsreaktionen führte [71, 72]. Auch die als Leitstrukturen zum Einwachsen von Fibroblasten entwickelten Ligamente Leeds-Keio (von Neoligaments Ltd) oder ABC (von Surgicraft Ltd) aus Polyethylen zeigten hohe Ausfallraten [73, 74].

1.6.5 Kreuzbandreparatur (ACL repair)

Im Zuge der Weiterentwicklung dieser Techniken wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Wege eingeschlagen. Zum einen trug die Arbeit von Martha Murray entscheidend dazu bei den Heilungsvorgang des Kreuzbandes zu verstehen. Zum anderen wurden Nahttechniken und synthetische Bänder wieder aufgegriffen. Daher kam im letzten Jahrzehnt der Begriff Kreuzbandreparatur (engl. ACL repair) auf. Im Gegensatz zu der ACL Rekonstruktion ist das Ziel dieser Verfahren das ursprüngliche Kreuzband zu erhalten und zur Selbstheilung zu bringen, indem der Defekt zwischen den gerissenen Enden überbrückt wird.

Von einer mechanischen Betrachtungsweise her wurden LARS und Internal Brace Ligament Augmentation (Arthrex) entwickelt. Mittels einer Umstichnaht und einer durch das rupturierte ACL geführten Kordel die über femorale und tibiale Bohrkanäle fixiert wird soll unter zusätzlicher femoralseitiger Mikrofrakturierung die Defektheilung unterstützt werden. Erste klinische Ergebnisse zeigen bei geringer Fallzahl und

schwachem Evidenzlevel (LOE IV) erfolgreiche Ergebnisse [75, 76]. Beide Produkte sind bereits kommerziell zu erwerben. Die Schweizer Entwicklung "Dynamic Intraligamentary Stabilisation" (Ligamys, Mathys MedicalTM) zielt neben der Bandfixierung mittels Polyethylenfaden über eine in die Tibia eingebrachte vorgespannte Feder auf die dynamische Entlastung des Kreuzbandes während der Wundheilung. Die frühere Operation verglichen zur ACL Rekonstruktion zeigte eine frühere Arbeitswiedereingliederung und geringere Meniskusschäden [77]. Jedoch scheint die Reinterventionsrate mit 40-50% aufgrund von Materialentfernung und Arthrolyse [78] sehr hoch auszufallen.

Neben diesen mechanischen Ansätzen gibt es Bestrebungen durch Stammzellen, platelet rich plasma (PRP) und Bio-Scaffolds die Heilung zu induzieren [78]. In einer klinischen Phase 2 Studie befindet sich derzeit die sogenannte "bridge enhanced ACL repair" (BEAR) Technik. Dabei werden die gerissenen Enden des ACL in einen Kollagen I Schwamm eingebracht und über Haltefäden in femoralen und tibialen Bohrkanälen fixiert. Der Schwamm wird anschließend vollständig mit dem Blut des Patienten benetzt und hält einen sich organisierenden Blutplaque an Ort und Stelle. Nach einigen Wochen löst sich der Kollagenschwamm vollständig auf [79]. Erste präklinische Ergebnisse zeigen ein durchgehendes Ligament, ebenso wie erstmalig eine Innervation und geringere Arthrosebildung verglichen zu der ACL Rekonstruktion [80, 81].

Ob sich diese Verfahren langfristig etablieren und auch rechnen werden bleibt abzuwarten .

1.7 Tissue Engineering

Die hohe Inzidenz und immer noch unzureichend adressierte Behandlungsprobleme wie Entnahmestellenmorbidity [53], Rerupturrate [58], Rehabilitationsdauer, Verfügbarkeit, Arthrosebildung [38] zeigen einen hohen klinischen Bedarf nach besseren Therapiemöglichkeiten auf. Durch ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden biologischen Prozesse stellt die Kreuzbandverletzung daher einen idealen Ansatzpunkt für Entwicklungen des Tissue Engineering dar. Der Begriff Tissue Engineering geht auf Robert Langer zurück, der es definiert als "interdisziplinäres Feld, welches die Grundsätze der Ingenieurwissenschaften und der Lebenswissenschaften auf die Entwicklung biologischer Ersatzmaterialien zur Schaffung, Erhaltung oder Wiederherstellung der verlorenen Organfunktion anwendet" [82]. Meistens werden dabei die drei Komponenten: Zellen (in Form von differenzierten oder undifferenzierten Stammzellen), Biomaterial (Gele, Schwämme, Membranen etc.) und Signaltransduktion (Wachstums- oder Differenzierungsfaktor) kombiniert.

Beim Tissue Engineering von Sehnen und Bändern kommen daher zellulär Fibroblasten (als differenzierte ACL Zellen) in Frage, welche jedoch trotz gegebenem Migrationspotential und Proliferationsfähigkeit nur eine sehr langsame Proliferationsrate mit sich bringen. Undifferenzierte mesenchymal progenitor cells (MPC) wurden ebenfalls erprobt, zeigten jedoch sowohl chondrogene als auch ossäre Differenzierung im verletzten Knie [83, 84].

Ebenfalls noch nicht verstanden ist die Wechselwirkung verschiedener Signalkaskaden nach Trauma [39] und wie sich diese in Form von Wachstumsfaktoren (wie TGF- β , VEGF, FGF, PDGF) aber auch als Blutserumbestandteil und mechanische Stimuli (wie Vorspannung und Torsionskraft) auf die Entwicklung und Differenzierung des Kreuzbandes auswirken [84]. Gute Ergebnisse zeigen dafür verschiedene Biomaterialien, die als Trägersubstanzen oder Leitstruktur dienen. Besonders ausführlich studiert wurden Kollagene, Hyaluronsäure, modifizierte Seide oder Polymere (wie poly lactic acid, poly glycolic acid) [84]. Das Biomaterial muss dabei drei Voraussetzungen erfüllen:

- eine hohe Initialstabilität um einer frühen Reruptur vorzubeugen
- hohe Porosität und Förderung des Einwachsens und Wachstums von Fibroblasten zur Produktion von Kollagen Typ I und III
- gute Biokompatibilität bei gleichzeitiger Biodegradierbarkeit um Fremdgewebsreaktionen zu vermeiden [85]

Für die klinische Anwendung müssen besonders für das Kreuzband außerdem die Probleme der Qualitätskontrolle (Sterilisation zur Infektionsminimierung) und Fixierung des Konstruktes adressiert werden.

Kollagen Typ I hat sich durch eine hohe Reißfestigkeit bei gleichzeitiger Dehnbarkeit (durch das sogenannte "crimp pattern"), hohe Biokompatibilität [86], Degradierbarkeit und Durchlässigkeit für Zellen ausgezeichnet. Auch die Integration in die umliegenden Knochenstrukturen während des Umbaus verspricht eine ausreichende Verankerung nach Implantation [86, 87].

1.8 Fragestellung

Das im Folgenden vorgestellte aus Kollagen Typ I gefertigte Konstrukt wurde bereits in vorausgegangenen Tierstudien auf Umsetzbarkeit, Biokompatibilität, biomechanische Eigenschaften sowie histologischen Umbau mit der Zeit getestet. Eine Verstärkung der initialen Stabilität durch Crosslinker scheiterte jedoch in-vivo, wes-

halb ohne bisher beobachtete Reruptur die Frage nach einer alternativen Augmentation des Implantates ohne dessen Veränderung untersucht werden sollte.

Hierzu wurde das alte Verfahren der Augmentation mittels eines neuen synthetischen Fadenmaterials (Fibertape Arthrex) in-vivo und in-vitro untersucht. Auch die Qualitätskontrolle eines so gefertigten Konstruktes, welches für die klinische Anwendung hergestellt wird, soll weiter in den Fokus rücken. Zur Qualitätskontrolle der Konstruktfergung wurden bereits SOPs aufgestellt. Wie jedoch verhält sich das fertige Produkt, wenn es bis zur Implantation gelagert wird? Gibt es eine ideale Lagerbedingung und verändern sich die biomechanischen Eigenschaften über die Zeit? Dazu wurden in-vitro drei verschiedene weit verbreitete Lagerungsbedingungen (gefroren bei -20°C , gekühlt bei 5°C , und bei Raumtemperatur von 25°C) über einen Zeitraum von bis zu einem halben Jahr verfolgt.

Während der Tierstudie zeigten sich des Weiteren noch Osteophyten, welche als ein Zeichen der Arthrose so bisher in diesem Modell noch nicht beschrieben wurden. Daher wurde histologisch und makroskopisch das Ausmaß dieser posttraumatischen Arthroseentstehung quantifiziert, ins Verhältnis zu vorangegangenen Tierstudien gestellt und auf den Einfluss der Bohrkanalpositionierung untersucht.

1.9 Abgrenzung zu vorausgegangenen Studien

Am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg wurden bereits drei vorausgegangene Studien [86, 87, 88] mit ähnlicher Thematik durchgeführt. In Abgrenzung zu diesen Arbeiten wurde dieses Mal die mechanische Augmentation mittels Fibertape als logischer nächster Schritt zu der zuvor durchgeführten und verworfenen chemischen Augmentation mittels Cross Link [88] getestet. Neben den kurzfristigen Betrachtungen der Ligamentstabilität zur Beurteilung der Rerupturrate, wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der Langzeiteffekt der posttraumatischen Arthrose systematisch (mikro- wie makroskopisch) ausgewertet und mittels einer MRT gestützten Bohrkanalmessung ins Verhältnis zur relativen Implantatposition gesetzt. Zur Betrachtung der Biokompatibilität des finalen Produktes wurden bereits Vorversuche [86] durchgeführt, jedoch fand weder in den Vorgängerarbeiten noch in der bisher existierenden Literatur eine Untersuchung des Temperatureinflusses auf die strukturelle Integrität eines solchen Kollagenkonstruktes statt. Trotz ähnlichem Versuchsdesigns der Tierstudie soll die vorliegende Arbeit daher die nötigen letzten Informationen zur Bewertung des bereits in anderer Form mehrfach erprobten biomaterialbasierten Kreuzbandkonstruktes liefern [86, 87, 88].

2 Material und Methoden

2.1 Konstruktherstellung

2.1.1 Kollagenfaserisolierung

Die für die Herstellung der ACL-Konstrukte benötigte Kollagen Typ I Fasern wurde aus Rattenschwänzen (RS) isoliert. Sie wurden als zusammenhängende Bündel von Fasern unterschiedlicher Länge gewonnen. Dazu wurden Rattenschwänze von extern gezüchteten Ratten (weibliche CD Ratten im Alter von 15-20 Wochen der Firma Charles River) in tiefgefrorenem Zustand in Chargen von jeweils 20 Rattenschwänzen aufgeteilt und nach Erhalt bei -20°C gelagert. Zur Gewinnung des Kollagens wurde jeweils eine Charge von 20 RS in 0,9% Natriumchloridlösung (NaCl-Lsg.) für 30 Minuten bei Raumtemperatur (22°C) aufgetaut. Anschließend wurde der RS mit einer Arterienklemme 1 cm vom stumpfen Ende her eingeklemmt und mit Fixierung des stumpfen Endes mehrere Male um die eigene Achse gedreht bis sich das Schwanzende mit den Kollagenfasern (KF) von einer Länge von etwa 10-12 cm von den restlichen Kollagenfasern, Knorpelspangen und der Rattenschwanzhaut am verbliebenen 12 cm langen Stumpf des Rattenschwanzes trennten (siehe Abb. 7). Das etwas muköse Sekret zwischen den KF wurde mit den Latexhandschuhen vorsichtig abgestriffen und die KF mit einem scharfen Skalpell von der Spitze des RS abgetrennt. Genauso wurde mit dem verbliebenen 12 cm langen RS-Rest noch einmal im Abstand von 10 und von 8 cm verfahren um KF der Länge 8-10 cm und 6-8 cm zu gewinnen. Während aller Arbeitsschritte ist auf eine ausreichende Benetzung der KF mit 0,9% NaCl-Lsg. zu achten, da sie ansonsten sehr schnell austrocknen, brüchig und unbrauchbar werden. Daher wurden die gewonnenen KF anschließend mit 0,9% NaCl-Lsg. in 500 ml-Laborflaschen gelagert und mit Chargennummer und Datum der Isolation versehen. Zur Aufreinigung der KF wurde unter einer sterilen Bank die NaCl-Lsg. vorsichtig aus der Laborflasche abgegossen ohne die KF herauszuspülen und anschließend unter vorsichtigem Schwenken zu einer möglichst gleichmäßigen Benetzung mit 70%igem Alkohol für 10 min übergossen. Dann wurde der Alkohol wieder vorsichtig abgegossen und verbliebene Reste mit 0,9% NaCl-Lsg. abgespült, bevor der gleiche Schritt zweimal wiederholt wurde. Zum Abschluss wurde dreimalig mit 0,9% NaCl-Lsg. gespült um Alkoholreste am Ende des dritten Alkoholsterilisationsschrittes zu entfernen. Abschließend wurden die KF in steriler NaCl-Lsg. wieder im Kühlschrank bei etwa 4°C gelagert.



Abb. 7: Isolierung der Kollagenfasern

2.1.2 Herstellung eines Kollagenfadens

Vor der Herstellung des Konstruktes wurden zur Qualitätskontrolle und Standardisierung die einzelnen KF auf ihre Reißfestigkeit geprüft. Dazu wurden die befeuchteten KF einzeln einer Kraft von 10 N für 2 s ausgesetzt. Bei Riss, Nachgeben oder sichtbaren Strukturveränderungen, besonders an den eingespannten Enden, wurde die KF aussortiert. Die erfolgreich getesteten KF werden gesammelt und in 0,9% NaCl-Lsg. über Nacht im Kühlschrank gelagert. Durch die Tests ist in vielen Fällen nicht eine mechanische Manipulation der Enden der KF zu vermeiden, die sich daraufhin mit Wasser vollsaugen, sehr schnell einreißen und unbrauchbar für den nächsten Arbeitsschritt werden. Um diese KF ebenfalls auszusortieren, werden nach mehrstündiger Einlagerung die KF auf ihre Homogenität (optischer Glanz, einheitlicher Durchmesser und eventuelle feine Auffaserung) untersucht, da aufgequollene KF matt anlaufen und ihr Erscheinungsbild verändern. Die übrig gebliebenen KF werden mit drei gegenläufigen einfachen Knoten End-zu-End per Hand mit Mikropinzette unter ständiger Befeuchtung verknotet. Ein Faden bestehend aus fünf Fasern mit vier Knoten wird an den Enden fixiert und mittig mit 2 N belastet. Dadurch werden einzelne Knoten weiter festgezogen und auf Reißfestigkeit geprüft. Nur diese Qualitätsprüfung bestehende Fasern werden weiterverarbeitet. Jeweils vier so gewonnene Fäden (mit jeweils fünf KF) wurden zu einem langen Faden verknotet, auf die selbe Weise getestet, zur Lagerung auf eine Plastikspindel aufgewickelt und in steriler 0,9%iger NaCl-Lsg. gelagert.

2.1.3 Bau eines ACL-Konstruktes

Zur späteren Implantation im Minipig und Vergleichbarkeit wurden Konstrukte von 40 mm Länge und 4 mm Durchmesser hergestellt. Dazu wurde in bekannter Technik [88] ein sogenannter Katamaran aus zwei Plastiktubes mit einer Wicklungslänge von

80 mm (siehe Abb. 8a) hergestellt. Die sterilen Kollagenfäden wurden der Länge nach mit drei gegenläufigen Knoten verbunden und erneut mit 2 N belastet. Durch acht Wicklungen des entstandenen Kollagenfadens um den Katamaran entstand nach Verbindung der Enden mit drei gegenläufigen Knoten ein endlos Loop. Zum Ausgleich eines eventuellen Längenunterschiedes der Wicklungen wurde der Loop unter leichter Vorspannung zwischen zwei Finger gelegt und diese 30 mal gegeneinander kreisförmig rotiert (siehe Abb. 8b). Dies stellt eine gleichmäßige Belastung aller Wicklungen und einen festen Sitz sämtlicher Knoten sicher. Anschließend erfolgte die Fixierung des 80 mm langen Loop mit "Surgical Loop"-Fäden unter ständiger Benetzung mit steriler NaCl-Lsg. Das entstandene Konstrukt wurde auf eine Länge von 40 mm doppelt gelegt (siehe Abb. 10b), auf seinen Durchmesser mit einer Lochplatte getestet und in einem 20 ml Tube mit 0,9% NaCl-Lösung bei 5 ° C gelagert.

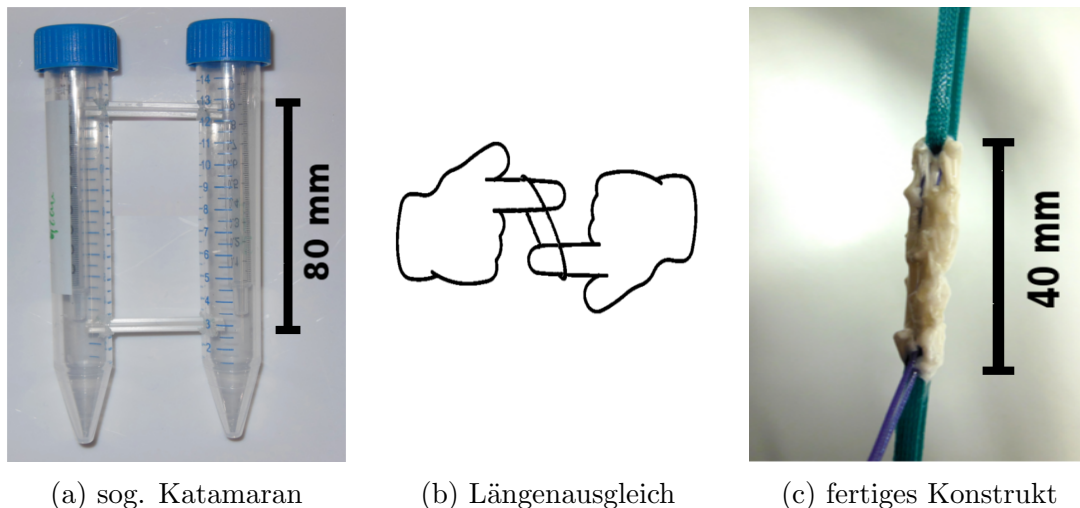


Abb. 8: Konstruktherstellung

2.1.4 Zeitplan der Fertigung

Um möglichst kontrollierte Bedingungen zu haben, wurde versucht, die Konstrukte zügig zu fertigen und eine Charge innerhalb einiger Tage zu bearbeiten. Dennoch ließ es sich manchmal aufgrund unterschiedlich großem Zeitaufwandes pro Charge nicht vermeiden, dass die Fertigungszeit zwischen 3 und 21 Tagen liegt (siehe Tab. 1). Es wurde darauf geachtet die Kühlkette nicht zu unterbrechen, sodass zu jedem Zeitpunkt die Fasern von gekühlter 0,9% NaCl-Lsg. bedeckt waren. Auch zur Gamma-Sterilisation wurden die Proben für die 24-stündige Lagerung außerhalb des Kühlschranks in einer Styroporbox mit Kühllakkus gelagert und anschließend

umgehend auf die verschiedenen Lagerungsorte verteilt oder zur Kontrolle direkt im Abrissversuch getestet (siehe 2.1.6 und 2.2).

Tab. 1: Übersicht Chargenfertigung

Charge	Isoliert	Sterilisiert	Eingelagert	Abriss Kontrolle	Abriss Konstrukte	Lagerdauer
1	01.02.14	12.02.14	-	-	13.02.14	
2	03.02.14	20.02.14	21.02.14	-	22.05.14	3 Monate
3	16.02.14	20.02.14	21.02.14	26.02.14	22.05.14	3 Monate
4	20.02.14	24.02.14	24.02.14	26.02.14	26.05.14	3 Monate
5	21.02.14	24.02.14	24.02.14	26.02.14	26.05.14	3 Monate
6	12.04.14	22.04.14	23.04.14	23.04.14	22.05.14	1 Monat
7	23.04.14	29.04.14	29.04.14	-	28.05.14	1 Monat
8	07.05.14	20.05.14	21.05.14	-	20.06.14	1 Monat
9	10.05.14	20.05.14	21.05.14	22.05.14	20.06.14	1 Monat
10	21.05.14	-	-	-	-	-
11	11.08.14	21.08.14	-	22.08.14	22.08.14	Fibertape
12	18.08.14	21.08.14	-	22.08.14	22.08.14	Fibertape
13	08.10.14	30.10.14	-	31.10.14	31.10.14	Fibertape
14	22.10.14	30.10.14	-	31.10.14	31.10.14	Fibertape
15	06.12.14	11.12.14	12.12.14	12.12.14	19.12.14	1 Woche
16	08.12.14	11.12.14	12.12.14	12.12.14	19.12.14	1 Woche
17	27.07.15	05.08.15	08.08.15	08.08.15	08.02.16	6 Monate
18	21.09.15	29.09.15	30.09.15	30.09.15	30.03.16	6 Monate
19	22.09.15	29.09.15	30.09.15	30.09.15	30.03.16	6 Monate

2.1.5 Fibertapeuntersuchung

Zur Untersuchung der Verstärkungsmöglichkeit der Kollagenkonstrukte wurde der Einsatz von Fibertape im Produktionsprozess untersucht. Die Chargen 11-14 wurden dazu gleichmäßig randomisiert drei Versuchsgruppen zugeteilt (Kontrolle, einfaches und gewobenes Fibertape) (siehe Tab. 2). Zur Kontrolle dienten einfache Minipig-Konstrukte (siehe Abb.9a). In zwei weiteren Gruppen wurde vor der Doppelung der 9 cm langen Kollagenfaserschleife ein 12 cm langes Stück Fibertape einmal lediglich lose hinzugefügt (siehe Abb. 9b) und einmal wie in einem Webstuhl unter den acht Wicklungen einmal zwischen den Kollagenfasern vor und zurück gewebt (siehe Abb. 9c). Anschließend wurde das resultierende Konstrukt wieder als Schleife gedoppelt (Abb. 10b). Das Fibertape endete jeweils blind und wurde nicht weiter verknüpft oder mit dem Surgical Loop zur späteren biomechanischen Testung verbunden. Im Gegensatz zum späteren Großtierversuch diente es hierbei lediglich der Erhöhung des Reibungswiderstandes innerhalb des ACL-Konstruktes.

Tab. 2: Übersicht Fibertape-Chargen

ID	Gruppe	Isoliert	Sterilisiert	mechanische Testung
11.1	Kontrolle	11.08.14	21.08.14	22.08.14
11.2	Kontrolle	11.08.14	21.08.14	22.08.14
12.1	Kontrolle	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.2	einfaches Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.3	einfaches Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.4	gewebtes Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.5	gewebtes Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.6	gewebtes Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.7	einfaches Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.8	einfaches Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.9	gewebtes Fibertape	18.08.14	21.08.14	22.08.14
12.10	Kontrolle	18.08.14	21.08.14	22.08.14
13.1	Kontrolle	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.2	Kontrolle	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.3	Kontrolle	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.4	einfaches Fibertape	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.5	einfaches Fibertape	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.6	einfaches Fibertape	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.7	gewebtes Fibertape	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.8	gewebtes Fibertape	08.10.14	30.10.14	31.10.14
13.9	gewebtes Fibertape	08.10.14	30.10.14	31.10.14
14.1	Kontrolle	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.2	Kontrolle	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.3	Kontrolle	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.4	einfaches Fibertape	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.5	einfaches Fibertape	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.6	einfaches Fibertape	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.7	gewobenes Fibertape	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.8	gewobenes Fibertape	22.10.14	30.10.14	31.10.14
14.9	gewobenes Fibertape	22.10.14	30.10.14	31.10.14

2.1.6 Gammasterilisation von Fasern und Konstrukten

Sämtliche ACL-Konstrukte wurden nach der Fertigung zur externen Gammasterilisation mit > 25 kGy eingeschickt. Dies ist ein Standardverfahren mit hoher Dosishomogenität für Medizinprodukte dieser Dichte, um eine Keimfreiheit zur Implantation zu gewährleisten. Die Konstrukte wurden chargenweise in versiegelten, gekühlten Styroporboxen in steriler NaCl-Lsg. transportiert und innerhalb von 24-

48 h unter Temperaturkontrolle extern bestrahlt. Die Einhaltung der Kühlkette auf 5 °C wurde dadurch garantiert.

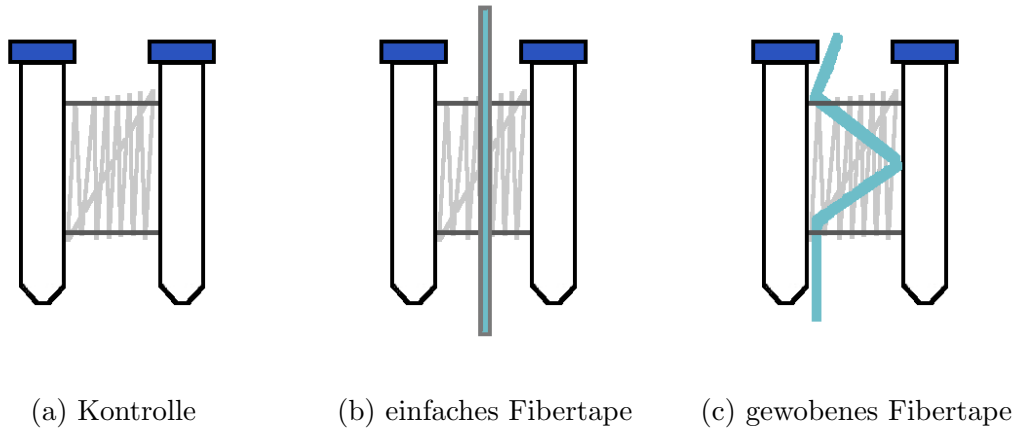


Abb. 9: Fibertapeuntersuchung

2.2 Lagerung der Konstrukte

Zur Untersuchung des Einflusses der Lagerungsbedingungen auf die Stabilität der ACL-Konstrukte vor Implantation wurden zwei variable Bedingungen betrachtet (Zeit und Temperatur).

2.2.1 Lagerbedingungen

Zur Aufbewahrung der Proben wurden fünf Messzeiten zum Zeitpunkt 0 / 1 Woche / 1 / 3 / 6 Monate gewählt. Um zu unterschiedlichen Lagerungsorten eine Aussage zu treffen wurden drei Lagerungsorte unter kontrollierten Temperaturbedingungen analysiert: Gefrierschrank (bei -20 °C), Kühlschrank (bei 5 °C) und kontrollierte Klimakammer (bei 25 °C). Die Temperatur wurde täglich kontrolliert um keine Schwankungen größer als 2 °C zuzulassen. Nach erfolgter Gammasterilisation wurden die Proben pro Charge randomisiert gleichmäßig auf die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen aufgeteilt (siehe 2.2.2).

2.2.2 Lagerungsprotokoll

Tab. 3: Zuordnung der Proben

Temperatur	1 Woche	1 Monat	3 Monate	6 Monate
5 ° C	15.4 15.5 16.3 16.5 16.9 16.14 16.15	6.1 6.4 6.8 9.3 9.7 9.10 9.14	2.1 2.4 3.2 3.6 5.1 5.5	17.1 17.4 17.7 18.2 18.5 18.9 19.1 19.5 19.9
-20 ° C	15.1 15.3 15.6 16.2 16.4 16.7 16.12	6.2 6.5 7.1 9.2 9.6 9.9 9.13	2.2 2.5 3.3 4.1 5.2 5.6	17.3 17.6 17.9 18.1 18.4 18.8 18.11 19.3 19.7
25 ° C	15.8 15.9 16.1 16.6 16.8 16.11 16.13	6.3 6.7 7.2 9.4 9.8 9.11 9.15	2.3 3.1 3.4 4.2 5.3 5.7	17.2 17.5 17.8 18.3 18.6 18.10 19.2 19.6 19.10
	Kontrollen	3.5 4.3 5.4 6.7 9.1 9.5 11.1 11.2 12.1 12.10 13.1 13.2 13.3 14.1 14.2 14.3 15.2 15.7 16.10 16.16 17.10 18.7 19.4 19.8		

2.2.3 Auslegen der Kultur zu Bestimmung von Kontamination

Um wie in vorhergegangenen Studien [86] die Sterilität der Konstrukte besonders über die langen Lagerungszeiträume von 1-6 Monaten bei idealen Wachstumsbedingungen in der Klimakammer zu bestätigen, wurden vor Materialtestung die Konstrukte in den entsprechenden Tubes 30 min in einem Wasserbad bei 37 ° C aufgetaut. Nach gründlicher Durchmischung durch den Vortex wurde jeweils 0,1 ml der zur Lagerung verwendeten 0,9% NaCl-Lsg. auf 1 ml Kulturmedium (95% DMEM mit 10% FCS) auf eine 24 Wellplate gegeben. Jeweils drei Wells pro Probe wurden gegenüber einer Kontrolle aus steriler NaCl-Lsg. ausgelegt, um Verunreinigungen durch Pipetierfehler auszuschließen. Die Wellplates wurden bis zu 2 Wochen bei 36,5 ° C in einem Wärmeschrank bebrütet und nach 3 Tagen, 1 und 2 Wochen jeweils mikroskopisch kontrolliert.

2.3 Großtierversuch

Zur in-vivo Untersuchung des durch Fibertape verstärkten ACL-Konstruktes wurde das bereits bekannte Minipig Modell [88] gewählt. Dieses erweist sich sowohl funktionell als auch anatomisch am ähnlichsten zum menschlichen ACL [89] und wurde

unlängst auch als Standardmodell zur Untersuchung von geschlechtsspezifischen Kreuzbänderkrankungen etabliert [90]. Insgesamt wurden 16 Tiere (Gattung: Göttinger Minipig) einer Kreuzbandresektion mit anschließendem Kreuzbandersatz unterzogen. Das Alter der Tiere betrug zur OP 2,5 - 3,5 Jahre, bei einem Gewicht von > 30 kg, was in etwa einem Erwachsenen / Jugendlichen Menschen entspricht, der skelettal ausgereift ist. Die 16 Studientiere wurden auf zwei Gruppen mit jeweils 4 männlichen und 4 weiblichen Tieren unterteilt und an aufeinanderfolgenden Tagen operiert (siehe Tab. 4). Bereits vor dem OP Tag wurden die Tiere zur Umgewöhnung ans ZEMM gebracht, um dort auch anschließend an die OP bis zur normalen Gehfähigkeit behaust zu werden. Die Tiere wurden jeweils zu zweit in benachbarten Boxen mit engem Kontakt zueinander gehalten. Der Versuch wurde unter der Tierversuchsnummer 55.2-2531.01-86/09 genehmigt und durchgeführt. Das Operationsteam bestand aus mindestens einem Operateur (erfahrener Kreuzbandchirurg und Orthopäde), chirurgischen Assistenten, Veterinärmediziner und Tierpfleger. Die Operation wurde unter hygienisch und baulich gleichen Voraussetzungen wie eine humane Operation durchgeführt.

Zur Anästhesieeinleitung wurde den Tieren nach Punktion der Ohrvene 4 mg/kg Körpergewicht Azaperon verabreicht. Anschließend folgte die Sedierung mit 5,5 - 6 mg/kg Thiopental und 15 mg/kg Ketamin. Dem folgte die intratracheale Intubation mit einem Larynxtubus, sodass die Tiere über einen Respirator kontrolliert beatmet und ihre Vitalparameter überwacht werden konnten. Die Narkose wurde mittels Isofluran weitergeführt und die Analgesie mit Fentanyl (0,005 mg/kg im Bolus) nach Bedarf gesteuert.

Das jeweils rechte Hinterbein wurde als Operationsgebiet markiert. Das linke Bein blieb unbehandelt und diente als korrespondierende gesunde Kontrolle.

2.3.1 OP-Technik

Vor OP Beginn wurde das rechte Hinterbein rasiert und in dreifacher Waschung mit Iod desinfiziert. Der Huf wurde mit einem sterilen Handschuh versehen und abgeklebt und das Operationsgebiet steril abgedeckt.

Die Haut des rechten Knies wurde mit einem medialen Längsschnitt von etwa 10 cm Länge medial um die Patella herum inzidiert und unter Blutstillung subkutan bis auf die Kapsel schichtenweise frei präpariert. Nach Darstellung der Kapsel wurde diese eröffnet und die Patella lateral subluxiert. Zur besseren Darstellung wurde der Hoffasche Fettkörper teilreseziert und das vordere und hintere Kreuzband dargestellt.

Das vordere Kreuzband wurde unter Schonung der umgebenden sehnigen und knor-

Tab. 4: Zuordnung der Versuchstiere

ID	OP-Datum	Versuchsende	Geschlecht	Versuchsdauer	Versuch
52	07/23/2012	09/06/2012	männlich	6 Wochen	Biomechanik
53	07/23/2012	09/06/2012	männlich	6 Wochen	Biomechanik
54	07/23/2012	09/06/2012	männlich	6 Wochen	Histologie
56	07/23/2012	09/06/2012	männlich	6 Wochen	Biomechanik
1	08/03/2012	09/17/2012	weiblich	6 Wochen	Biomechanik
2	08/03/2012	09/17/2012	weiblich	6 Wochen	Biomechanik
5	08/03/2012	09/17/2012	weiblich	6 Wochen	Biomechanik
11	08/03/2012	09/17/2012	weiblich	6 Wochen	Histologie
72	02/14/2013	08/08/2013	männlich	6 Monate	Histologie
73	02/14/2013	08/08/2013	männlich	6 Monate	Histologie
74	02/14/2013	08/08/2013	männlich	6 Monate	Biomechanik
70	02/14/2013	08/08/2013	männlich	6 Monate	Biomechanik
58	02/15/2013	08/09/2013	weiblich	6 Monate	Biomechanik
59	02/15/2013	08/09/2013	weiblich	6 Monate	Biomechanik
60	02/15/2013	08/09/2013	weiblich	6 Monate	Biomechanik
76	02/15/2013	08/09/2013	weiblich	6 Monate	Biomechanik

peligen Strukturen ansatznah an Femur und Tibia abgesetzt und die spätere möglichst anatomische Implantationsstelle identifiziert. Anschließend wurde der tibiale und femorale Tunnel mit einem Kirschnerdraht freihändig vorgebohrt. Es wurde kein femorales oder tibiales Zielgerät verwendet. Anhand der Drähte wurde eine möglichst isometrische Implantationsposition abgeschätzt. Als isometrisch wurde eine so gering wie möglich ausfallende Abstandsänderung der Bohrkanäle zueinander bei Extension und Flexion des Gelenkes angesehen [91].

Die mittels K-Draht markierten Bohrkanäle wurden mit einem kanülierten Bohrer mit 4 mm Durchmesser (Fa. Arthrex©) überbohrt und die femoral vom K-Draht durchstoßene Haut zur erleichterten Button-Fixierung stumpf subkutan aufpräpariert. Das sterile ACL-Konstrukt wurde mit einem Surgical Loop versehen und nach Einlage eines Fibertapes gedoppelt und dreimalig um die eigene Achse gedreht. Zur femoralen Fixierung wurde ein Endobutton mit Führungsfaden vorgelegt und retrograd durch den femoralen Bohrkanal mitsamt des Implantates eingezogen. Dabei war auf das korrekte Umklappen, den festen Sitz des Endobuttons und eine rund 1 cm intrafemorale Lage des Konstruktes zu achten. Nach tibialem Durchzug des Surgical Loops wurde dies auch mithilfe eines Endobuttons unter Vorspannung in 30° Flexion auf der lateralen Tibiavorderseite fixiert. Position, Sitz, Spannung und Anschlag wurden noch einmal geprüft und das OP-Gebiet anschließend schichtweise verschlossen. Der Hautverschluss erfolgte mit einem Hautklammergerät (Fa. B. Braun).

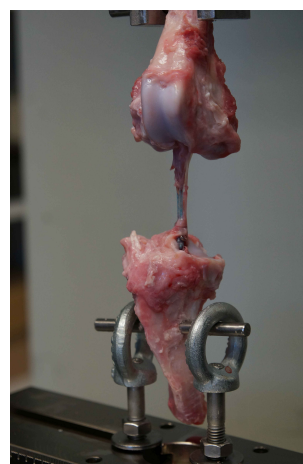
Postoperativ erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Wundverhältnisse, Vitalparameter und des Gangbildes. Erst wenn alle drei Bedingungen unauffällig waren, wurden die Tiere für den entsprechend vorgesehenen Versuchszeitraum vom ZEMM zu einem externen Stall gebracht. Dort wurde alle zwei Wochen das Gangbild analysiert, um die Rehabilitation der Tiere zu dokumentieren. Für die ersten drei postoperativen Tage erfolgte zudem eine Penicillingabe zur Wundinfektionsprophylaxe.

2.3.2 Euthanasie und Präparation

Nach 6 Wochen bzw. 6 Monaten wurden die Tiere nach Transport zum Tierstall des ZEMM zunächst mit Ketamin und Stresnil (intramuskulär im Nacken appliziert) sediert und analgesiert. Anschließend erfolgte die Gabe von Ketamin i.v. über eine punktierte Ohrvene, bevor die Tiere mit T61 eingeschlafert wurden. Sobald der Tod festgestellt wurde, begann die grobe Freipräparation des Kniegelenks beider Hinterläufe und die Durchtrennung von Femur und Tibia 10 cm proximal und distal des Gelenks mit einer Knochensäge. Nach Benetzung der Präparate mit steriler NaCl-Lsg. und Transport ins Labor wurden die beiden Kreuzbänder freipräpariert. Dazu wurden sämtliche stabilisierende Strukturen des Kniegelenks reseziert (Muskeln, Kapsel, Patellar- und Quadrizepssehne, Seitenbänder und Menisken). Das hintere Kreuzband wurde sorgfältig unter Schonung des vorderen Kreuzbandes durchtrennt. Anschließend wurden alle Präparate in PFA-Lösung gelagert bzw. noch am selben Tag der biomechanischen Testung unterzogen.



(a) Material-Prüfungsmaschine sog. Zwick



(b) eingespanntes präpariertes Kniegelenk zur Testung der Reißfestigkeit

Abb. 10: Materialtestung

Zur Untersuchung der Reißfestigkeit der Kreuzbandplastiken wurden die Präparate einer biomechanischen Prüfung mithilfe einer Materialtestmaschine unterzogen (Zwick Z010, Model 1445, Zwick Roell AG, Ulm siehe Abb. 10). Sowohl die einzelnen ACL-Konstrukte nach Lagerung, als auch die präparierten Kadaverknie wurden mit Hilfe von entsprechenden Bolzen in die Prüfmaschine (im Folgenden als "Zwick" abgekürzt) eingespannt. Bei sämtlichen Proben musste auf eine ausreichende Benetzung mit isotoner NaCl-Lsg. geachtet werden, um vor Austrocknung und Verglasung zu schützen. Die in-vitro ACL Konstrukte wurden dabei wie vor Implantation im Minipig dreimalig um die eigene Achse gedreht, bevor sie eingespannt wurden. Standardisiert wurden alle Proben unter einer Vorlast von 1 N eingespannt und die Transversengeschwindigkeit auf 30 mm/min eingestellt. Nach Tarierung mit 10 N wurden zur Bestimmung der Materialeigenschaften Materialdehnung (in mm) und Kraft (in N) zur Erstellung der individuellen Kraft-Dehnungs-Kurve erfasst. Diese ist für ein Ligament wie das ACL charakterisiert durch eine toe region, in der sich die Kollagenfasern der Kraft nach orientieren und gerade ausrichten (a), eine linear region in der die Dehnung des Ligamentes direkt proportional zur aufgewandten Kraft ist (b), und eine yield region, die durch Riss des Konstruktes charakterisiert ist (c) [92]. Anhand dieser Messkurve wurde die Reißfestigkeit der getesteten Konstrukte

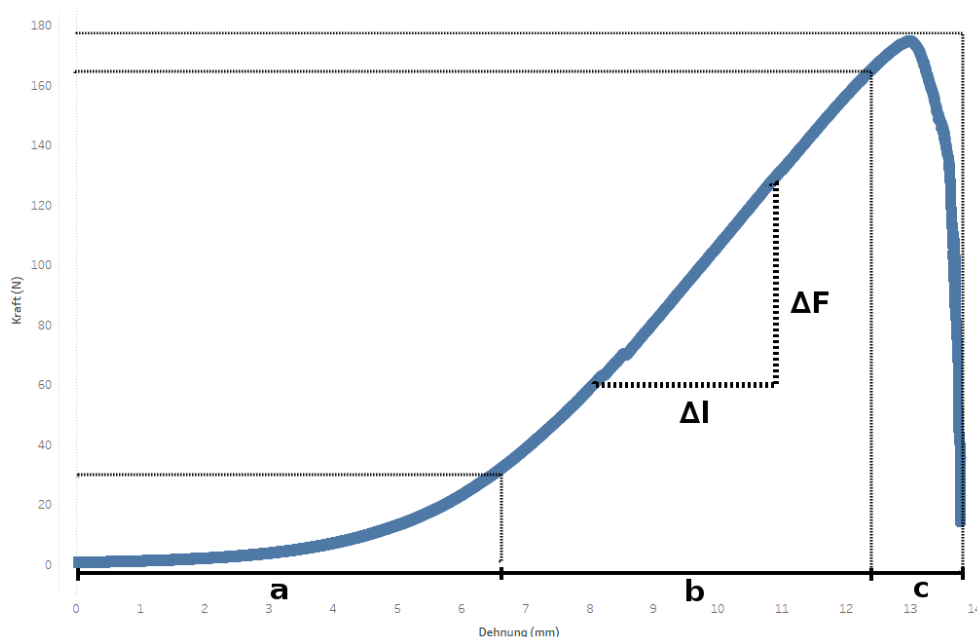


Abb. 11: Beispiel einer Kraft-Dehnungs-Kurve
toe (a), linear (b) und yield region (c)

am Punkt der maximalen Kraft in der yield region bestimmt (maximum failure load MFL). Sie definiert die für eine (Re)ruptur nötige Kraft. Als zweite Messgröße wurde die Steifigkeit als Kraft pro Strecke der Dehnung erhoben. Dies stellt die

Längenzunahme unter der Kraft der Materialtestungsmaschine im Bereich der linear region dar und entspricht somit der linearen Steigung $Steifigkeit = \frac{\Delta F}{\Delta l} \frac{N}{mm}$ [93]. Hierdurch lässt sich ein Maß für die Reaktion des Konstruktes auf die Krafteinwirkung definieren, ohne den Durchmesser wie für das Elastizitätsmodul zu messen. Dies wäre aufgrund der Quelleigenschaften, Größe und Anzahl der Knoten mit einem großen Fehler behaftet. Bei Messung der Reißfestigkeit der Minipigknie wurde außerdem ein zweites Maximum spät in der yield region gemessen, das dem Abriss des Endobuttons über das eingezogene Fibertape entsprach (button failure load BFL). Um ein Maß für die Größe der Konstrukte, die alle mit der exakt selben Länge gefertigt wurden zu bestimmen, wurden die Implantate gewogen. Nach erfolgter Materialtestung wurden die einzelnen Kollagenfasern über 48h luftgetrocknet und das Trockengewicht bestimmt, da die Kollagenfasern je nach Anzahl der Knoten und Beschaffenheit der Kollagenfasern unterschiedlich viel Wasser ziehen.

2.4 Makroskopisches Arthrosescoreing

Neben dem Risiko für eine Reruptur ist die posttraumatische Arthroseentstehung das zweite gefürchtete Outcome nach einer ACL Ruptur. Zur Bestimmung des Arthroseausmaßes wurden alle PFA eingebetteten Knie nach Materialtestung und MRI Untersuchung einem makroskopischen OARSI (Osteoarthritis Research Society International) Scoring der medialen/lateralen Femurcondyle und des medialen/lateralen Tibiaplateaus auf Knorpelschaden und Osteophytenbildung unterzogen [41]. Zusätzlich wurde der Score um die Trochlea erweitert (siehe auch [39]). Der Untersucher war hierzu zu allen Zeitpunkten verblindet und die Präparate randomisiert. Der Score wurde zwar für Schafe und Ziegen entwickelt, jedoch in den letzten Jahren oftmals auch in ACL Minipig Studien genutzt, um die posttraumatische Arthroseentstehung zu quantifizieren [39]. Das Synovium konnte nicht beurteilt werden, da dieses im Zuge der Präparation zügig reseziert und sich die Reste in PFA zügig verfärbten. Zum Vergleich mit vorherigen Tierstudien [87, 88] wurden zusätzlich diese in PFA gelagerten Präparate (Kontrollen und Implantate) nach dem gleichen Muster evaluiert, um festzustellen ob dies nur eine zuletzt aufgetretene Beobachtung ist oder zuvor nicht beachtet wurde. Knorpelschaden und Osteophytenbildung wurden in aufsteigender Schwere des Schadens beurteilt nach den Empfehlungen der OARSI (siehe Tab. 5 und Tab. 6).

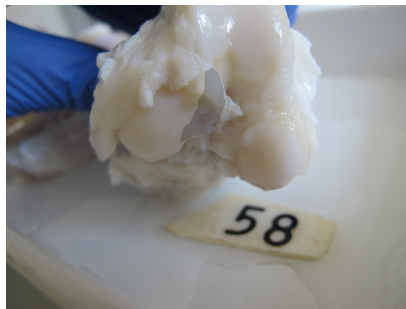
Beide Scoringssysteme ergaben anschließend einen Summationswert über alle fünf Kompartimente der somit für den Knorpelschaden zwischen 0 und 20 und für die Osteophytenentstehung zwischen 0 und 16 liegt.

Tab. 5: Knorpelschaden

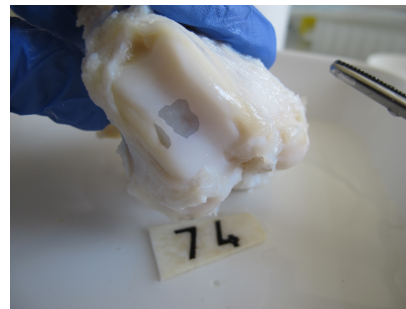
normal, glatte Oberfläche	0 Punkte
oberflächliche Aufrauung	1 Punkt
Faserung und Fissuren	2 Punkte
kleine Erosion (<5 mm Durchmesser) bis zum subchondralen Knochen	3 Punkte
große Erosion (>5 mm Durchmesser) bis zum subchondralen Knochen	4 Punkte

Tab. 6: Osteophytenbildung

normale Gelenkbegrenzung	0 Punkte
leichte Osteophytenbildung (<2 mm Auswuchs oder <20% des Gelenkrandes)	1 Punkt
moderate Osteophytenbildung (2-4 mm oder 20-50% des Gelenkrandes betroffen)	2 Punkte
schwere Osteophytenbildung (>4 mm oder >50% des Gelenkrandes betroffen)	3 Punkte



(a) Großer Osteophyt (OARSI-Score von 3 Punkten) laterale Femurkondyle medial



(b) Großer Knorpelschaden (OARSI-Score von 4 Punkten) der Trochlea

Abb. 12: Makroskopisches OARSI-Scoring auf Osteophyten und Knorpelschäden. Läsionen beispielhaft grau unterlegt

2.5 Histologie

Pro Zeitpunkt (6 Wochen/Monate) wurden jeweils zwei Präparate ohne vorherige Materialtestung zur histologischen Aufarbeitung an das Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskelettale Regeneration der medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin geschickt. Nach Präparation wurden die Knie in 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Die Knochen wurden entlang der Bohrkanaalführung in einem Makrotrennschleifsystem eingespannt und in 4 mm dicke Knochen-scheiben geschnitten um sie anschließend in einem Fixiergitter weiter zu prozessieren.

Zuerst erfolgte die Entkalkung der Knochenscheiben mittels 14-tägig ausgetauschter EDTA Lösung bei 37 ° C im Wärmeschrank bis zum vollständigen Verlust des weißlich erkennbaren Knochenkerns. Anschließend folgte die Entwässerung nach angefügtem Protokoll (siehe Anhang). Die so gewonnenen Gewebeproben wurden in Paraffinblöcke eingebettet, auf einer Kühlplatte ausgekühlt und mittels Mikrotom in 4 μm dicke Schnitte überführt. Diese wurden mittels 30 ° C erwärmten Wasserbades auf silanisierte Objektträger übertragen, bevor sie für die anschließende Färbung über Nacht auf einer Heizplatte getrocknet wurden.

Zur Beurteilung des Knorpels, ebenso wie der knöchernen Insertion, wurde eine Movat-Pentachrom-Färbung durchgeführt (siehe Färbeprotokoll im Anhang). Die Movat-Pentachrom-Färbung ist eine Spezialfärbung, mit der sämtliche Bestandteile des Bindegewebes angefärbt werden: Zellkerne und elastische Fasern schwarz, Kollagen- und retikuläre Fasern (z.B. Knochen) gelb, mineralisierter Knorpel blaugrün, Glykosaminoglykane leuchtend hellblau, Grundsubstanz und Muzine blau, Fibrin hellrot, Muskulatur und Zytoplasma rot. Zur Betrachtung und Anfertigung der Aufnahmen wurde das Keyence BIOREVO BZ-9000 Mikroskop verwendet.

Hiermit wurde zunächst eine 4x-Übersichtsaufnahme als whole slide image (WSI) angefertigt und der an den Bohrkanal angrenzende Knorpel identifiziert. Dieser wurde in einem zweiten Schritt dann als 20x-WSI aufgenommen und konnte so qualitativ orientierend am mikroskopischen OARSI Arthroscore [41] in der Gesamtheit betrachtet werden. Da die Probengröße limitiert auf vier histologische Proben war, wurde qualitativ nach mikroskopischen Arthrosemerkmalen gesucht. Diese umfassen Struktur (Oberflächenbeschaffenheit, Fissuren, Erosionen), Zelldichte (Zellzahl pro Fläche, zelleere Areale), Zellklonierung (Doublets, Triplets, Cluster), Farbeintensität und Knorpel-Knochen-Übergang (intakte Tidemark, Gefäßeinsprossung). Zur Auswertung wurde zunächst das gesamte WSI betrachtet und über dem gesamten Verlauf des Knorpels jedes Arthrosemerkmal für sich gesucht.

2.6 MRT Analyse

Um die postoperative Funktionalität wiederherzustellen ist die Bohrkanalposition entscheidend [91]. Da intraoperativ kein Zielgerät verwendet wurde, sollte die Positionierung des Implantates überprüft werden, da eine bessere strukturelle und anatomische Wiederherstellung des Kreuzbandes mit geringerem Knorpelschaden assoziiert ist [90]. Zur Überprüfung der Bohrkanalposition, sowie der Integration des Implantates in den Bohrkanal wurden sämtliche operierten Knie nach Materialtestung am Fraunhofer IIS Abteilung MRB (Magnetresonanz- und Röntgen-Bildgebung) magnetresonanztomographisch vermessen (Siemens Magnetom Skyra

3,0T). MR-Aufnahmen wurden sagittal und coronal in T1, T2 und PD Wichtung angefertigt.

2.6.1 Bohrkanalmessung

Zur Bildbearbeitung wurde Onis (Onis 2.6.0.1 2009-2015 Digitalcore co. ltd) als DICOM Viewer verwendet. Zunächst wurde die PD Wichtung in sagittaler Ausrichtung genommen und als Multi-Planar-Reconstruction (coronal, sagittal und axial) anhand des Femurs ausgerichtet. Dabei diente der Femurschaft (sagittal und coronal), und die Verbindungslinie zwischen Notch und Trochlea zur Ausrichtung im dreidimensionalen Raum (siehe Abb. 13).

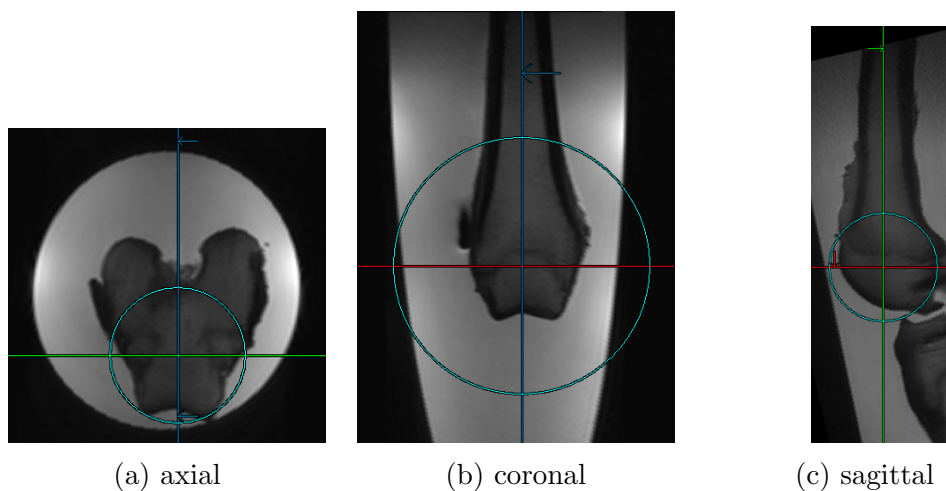
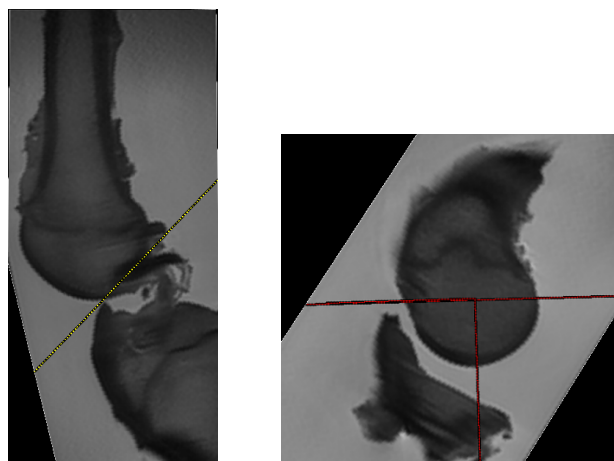


Abb. 13: Ausrichtung Femur

Anschließend wurde die Blumensaat Linie im sagittalen Bild aufgesucht. Von dort aus wurde anhand der Quadrantenmethode [94] die anteriore-posteriore Position und die proximal-distale Position des Zentrums des Bohrkanals relativ zur Blumensaat Linie gemessen. Da diese Methode für das laterale Röntgenbild entwickelt wurde, muss im MR-Bild zunächst der höchste Punkt der Notch aufgesucht und in dieser Verbindungslinie (siehe Abb. 14a) die maximale Ausdehnung über die laterale Femurkondyle bestimmt werden. Ebenso wird mit der Orthogonalen hierzu verfahren (siehe Abb. 14b). Das Verhältnis $\frac{a}{A}$ und $\frac{b}{B}$ beschreibt die relative Position des Bohrkanals innerhalb der Quadranten der Sagittalebene (siehe Abb. 15). Diese Orientierung wird auch Bernard-Hertel-Raster genannt [95].



(a) Blumensaat Linie (b) max. Projektion LFC

Abb. 14: Tunnelposition Femur

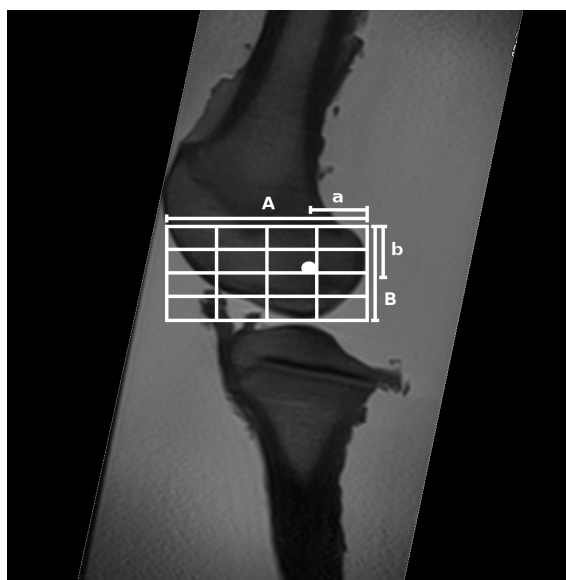


Abb. 15: Quadrantenmethode: relative Bohrkanalposition zur maximalen anterior-posterioren und proximal-distalen Femurkondylenausdehnung zur Blumensaat Linie

Entsprechend wurde in einem zweiten Schritt mit der Tibia verfahren, wobei hier der Tibiaschaft (coronal), die Wachstumsfuge (sagittal) und die Verbindungslinie zwischen tibial spine und tuberositas tibiae (axial) zur Orientierung dienten (siehe Abb. 16).

Im so ausgerichteten Sagittalschnitt wurde auf Bohrkanalhöhe die anterior-posteriore Position und im Coronalschnitt die medial-laterale Position ermittelt (siehe Abb. 17b). Entsprechend sind die tibialen Tunnelpositionen über das Verhältnis $\frac{c}{C}$ und $\frac{d}{D}$ definiert, wie von Stäubli und Rausching erstmalig beschrieben [96].

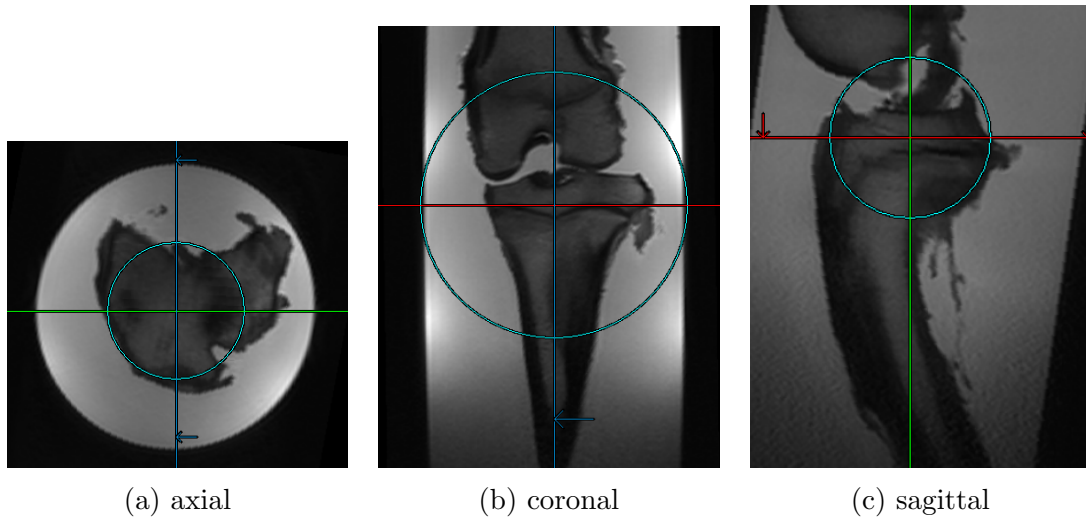


Abb. 16: Ausrichtung Tibia

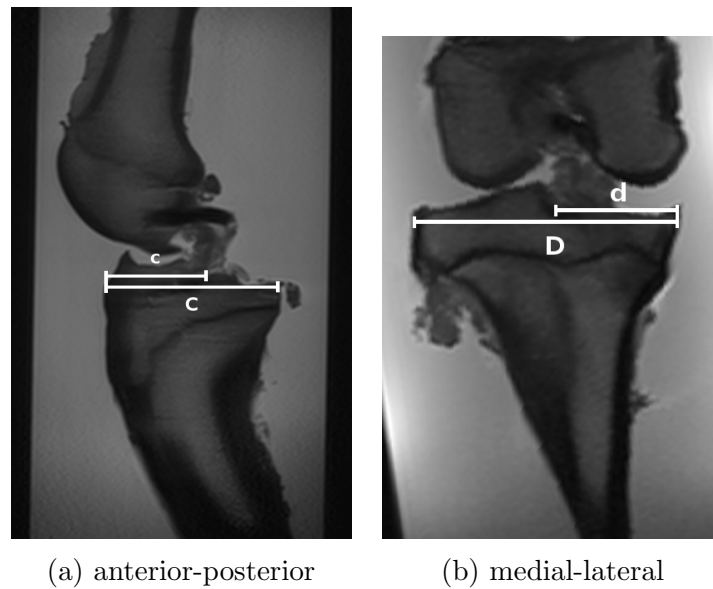


Abb. 17: Tunnelbestimmung Tibia

Anhand von Kadaverstudien wurden neben Röntgen auch eine Reihe MRT und CT Messungen nach oben beschriebener Messmethode durchgeführt, um die ursprüngliche Insertionsstelle des ACL möglichst genau zu charakterisieren. Daher wurden aus einem kürzlich veröffentlichten Review hierzu [97] die ideale anatomische Position übernommen. Da die Bestimmung der tibialen medial-lateralen Bohrkanalposition in der Literatur uneinheitlich ist, wurde dabei auf die Messungen von Parkinson et. al. [98] zurückgegriffen (siehe Tab. 7).

Zu diesen anatomischen Insertionspunkten wurde die absolute Entfernung der gemessenen Bohrkanäle nach Pythagoras $c = \sqrt{a^2 + b^2}$ gemessen und in Relation zu den jeweils bestimmten Arthroseschaden gesetzt (siehe makroskopischer OARSI Score).

Tab. 7: Referenzpositionen nach Parkar und Parkinson [97, 98]

	Femur		Tibia	
	anterior-posterior	proximal-distal	anterior-posterior	medial-lateral
mittlere Position in % (Konfidenzintervall)	28,6 (23,5, 37,3)	34,5 (28,4, 42,6)	43,4 (39,0, 46,5)	48,0 (46,0, 50,0)

Hierzu wurde eine Korrelationsmatrix nach Pearson benutzt und aufgrund von multipler Testung nach Bonferroni ($n=4$ da zwei Abstände und zwei OARSI Scores für Knorpel und Osteophyten) korreliert. Daher wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq \frac{0.05}{4} \leq 0.0125$ definiert.

2.7 Statistische Auswertung

Die Positionierung und Messung der Tunnelpositionen wurden jeweils fünfmal verblindet und randomisiert von demselben Beobachter durchgeführt und der Durchschnitt der fünf gebildeten Verhältnisse als Messwert genommen. Zum Vergleich mit der anatomisch idealen Insertionsstelle wurde ein t-Test verwendet und das Signifikanzniveau mit 5% definiert. Für alle weiteren statistischen Auswertungen mit mehr als zwei beobachteten Messgrößen wurde zuerst mit einem Bartlett Test die Homogenität der Varianz abgeschätzt. Bei einem p-Wert < 0.05 wurde die Nullhypothese (die Varianz ist gleich für alle Behandlungsgruppen) abgelehnt. Bei Homogenität der Varianz konnte ein ANOVA Test mit post-hoc Tukey Test zum multiplen Vergleich angewandt werden. Demgegenüber musste bei Inhomogenität auf einen Kruskal-Wallis Test mit post-hoc Wilcoxon Test zurückgegriffen werden. Sämtliche Tests wurden ebenso wie die zugehörigen Grafiken mit R (RStudio Version 1.1.383 – © 2009-2017 RStudio, Inc.) berechnet.

2.8 Verwendete Lösungen und Medikamente

- Buprenorphin (Richett-Benckiser, UK)
- 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 (Applichem A3672.0250, über Fa. Hartenstein, Würzburg, 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)
- Hämatoxylin-Lösung (4302, Merck, Darmstadt, D)
- Hexamethylendiisocyanat (Fluka, Buchs, CH)
- Isofluran (Forene Abott GmbH, Wiesbaden, D)
- Ketamin (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D)
- Mercaptoethanol (1.15433, Merck, Darmstadt, D)
- NaCl (Merck 6404, F. Merck, Darmstadt, D)
- NaCl 0,9% steril und unsteril (Delta Select GmbH, Pfullingen, D)
- Paraformaldehyd 4%
- Penicillin (Vetoquinol AG, Ittingen, CH)
- Ringer-Lactat Lösung (B. Braun, AG, Melsungen, D)
- Thiopental (Nycomed Deutschland GmbH, D)
- Zählkammer (Neubauer Improved Paul Marienfeld GmbH Co. KG, Lauda-Königshofen, D)

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

2.9 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
- Autoklav Varioklav (Varioklav, HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, D)

- Becherglas (Hartenstein, Würzburg, D)
- Bohrer kanüliert (0.3, 3.5, 4.0, 4.5) Set (Arthrex, Karlsfeld, D)
- Bohrer steril
- Brutschrank (Hera Cell)
- Brutschrank (Heraeus, Osterode, D)
- Combitip plus (von Eppendorf; 5 ml, 1 = 10 μ l 0030069.455; 10 ml, 1 = 200 μ l 0030069.269, Hamburg, D)
- Deckgläser (Menzel Gläser, D)
- Durchlichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss)
- Elektrokauter
- 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)
- Filterhalter (25 mm, steril, Fa. Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, D. Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH Würzburg/Fa. Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D)
- Fotoschale aus Kunststoff
- Gewichte (200 g, 500 g, 600 g, 1000g)
- 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)
- Inkubator für Zell- und Gewebekulturen (BB6060, Heraeus, Hanau, D)
- Kanüle 2 mm

- Kirschnerdraht mit Öse 15 mm (Arthrex, Karlsfeld, D)
- Knochennadel
- Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Nussloch, D)
- Längenmessgerät (Arthrex Karlsfeld, 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)
- Mikroskop (Keyence Fluoreszenz-Mikroskop HS Modellreihe BZ-9000 (BIOREVO))
- Mikrotom (Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D)
- Mullkompressen (Braun Melsungen, D)
- 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)
- Polyethylen Green 3 mm, (Johnson Johnson, Norderstedt, D)
- Präparierschere
- Rattenschwänze (Charles River, Sulzfeld, D)
- Schlitztuch (Cardinal Health, Tuttlingen, D)
- Seralon OP-Faden (Serag-Wiessner, Nailla, D)
- Sicherheitswerkbank Klasse II (HS 15, Heraeus, Osterode, 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)
- Surgical Loop (B. Braun, Melsungen, D)
- Suture Button 3,5 mm (Arthrex, Karlsfeld, D)
- Tube 50 ml, Röhrchen (Greiner Bio One 227261, Frickenhausen, 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, D)
- Waage III (Kern 770, max 220 g, Kern und Sohn GmbH, Allstadt, D)
- Wärmeschrank (Heraeus Kulzer GmbH Co. KG., Wehrheim, D)

3 Ergebnisse

3.1 Biomechanische Ergebnisse der Kollagenkonstrukte

Um möglichst vergleichbare Konstrukte herzustellen, wurden Qualitätskontrollen, die die Stabilität und Integrität der Fasern und Knoten während der Fertigungsschritte testeten, eingeführt. Insgesamt zeigte sich dennoch eine starke Variation der Reißfestigkeit der Kollagenfasern sowohl bei der Aufreinigung, Anfertigung des Fadens als auch bei der Materialtestung. Der Ertrag stabiler Kollagenfasern, die die Qualitätskontrolle bestanden, fiel je prozessierter Charge unterschiedlich aus. Im Falle von Charge Nr. 10 wurde nicht ein einziges Konstrukt gefertigt, das den Qualitätsansprüchen standhielt, im Gegensatz zu Charge Nr. 16, die 16 fertige Minipig-Konstrukte hervorbrachte.

3.2 Einfluss der Lagerungsbedingung

Für jede Charge wurde über die Lagerungsbedingungen und Kontrollbedingung randomisiert. Aufgrund der geringen Konstruktzahl pro Charge wurde nicht zusätzlich innerhalb einer Charge auf die unterschiedlichen Versuchszeiten randomisiert. Daher sind einzelne Chargen nur einem Zeitpunkt zugeordnet aber sobald drei oder mehr Konstrukte pro Charge gefertigt wurden, wurden diese auf alle drei Lagerungsbedingungen verteilt. Daher ist es möglich, die Zeit als einen konstanten Faktor zu betrachten und losgelöst davon die Temperaturunterschiede zu vergleichen. Wenn man daher für die Zeit kontrolliert, zeigt sich über die verschiedenen Lagerungsbedingungen untereinander genauso wie gegenüber der Kontrolle kein signifikanter Unterschied (getestet mit einem ANOVA $p > 0,05$). Die durchschnittliche Reißfestigkeit liegt zwischen Kontrollen (162,5 N), -25°C Konstrukte (159,5 N), 5°C Konstrukte (149,4 N) und 25°C Konstrukte (159,9 N) relativ dicht beieinander (siehe Abb. 8).

Für den Einfluss der Zeit wurde ein linearer Effekt im Sinne einer Abnahme der Reißfestigkeit über die Zeit angenommen. Ein daraufhin aufgestelltes lineares Modell mit den beiden Effekten von Gruppe (Lagerungsbedingung) und Zeit wurde mittels R package ltm getestet. Die p-Werte für die Korrelation lagen mit und ohne Interaktion zwischen den Effekten bei 0,361 - 0,775. Die Summe der Varianzen der zufälligen Effekte bezogen auf die gesamte Varianz betrug 53,45%. Betrachtet man die Ergebnisse der Reißfestigkeit über die Zeit (siehe Abb. 19a) sieht man eine Abweichung der 6 Monatsbedingung von dem zuvor beobachteten Trend. Da-

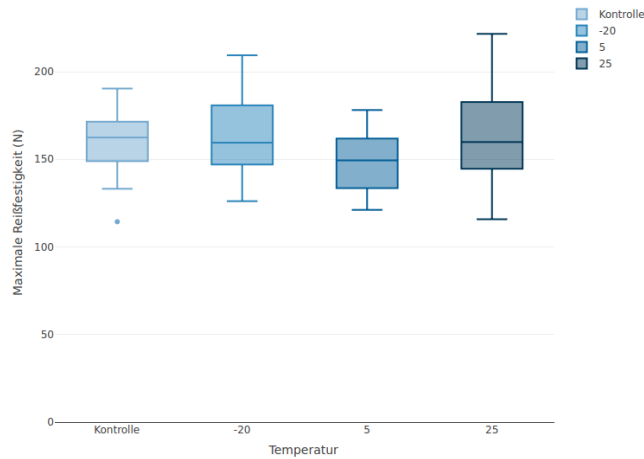


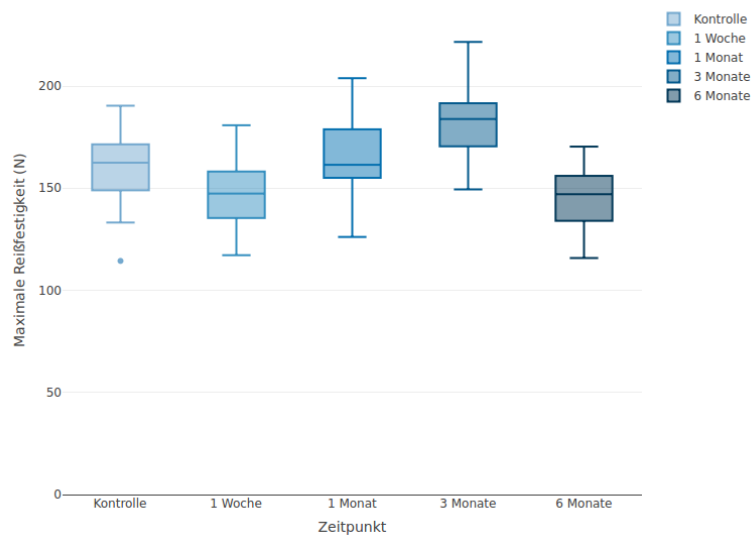
Abb. 18: Reißfestigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur

her wurde ein Gruppenvergleich zwischen den Zeitpunkten (1 Woche, 1 / 3 / 6 Monate) durchgeführt. Nach ANOVA Testung zeigte sich mit einem F-Wert = 14.02 und p-Wert $< 5 \times 10^{-6}$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Zur Bestimmung der genauen Unterschiede wurde als Post-hoc Test ein Tukey Test durchgeführt der adjustiert für multiple Testungen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bei folgenden Gruppen zeigte (siehe Tab. 8).

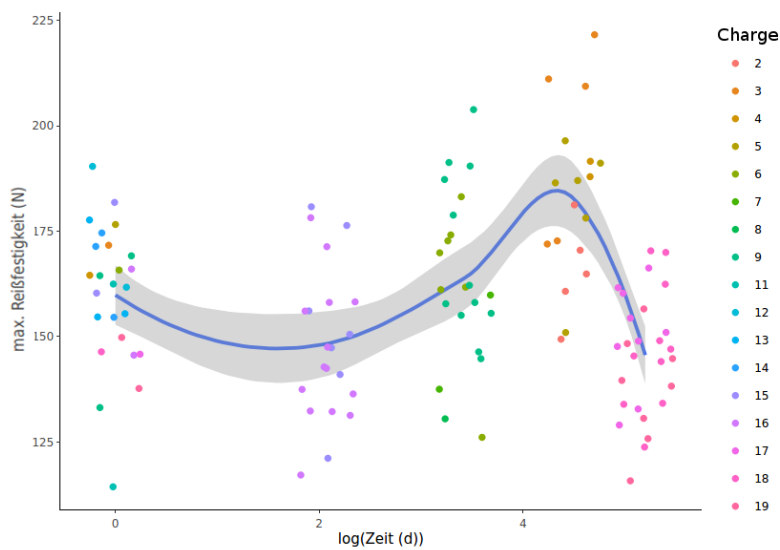
Tab. 8: Signifikante Gruppenunterschiede der Reißfestigkeit

Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Δ Reißfestigkeit in N	p-Wert
1 Monat	1 Woche	15,76	0,036
3 Monate	Kontrolle	22,55	0,0007
3 Monate	1 Woche	34,06	<0,0001
3 Monate	1 Monat	18,39	0,0126
6 Monate	Kontrolle	-14,21	0,037
6 Monate	1 Monat	-18,37	0,0042
6 Monate	3 Monat	-36,76	<0,0001

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist nicht nur der Verlauf zu den Messzeitpunkten zu betrachten, sondern auch die Zuordnung verschiedener Chargen zu dem jeweiligen Zeitpunkt (siehe Abb. 19b in der die Chargennummern farbkodiert und zur besseren Übersicht pro Zeitpunkt leicht auseinandergezogen sind). Für die Steifigkeit der Konstrukte zeigte sich ein gleiches Bild. Ein Vergleich der Reißfestigkeit mit der Steifigkeit der Konstrukte zeigte einen linearen Trend (siehe Abb. 20a). Dieses wurde mittels eines linearen Modells in R bestätigt. Der p-Wert der linearen Regression lag bei $p = 4 \times 10^{-9}$ und der F-Wert bei 40,73.



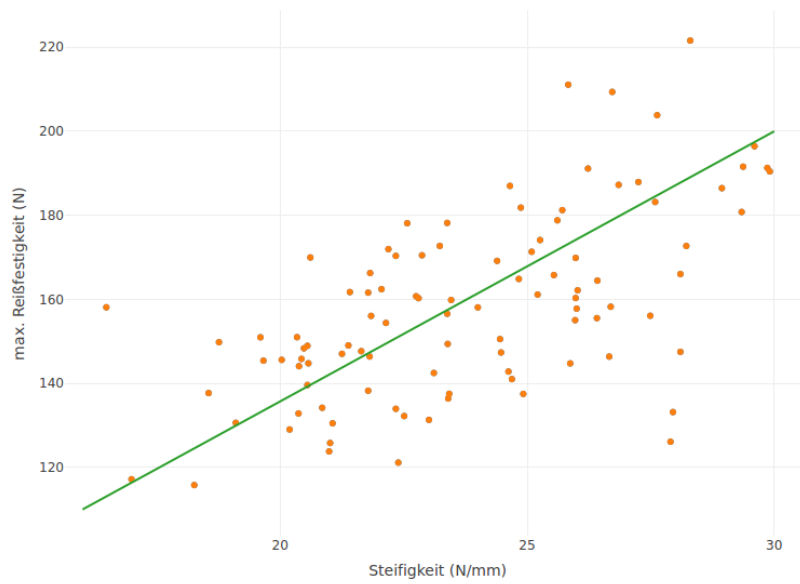
(a) Reißfestigkeit über die Zeit



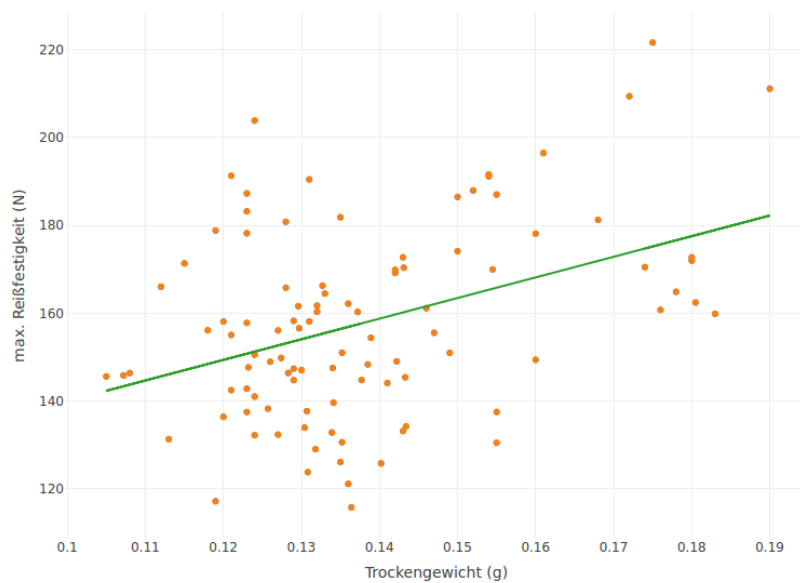
(b) Verlauf über die Zeit (logarithmisch) inkl. Chargen (Farben) und Trendlinie

Abb. 19: Einfluss der Lagerung über die Zeit

Ebenso zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem nach Materialtestung bestimmten Trockengewicht und der Reißfestigkeit (siehe Abb. 20b). Je höher die Masse der gefertigten Konstrukte umso höher die maximale Reißfestigkeit. Der p-Wert der linearen Regression lag bei $p = 4,7 \times 10^{-5}$ und der F-Wert bei 18,19.



(a) Reißfestigkeit über Steifigkeit



(b) Reißfestigkeit über Trockengewicht

Abb. 20: Zusammenhänge der Reißfestigkeit von der Materialbeschaffenheit

3.3 Sterilität der gelagerten Kontrukte

Die beimpften Kulturen wurden bei $36,5^{\circ}\text{C}$ bebrütet und nach 3 Tagen, 1 Woche und 2 Wochen durchlichtmikroskopisch untersucht. Mit Ausnahme von einer Kontrolle wurde in keiner Kammer ein mikroskopisches Zellwachstum zu allen Zeitpunkten beobachtet. Die zu dieser Kontrolle korrespondierenden Proben blieben unauffällig.

3.4 Biomechanik der Fibertapekonstrukte

3.4.1 Unterschiede der Reißfestigkeit

Durch das zur Verstärkung eingesetzte Fibertape zeigte sich eine Erhöhung der Reißfestigkeit gegenüber der einfachen Kontrolle 161,73 N und zwar sowohl für das einfache Fibertape (195,71 N) als auch das gewebt eingesetzte Fibertape (202,11 N). Das eingefügte Fibertape war hierbei nicht lastentragend in der Materialtestungsmaschine eingespannt. Zur Ermittlung der Homogenität der Varianz wurde der Bartlett Test durchgeführt der mit $p=0,04$ unterhalb des definierten Signifikanzniveaus von 5% lag. Daher wurde im weiteren Verlauf ein Kruskal-Wallis Test angewand, der jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (sowohl untereinander als auch zur Kontrolle) zeigte. Dies wurde durch einen paarweisen T-Test nach Benjamini-Hochberg adjustiert ebenfalls bestätigt:

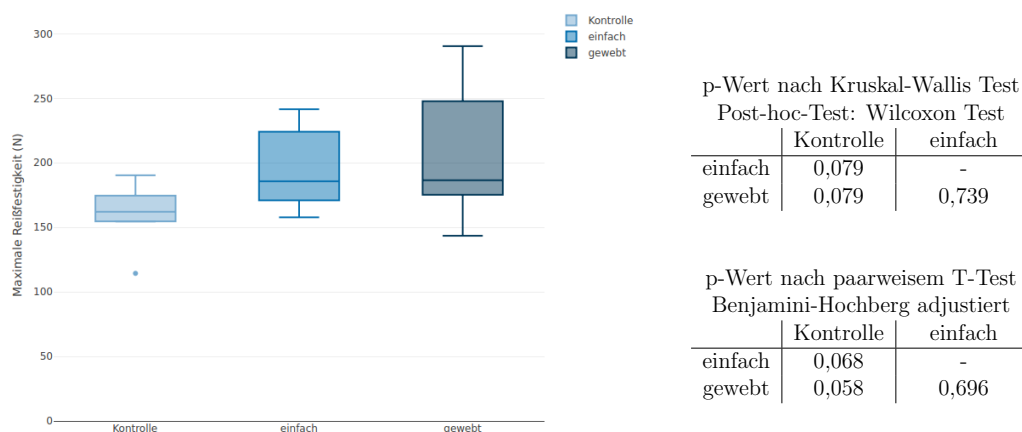


Abb. 21: Fibertapeuntersuchung auf Reißfestigkeit

3.4.2 Unterschiede der Steifigkeit

Die durchschnittliche Steifigkeit der zur Kontrolle der Fibertape untersuchten Konstrukte belief sich auf 24,74 N/mm und lag damit etwas niedriger als die einfach Fibertape verstärkten (27,78 N/mm) und die gewebt verarbeiteten (27,16 N/mm) Konstrukte (siehe Abb. 22). Der p-Wert für die Homogenität der Varianz der Steifigkeit lag mit 0,095 über dem Signifikanzniveau von 0,05 (Bartletts Test).

Dadurch ließ sich eine gleiche Varianz der drei Gruppen annehmen und zum Gruppenvergleich ein einseitiger ANOVA-Test durchführen. Dieser zeigte bei einem p-Wert von 0,0591 jedoch keinen signifikanten Gruppenunterschied an, ebenso wie der paarweise Vergleich adjustiert nach Benjamini-Hochberg:

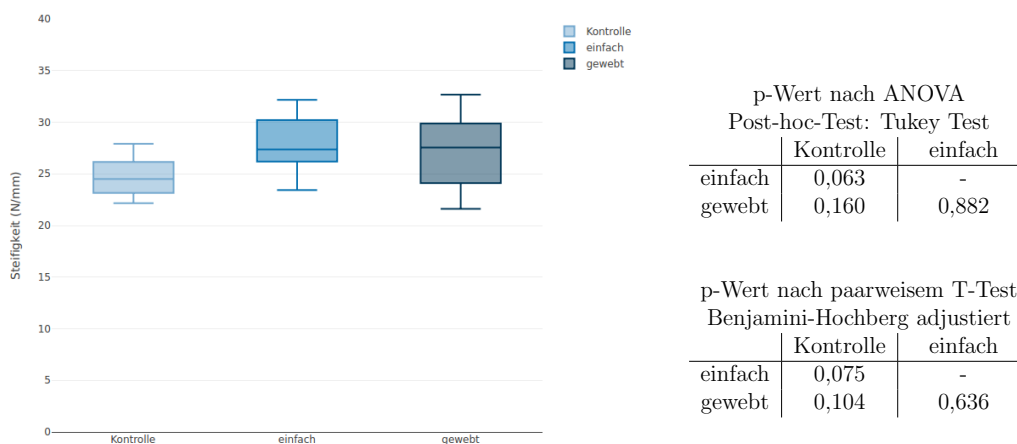


Abb. 22: Steifigkeit der Fibertapeuntersuchung (Kontrolle, einfacher und gewebter Fibertapeeinsatz) ohne signifikanten Gruppenunterschied

3.5 Ergebnisse des Tierversuchs

Postoperativ zeigten mit Ausnahme eines Tieres (ID: MP 59) alle Minipigs einen unauffälligen Verlauf mit zügiger Rückgewinnung der Gehfähigkeit und keinem äußerlich erkennbaren Unterschied im Gangbild zur Gegenseite nach einem Monat. Auffällig bei Eröffnung der Gelenkkapsel und Freilegung des ACL war die Formierung von Osteophyten und Unregelmäßigkeiten in der Knorpeloberfläche.

3.5.1 Materialtestung

Die präparierten Minipig Knie wurden nach Einspannung mit Bolzen in die Zwick derselben Testsequenz unterworfen wie die einzeln gefertigten ACL Konstrukte. Die Kraft-Dehnungskurve zeigte hierbei einen typischen zweigipfligen Verlauf (siehe Abb. 23) mit dem Riss des ACL Konstruktes (a) und einem anschließend zweiten Maximum (b), das durch den Einzug des Endobuttons in den Bohrkanaal gekennzeichnet war. Das Fibertape war zu diesem Zeitpunkt noch weitestgehend intakt. Dieses zweite Maximum lag bei den operierten 6 Wochenknien bei durchschnittlich 446,24 N und nach 6 Monaten ohne signifikanten Unterschied bei 435,56 N. Die dabei beobachtete durchschnittliche Reißfestigkeit der operierten Kreuzbänder nach 6 Wochen war mit 81,00 N geringer als die der entsprechenden linken Kontrollknie mit durchschnittlich 529,17 N zum selben Zeitpunkt. Ebenso lagen die implantierten Kreuzbänder nach 6 Monaten mit 345,56 N niedriger als die entsprechenden Kontrollen mit 943,50 N. Da die Varianz sich nach Bartlett Test mit $p=0,0003$ und damit als inhomogen ($p < 0,05$) herausstellte, wurde auf einen Kruskal-Wallis

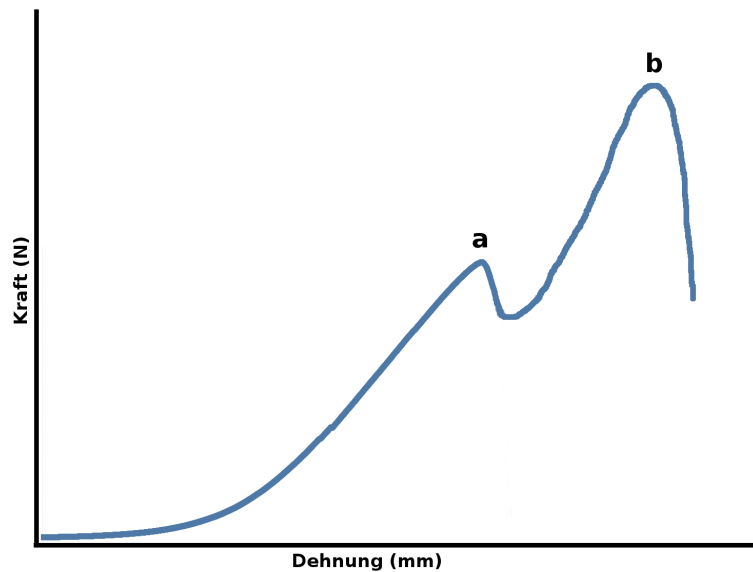
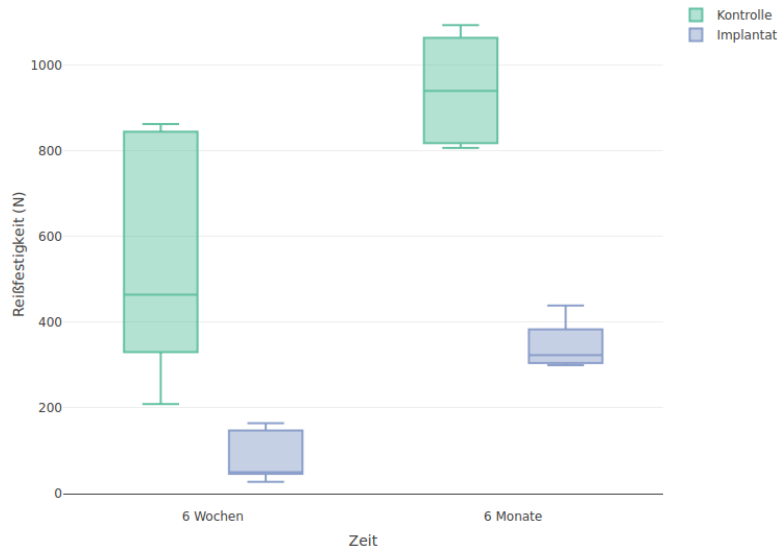


Abb. 23: Schematische Kraft-Dehnungskurve mit Konstruktriss (a) und Endobuttoneinzug (b)

Test zurückgegriffen und die Gruppen post-hoc mit dem Wilcoxon Test verglichen. Sowohl die 6 Wochen- ($p=0,0119$) als auch die 6 Monatsergebnisse ($p=0,0035$) waren hierbei signifikant.

Ebenso fiel die Verbesserung beider Knie über die Zeit auf. Vom 6 Wochen- auf den 6 Monatszeitpunkt verbesserte sich sowohl das operierte Kreuzband ($p=0,0101$), als auch die gesunde Kontrolle ($p=0,0212$) (siehe Abb. 24).

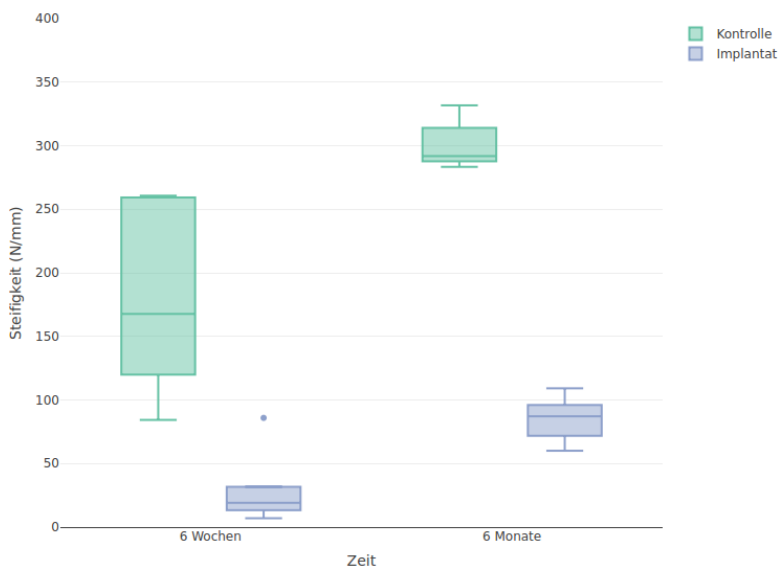
Die ebenfalls untersuchte Steifigkeit der Konstrukte, die sich aus der linearen Region der Kraft-Dehnungs-Kurve ergab, zeigte einen ähnlichen Verlauf. Da die Varianz mit $p=0,055$ nach Bartlett Test noch knapp ($p > 0,05$) als homogen angesehen werden konnte, wurde zur multiplen Testung ein ANOVA mit post-hoc Tukey Test angewandt. Zwischen den 6 Wochen-Kontrollknien ($176,59 \text{ N/mm}$) und dem 6 Wochen-Implantatknien ($29,34 \text{ N/mm}$) gab es einen signifikanten Unterschied ($p=0,0003$) zu verzeichnen. Dasselbe ließ sich zum 6 Monatszeitraum von $300,07 \text{ N/mm}$ (Kontrolle) auf $85,22 \text{ N/mm}$ (Implantat) mit $p < 0,0001$ beobachten. Die Steifigkeit der Kontrollknie nahm über die Zeit zu ($p < 0,0001$), wohingegen die Steifigkeitszunahme der operierten Kreuzbänder keine Signifikanz ($p=0,2355$) erreichte (siehe Abb. 25).



p-Wert nach Kruskal-Wallis Test / Post-hoc-Test: Wilcoxon Test

		6 Wochen	6 Monate	
		Kontrolle	Kontrolle	Implantat
6 Wochen	Kontrolle	-	0,0212	0,2677
	Implantat	0,0119	0,0076	0,0101
6 Monate	Implantat	0,2677	0,0035	-

Abb. 24: Reißfestigkeit des Minipig ACL nach 6 Wochen / 6 Monaten gegenüber Kontrollknien sowie Ergebnis des statistischen Vergleichs der Versuchsgruppen



p-Wert nach ANOVA Test / Post-hoc-Test: Tukey Test

		6 Wochen	6 Monate	
		Kontrolle	Kontrolle	Implantat
6 Wochen	Kontrolle	-	< 0,0001	0,0103
	Implantat	0,0003	< 0,0001	0,2355
6 Monate	Implantat	0,0103	< 0,0001	-

Abb. 25: Steifigkeit des Minipig ACL nach 6 Wochen / 6 Monaten gegenüber Kontrollknien sowie Ergebnis des statistischen Vergleichs der Versuchsgruppen

3.5.2 Arthrosescoreing

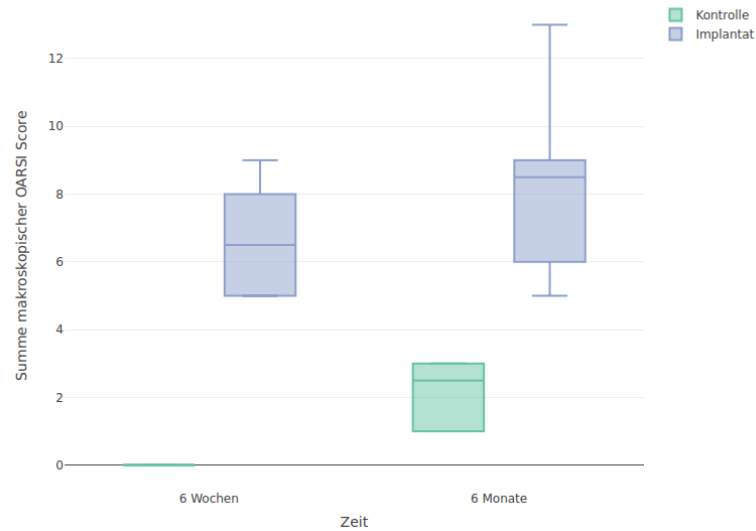
Die prominenteste Osteophytenbildung zeigte sich an dem distalen Ende der Trochlea sowohl medial- als auch lateralseitig, sowie an der Medialseite am Dach der Notch der lateralen Femurkondylye (LFC). Knorpelschäden manifestierten sich wiederum in Osteophytennähe an Trochlea und LFC und der lateralen Notchseite der MFC. Außerdem stach sowohl bei Implantat- wie auch Kontrollknien ein Knorpelabrieb an den nicht vom Meniskus bedeckten Arealen des Tibiaplateaus ins Auge (tibial spine von MTP / LTP).

Die Sample wurden von einem geschulten Beobachter ohne Kenntnis der Versuchszeiten durchgeführt und ergaben folgende Werte (siehe Tab. 9). Der gemittelte Gesamarthrosescore unterschied sich bereits zum 6 Wochenzeitpunkt sowohl für den Knorpel (0,0 zu 6,7 $p=0,005$) als auch für die Osteophyten (0,0 zu 5,8 $p=0,007$) signifikant, was die initiale Beobachtung während der Präparation der Knie bestätigt. Nach 6 Monaten unterschieden sich die Behandlungsgruppen (Kontrolle, Implantat) weiterhin signifikant in der Ausprägung beider Merkmale (2,2 zu 8,3 $p=0,006$) und (0,3 zu 4,2 $p=0,007$). Eine weitere Zunahme war jedoch nur bei dem Knorpelscore nach 6 Monaten zu beobachten. Dieser war für die Kontrollen signifikant (0,0 zu 2,2 $p=0,005$), nicht jedoch für die operierten Knie (6,7 zu 8,3 $p=0,289$). Die Ausprägung der Osteophyten blieb zwischen den beiden Versuchszeitpunkten im Bereich des Konfidenzintervalls (siehe Tab. 9).

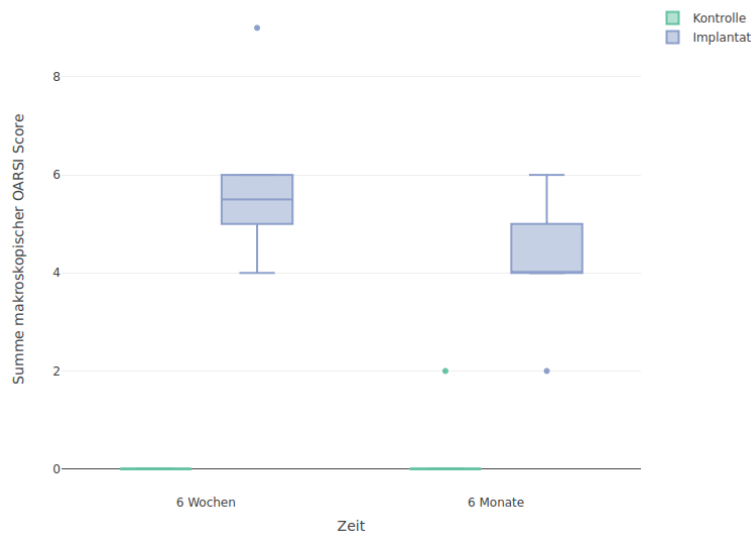
Tab. 9: Makroskopisches OARSI Scoring der Minipig Knie nach Materialtestung

OARSI Score	6 Wochen		6 Monate		p-Wert		
	Kontrolle	Implantat	Kontrolle	Implantat	6 Wochen Implantat / 6 Wochen Kontrolle	6 Monate Implantat / 6 Monate Kontrolle	6 Wochen Implantat / 6 Monate Implantat
Knorpelschaden	Durchschnitt (Konfidenzintervall)						
MFC Score, 0-4	0.0 (0, 0)	1.3 (0.7, 2.7)	0.7 (0.3, 1.1)	2.0 (1.3, 2.7)	-	-	-
LFC Score, 0-4	0.0 (0, 0)	1.5 (1.1, 1.9)	0.0 (0, 0)	1.0 (0.5, 1.5)	-	-	-
MTP Score, 0-4	0.0 (0, 0)	1.0 (1.0, 1.0)	1.2 (0.8, 1.5)	1.5 (0.8, 2.2)	-	-	-
LTP Score, 0-4	0.0 (0, 0)	2.2 (1.8, 2.5)	0.3 (0, 0.7)	1.8 (1.0, 2.6)	-	-	-
Trochlea Score, 0-4	0.0 (0, 0)	0.7 (0, 1.5)	0.0 (0, 0)	2.0 (1.1, 2.9)	-	-	-
Summe, 0-20	0.0 (0, 0)	6.7 (5.4, 8.0)	2.2 (1.4, 3.0)	8.3 (6.1, 10.6)	0.005	0.006	0.289
Osteophyten							
MFC Score, 0-3	0.0 (0, 0)	1.8 (1.5, 2.2)	0.0 (0, 0)	1.3 (0.9, 1.7)	-	-	-
LFC Score, 0-3	0.0 (0, 0)	1.7 (1.3, 2.2)	0.0 (0, 0)	1.5 (0.7, 2.3)	-	-	-
MTP Score, 0-3	0.0 (0, 0)	0.7 (0, 1.3)	0 (0, 0)	0.3 (0, 1.3)	-	-	-
LTP Score, 0-3	0.0 (0, 0)	1.2 (0.8, 1.5)	0.2 (0, 0.5)	0.3 (0, 0.7)	-	-	-
Trochlea Score, 0-3	0.0 (0, 0)	0.5 (0, 1.2)	0.2 (0, 0.5)	0.3 (0, 0.7)	-	-	-
Summe, 0-16	0.0 (0, 0)	5.8 (4.5, 7.2)	0.3 (0, 1.0)	4.2 (3.1, 5.2)	0.007	0.007	0.118

Sowohl für Knorpel als auch Osteophytenentstehung schnitten die operierten Knie schlechter ab als die Kontrollen. Der Gruppenunterschied für den Knorpelschaden lag dieses Mal mit durchschnittlich 2,2 (Kontrolle) signifikant ($p = 3,577 \times 10^{-15}$) über den Implantaten mit 6,9. Ebenso stellte sich die Osteophytenbildung zwischen beiden Behandlungsgruppen mit einem durchschnittlichen Score von 2,6 (Kontrolle) zu 6,6 (Implantat) bei $p = 3,404 \times 10^{-7}$ nach T-Test dar (siehe Abb. 26)



(a) Knorpelschaden



(b) Osteophytenbildung

Abb. 26: Arthroseausmaß nach makroskopischem OARSI Score. Anstieg des Arthroseausmaßes für Knorpelschaden und Osteophytenbildung über die Zeit

Da das Ausmaß der Arthroseentstehung in vorangegangenen Tierstudien mit ähnlichem Konstrukt [86, 87, 88] noch nicht dokumentiert wurde, wurden beide Scores auch für alle noch eingelagerten Präparate dieser Studien bestimmt. Diese Knie waren zum einen etwas kleiner in ihrer Größe als auch teilweise noch nicht vom Meniskus frei präpariert. Auch hier zeigte sich ein vergleichbarer Knorpelschaden, sowie Osteophytenbildung, die durch den noch zurückgebliebenen Meniskus verdeckt waren (siehe Abb. 27).

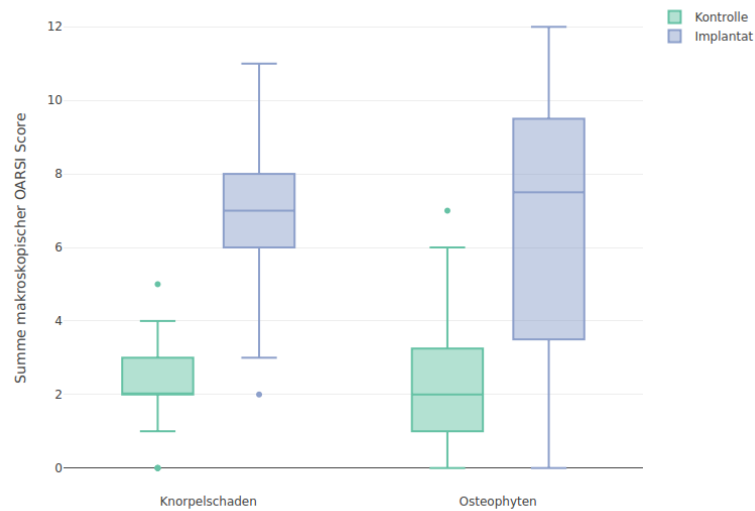


Abb. 27: Arthroseausmaß nach makroskopischem OARSI Score aus früheren Tierstudien

3.5.3 Qualitative Histologie des Knorpel

Der Knorpel wurde anhand von Präparatschnitten durch die Tibia im Verlauf des Bohrkanals beurteilt. Die angrenzenden Knorpelabschnitte sind meist nicht durch die Menisken geschützt und nach Kreuzbandruptur oder OP erhöhten Scherkräften ausgesetzt.

Orientierend an den OARSI Empfehlungen für die mikroskopische Arthroserhebung [41] konnten in sämtlichen Präparaten eine Fibrillation und Aufrauung der Knorpeloberfläche beobachtet werden (siehe Abb. 28). Diese reichte meistens nur knapp über die oberflächliche in die mittlere Knorpelschicht, jedoch nicht tiefer als ein Drittel der Knorpeldicke. Die Knorpeldicke schwankte meist stark und wurde geringer in den zum Bohrkanal gerichteten Arealen (siehe Abb. 28). Eine Aussage zur Zu- oder Abnahme der Zelldichte konnte aufgrund fehlender gesunder Kontrollen nicht getroffen werden. Dafür zeigten sich aber zellleere Areale und die normalerweise dichte flache Zellkernarchitektur der oberflächlichen Knorpelschicht war aufgehoben über dem an die Kreuzbandinsertionsstelle angrenzenden Knorpel.

In den am stärksten veränderten Regionen fiel außerdem die Formierung von Clustern und Zellnestern auf, die an die zerstörte Knorpeloberfläche oder azellulären Areale grenzten (siehe Abb. 28 und 30). In die mittlere Knorpelschicht reichten zudem eine Vielzahl an Chondrozytensäulen, die Teils bis in die tiefe Zone zurückreichten. Dabei folgten diese Zellklone dem Verlauf des gelb dargestellten kalzifizierten Knorpels bis an die grüne Glykosaminoglykan (GAG)-reiche Knorpelschicht. Durch die in der Movat-Pentachrom-Färbung enthaltene Alcianblau angefärbten GAGs ließ sich ähnlich wie durch die eigentlich vorzunehmende Tolidinblaufärbung der GAG-Gehalt des Knorpels nachweisen. Durch die Verwendung weiterer Farbstoffe erschien der Knorpel jedoch nicht blau sondern grün. Die Intensität der GAG-Färbung zeigte sich stellenweise abnehmend und der gelb dargestellte kalzifizierte Knorpel nahm bis zu 50% der Knorpeldicke ein (vgl. Abb. 31). Mit Ausnahme eines Präparates waren keine von subchondral eindringenden Gefäße erkennbar und die Mineralisationszone war durchgehend vorhanden und klar begrenzt.

Weiter von der Kreuzbandinsertion entfernt stellte sich eine normale Knorpelarchitektur bei erhaltener Integrität und definitionsgemäßer dreigeteilter Zonierung gut abgrenzbar dar. Das Kreuzband war in allen histologischen Schnitten "pressfit" im Bohrkanal integriert ohne Versatz zum Knorpelareal.

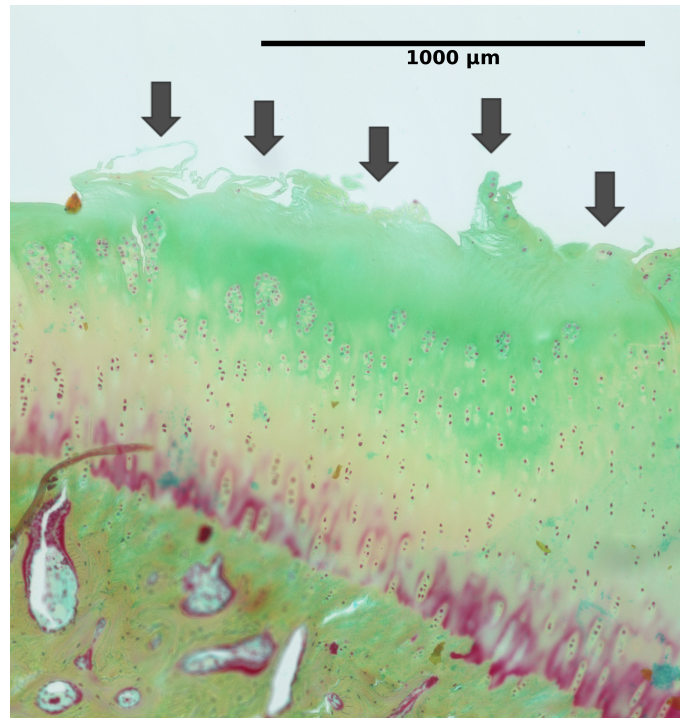


Abb. 28: Abnahme der Knorpeldicke über die Femurcondyle (von rechts / laterale Condyle nach links / Area indercondylaris, ACL), Fibrillationen der Knorpeloberfläche mit azellulärer Matrix siehe Pfeile

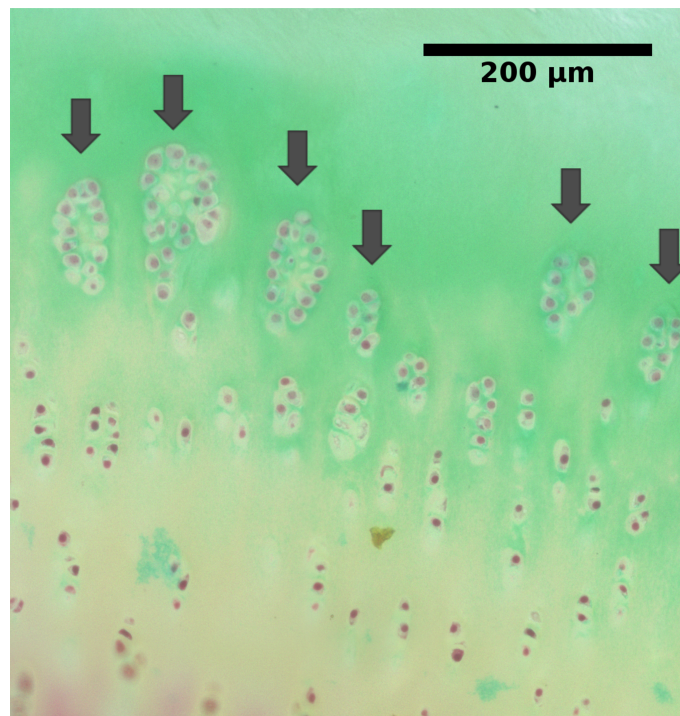


Abb. 29: Vergrößerung von Abb. 28 mit Clustern von Chondrozyten siehe Pfeile

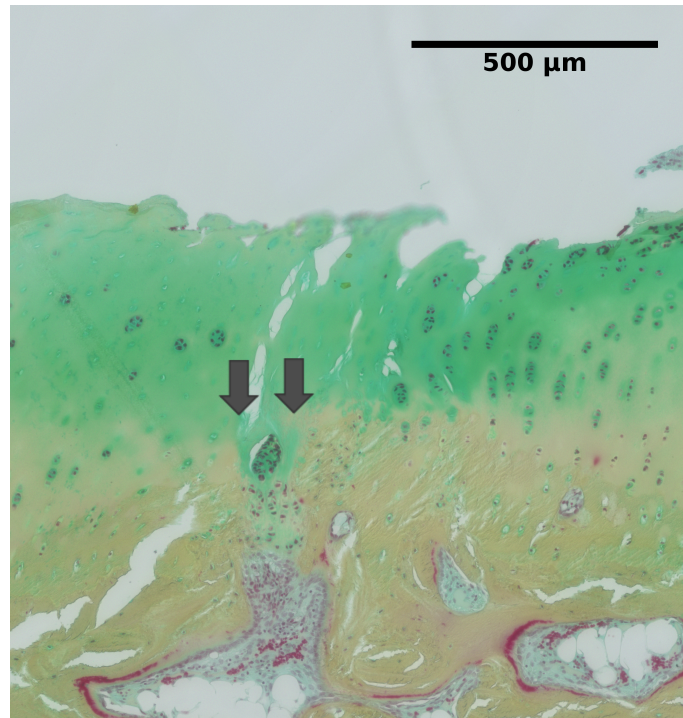


Abb. 30: Verfransung der Oberfläche, Gefäßeinbruch durch die Mineralisationszone und Cluster siehe Pfeile, azelluläres Areal links in Richtung Area intercondylaris, ACL

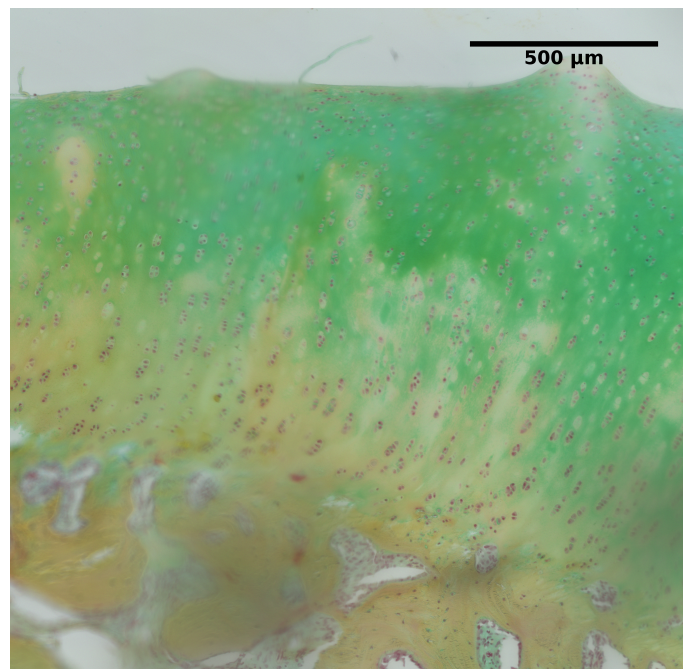


Abb. 31: Kalzifizierter Knorpel über 50% der Knorpeldicke (gelb) und lokale Sättigungsabnahme der GAG (grün)

3.5.4 MRT-Messung

Da die Arthroseentstehung mit der genauen Implantation der Kreuzbandplastik an die vorherigen anatomischen Verhältnisse verknüpft ist [80], wurde die Bohrkanalposition anhand von MRT-Bildern überprüft. Die nach der Quadrantenmethode [96] femoral und nach Amis & Jakob [98, 99] tibial vermessenen Bohrkanäle wurden jeweils randomisiert, fünfmalig von einem Untersucher vermessen und gemittelt. Die gemittelten Werte wurden dann mit den in vorherigen Studien [97, 98] bestimmten Mittelwerten und Konfidenzintervallen der in Kadaverstudien bestimmten anatomischen Position verglichen (siehe Abb. 32).

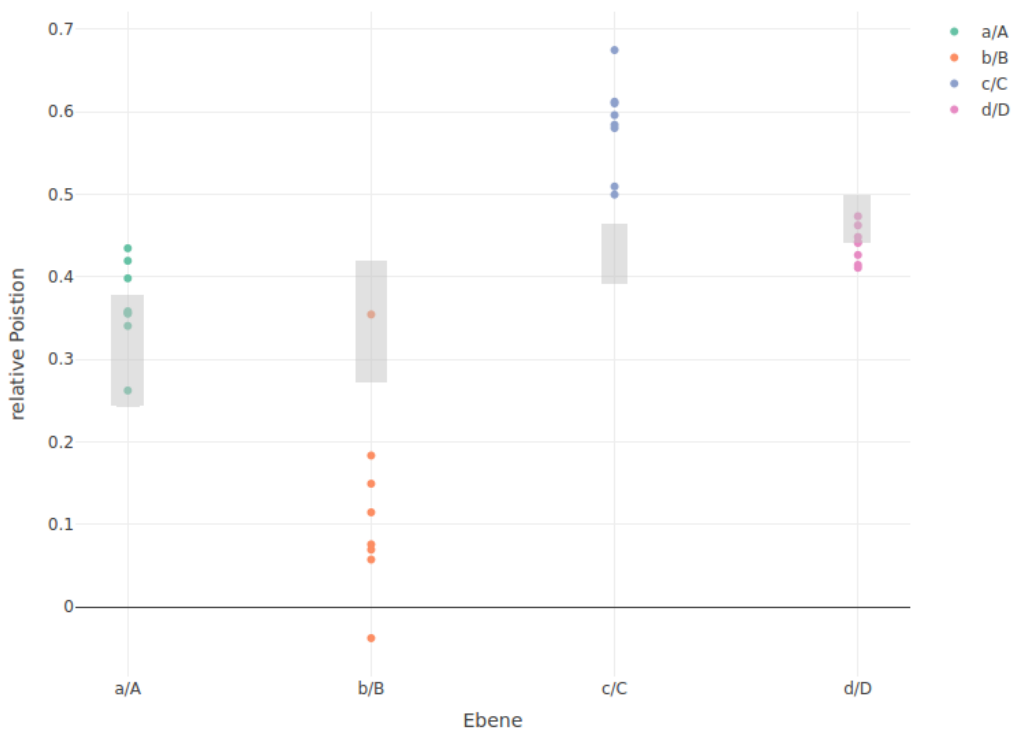


Abb. 32: Relative Bohrkanalposition (bunt) und Zielbereich-Konfidenzintervall (grau). Die anterior-posteriore Position a/A liegt noch vergleichsweise im Zielbereich, während die proximal-distale Bohrkanalposition b/B am Femur zu proximal zum Dach des Interkondylarspalttes verschoben ist. Tibial zeigt sich in der proximal-distalen Ebene c/C eine zu weit distale Platzierung, wohingegen in der Frontalebene medial-lateral d/D eine gute Positionierung erreicht wurde

Besonders die Abweichung der femoralen Tunnelposition zu proximal, also zu dicht an dem Dach des Interkondylarraumes und die tibial zu proximale Positionierung (vor dem Interkondylarhöcker) fallen ins Auge. Basierend auf den erhobenen Daten wurde versucht, eine Korrelation zwischen dem quantifizierten Arthroseausmaß und dem Maß der Abweichung des Bohrkanals von der anatomischen Position zu finden.

Dazu wurde eine Korrelationsmatrix nach Pearson berechnet und ein Bonferoni-korrigiertes Signifikanzniveau von $p \leq 0.0125$ ermittelt.

Basierend auf diesen Annahmen konnte keine Korrelation ($p \geq 0.0125$) der Bohrkanal-abweichung sowohl für Tibia als auch für Femur zu dem Ausmaß der Osteophyten-bildung gefunden werden. Bezogen auf den OARSI Score für den Knorpelschaden zeigte sich jedoch für die Tibiale Bohrkanalpositionierung eine starke Korrelation ($p=0.0056$), nicht jedoch für die femorale ACL-Insertion.

4 Diskussion

Aufgrund steigender Inzidenz und weiterhin ungelöster Probleme der vorderen Kreuzbandruptur stellt die Versorgung dieser Verletzungen bis dato immer noch eine große Herausforderung dar. Für die meist jungen sportlich aktiven Patienten ergibt sich die Frage nach der bestmöglichen Versorgung (sofort oder im Intervall), Art des Verfahrens (BTB oder Hamstring), Rehabilitation und "time back to sports", Rerupturrate und Vermeidung von Arthrose. All diese Fragen können mit keinem derzeit verfügbaren Therapieansatz hinreichend adressiert werden. Um besonders die Probleme der Transplantatentnahme (vordere Knieschmerzen bei BTB oder Schwäche der Hamstrings bei Hamstring Graft) bei gleichzeitigem Mangel eines gleichwertigen allogenen oder synthetischen Ersatzes zu adressieren, entstand im Jahr 2009 das EXIST Projekt an der orthopädischen Klinik (König-Ludwig-Haus Würzburg) und später am Lehrstuhl für Tissue Engineering und regenerative Medizin. Ziel des Projektes war der Ersatz des derzeitigen Eigensehnenimplantates durch ein reines KF-Konstrukt tierischen Ursprungs. Nach bereits zwei vorangegangenen Studien [86, 87, 88] zeigten sich in-vivo und in-vitro deutlich herabgesetzte Reißfestigkeiten bei grundsätzlich erhaltener ligamentärer Struktur sowie eine gute Integration und Remodellierung in-vivo. Die implantierten KF-Konstrukte zeigten demnach einen Abfall auf nur noch 31,8% ihrer ursprünglichen Reißfestigkeit nach 6 Wochen und immernoch 63,8% nach 6 Monaten [87]. Diese eindeutig verzögerte Remodellierung erhöht das Risiko einer frühen Reruptur und sollte dahingehend adressiert werden. Dieses Remodellierungsverhalten ist von der Hamstring-Plastik her bekannt und gut untersucht, wobei noch erhebliche Einschränkungen in der Übertragung des Tiermodells auf den Menschen diskutiert werden [100].

Eine diesbezüglich vorangegangene Tierstudie [88] konnte mittels cross-linking der Fasern aufgrund einer Entzündungsreaktion keine überzeugenden Resultate liefern. Daher war das Ziel dieser Arbeit zum einen eine initiale Verstärkungsmöglichkeit des Konstruktes während der Remodellierungsphase zu finden ohne dessen Struktur zu verändern. Zum anderen sollten die Materialeigenschaften über verschiedene Lagerungsbedingungen und Zeitpunkte hinweg untersucht werden, um die Produktqualität vor dem klinisch therapeutischen Einsatz im Hund oder Menschen gewährleisten zu können. Dabei stellt dies die erste bekannte Arbeit dar, bei der ein künstliches Kreuzbandersatzverfahren mit einer synthetischen Augmentation kombiniert wird.

Die vorliegende Arbeit wurde zweigeteilt. Der erste Teil sollte durch in-vitro Testung den Einfluss von Lagerungsbedingungen und Fibertapeinsatz auf die Reißfestigkeit des Konstruktes klären. Im zweiten Teil wurde auf vorherige Erkenntnisse

fußend der in-vivo Versuch mit 16 Minipigs über zwei Versuchszeiträume (6 Wochen / 6 Monate) durchgeführt. Hierbei wurden die Knie neben den bereits bekannten Ergebnissen in Histologie und Materialtestung zusätzlich hinsichtlich Arthrose und Bohrkanaalpositionierung beurteilt, wodurch der zusätzliche Einsatz von Fibertape zur Verstärkung des Kollagenkonstruktes bewertet werden sollte.

4.1 Konstruktherstellung

Zur Fertigung der Konstrukte wurden nur möglichst alte (15-20 Wochen) weibliche CD Rattenschwänze verwendet, da sich diese als äußerst reißfest herausgestellt hatten [87]. Dennoch ließen sich zum Teil großen Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen beobachten. Manch eine Charge brachte nicht ein einziges Konstrukt hervor (Charge 10) andere 16 (Charge 16). Dies kann zum einen an einer unterschiedlichen Beschaffenheit der Kollagenfasern liegen oder an Unterschieden in der Fertigung. Trotz Qualitätskontrollen zur Vereinheitlichung und Erhöhung der durchschnittlichen Reißfestigkeit bleibt ein Teil der Fertigung noch stark zeitaufwändig, subjektiv sowie logistisch schwierig zu händeln. Die Fasern müssen feucht gelagert werden um ihre Struktur zu erhalten. Gleichzeitig neigt ein Großteil der Fasern dazu sich an den Enden mit Wasser vollzusaugen und an diesen Stellen zu reißen. Dieser Effekt wurde verstärkt nach Materialtestung beobachtet, sodass davon auszugehen ist, dass hierdurch ein zusätzlicher Schaden an den KF gesetzt wurde. Somit lässt sich erklären, dass die Fertigung jedes Konstruktes abhängt von: Beschaffenheit der Fasern, Zeit für die Bearbeitung, Erfahrung des Herstellers und Art der Qualitätskontrolle ist. Dies erklärt die großen Schwankungen zwischen 114 und 190 N selbst bei den Kontrollen (siehe Abb. 18) und die niedrigere Reißfestigkeit zu vorangegangenen Studien. Außerdem wurden die KF Konstrukte in dieser Arbeit zu Zwecken der Standardisierung für die Lagerungsbedingungen mit einer konstanten Anzahl an acht Wicklungen gefertigt. Demgegenüber wurde zuvor der Konstrukturchmesser lediglich versucht durch eine Lochplatte zu kontrollieren [86, 87, 88]. Diese Messung ist aufgrund des geringen Durchmessers, sowie der hohen Verformbarkeit der Konstrukte mit starken subjektiven Schwankungen und zusätzlichen Defekten bei der Testung verbunden. Jedoch könnten auch hierdurch dünnere und schwächere Konstrukte nicht auszuschließen sein.

Die gemessenen Daten des Trockengewichts zeigen einen zu erwartenden linearen Trend zur Reißfestigkeit (siehe Abb. 20). Da die Anzahl der Wicklungen bei der Fertigung konstant gehalten wurde, spricht dies dafür, dass dickere Fasern für eine höhere Reißfestigkeit verantwortlich sind (solange der Fadenüberstand hinter den Knoten als konstant angesehen wird). Dies würde für eine bessere optische Vor-

auswahl der KF sprechen, um höheren Kräften zu widerstehen.

Demgegenüber zeigt Abb. 20a, dass eine höhere Steifigkeit ebenfalls mit der Reißfestigkeit korreliert. Dies wäre dadurch zu erklären, dass die Steifigkeit gering ist, wenn sich während der Testung ein Knoten des Konstruktes löst (wie häufig beobachtet). Dementsprechend zeigen Konstrukte mit stabileren Knoten wahrscheinlich höhere Maximalkräfte.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese formuliert, dass durch ein Aufquellen der KF an den Enden über die Zeit, die Reißfestigkeit mit der Länge der Lagerung abnimmt. Um zu untersuchen ob sich dieser Effekt durch Entfernen des flüssigen Wassers aufhalten ließe, wurden die Proben unter einer Versuchsbedingung eingefroren.

4.2 Lagerung

Bis dato gibt es nur eine sehr kleine Studienzahl die sich mit den Lagerungsbedingungen für Sehnentransplantate beschäftigt. Besonders Ergebnisse für Langzeitlagerung fehlen in der Literatur. Des Weiteren stellt das hier vorgestellte Konstrukt eine Besonderheit dar, durch die potentielle Schwachstelle der Knoten und die Affinität der freien KF Enden zu Wasser.

Die Proben wurden für jede Charge über die drei Lagerungstemperaturen und eine Kontrollbedingung gleichmäßig verteilt. Aufgrund der vielen Messzeitpunkte und der geringen Materialausbeute je Charge konnte nicht für die Zeit in jeder Charge randomisiert werden, sodass eine Charge ausschließlich einem Messzeitpunkt zugeordnet wurde, was bei der Interpretation der Lagerungszeitdaten in Betracht gezogen werden muss. Für die Betrachtung der Lagerungstemperatur wurden alle Lagerungszeitpunkte für die jeweilige Gruppe gepoolt und zeigten keine signifikanten Unterschiede, weder untereinander noch zu den Kontrollen (siehe Abb. 18). Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Literatur überein, wonach selbst vermehrtes Einfrieren und Auftauen bei -20°C keinen Effekt auf die biomechanischen Eigenschaften von Sehnentransplantaten hat [101]. Niedrigere Temperaturen von -80°C sollten demgegenüber laut Literatur einen größeren Effekt zeigen [102], konnten jedoch aufgrund begrenzter Ressourcen im Rahmen dieser Studie nicht evaluiert werden. Somit erscheint die Lagerung unter jeder dieser kontrollierten und konstanten Bedingungen als gleichwertig, solange eine vorherige Sterilisation erfolgte und eine Kontamination ausgeschlossen werden kann (siehe 3.3 Sterilität der gelagerten Konstrukte).

Die Betrachtung der Lagerungszeit zeigt nicht wie angenommen einen linearen Verlauf, weder ein lineares Interaktionsmodell ließ sich anpassen, noch konnte durch

ein linear mixed model für die Zufallseffekte der Chargen korrigiert werden, da diese nicht von den Lagerungszeiten zu trennen waren. 50% der Varianz erklärte sich bei diesen Modellierungen alleine über die Chargenzuordnung. Die großen Unterschiede innerhalb einer Charge und selbst zwischen den Kontrollen (mit einer Standardabweichung von 16.8 N) lassen daher keine generelle Aussage zu, sodass die beobachteten Effekte, die sich im Gruppenvergleich (siehe Abb. 19) zeigten, am ehesten auf die Chargen und ihre unterschiedliche Bearbeitungszeit zurückzuführen sind. Am deutlichsten wird dies bei dem 6 Monatszeitpunkt. Die zur Verarbeitung verwendeten Rattenschwänze stammten hierfür von einer neueren Lieferung und sämtliche Konstrukte (Kontrollen eingeschlossen) lagen signifikant niedriger als die vorangegangenen Lagerungszeiten (mit Ausnahme des 1 Wochenzeitpunktes) hinsichtlich der Reißfestigkeit (162,5 N Kontrolle, 147,4 N 1 Woche, 161,4 N 1 Monat, 183,9 N 3 Monate, 147,1 N 6 Monate). Aufgrund dieser Daten lässt sich feststellen, dass für eine Aussage über die Veränderungen der Materialeigenschaften über die Lagerungszeit eine größere Fallzahl und eine einheitlichere Konstrukturfertigung nötig ist, da bisher die hohe Variabilität der ACL Konstrukte einen höheren Einfluss auf die maximale Reißfestigkeit hat, als dies durch die Zeit zu erklären wäre. Da die Lagerungstemperatur sowie die Lagerungszeit einen geringeren Einfluss als die Chargen der Fertigung auf die Reißfestigkeit haben, sollten Schwachpunkte in der Qualitätskontrolle zuerst adressiert werden. Hierzu zählen Chargenunterschiede, Beeinflussung der KF durch Materialtestung, hoher Zeitaufwand und Erfahrung bei der Herstellung und damit einhergehende hohe Fehleranfälligkeit.

Unter der Betrachtung der bisherigen Daten sollte also die Praktikabilität der getesteten Lagerungsverfahren in den Fokus rücken. In dieser Arbeit wurden drei sehr gut kontrollierte Bedingungen getestet (-20°C , 5°C , 25°C). Dies schließt jegliche Aussage darüber aus, welche Auswirkung auf die Materialeigenschaften durch eine Abweichung von diesen Temperaturen eintreten würde, z.B. bei Ausfall des -20°C Gefrierschranks oder bei größeren Schwankungen der Raumtemperatur (z.B. durch Klimaanlageanlagendefekt oder bei fehlender Klimatisierung des Lagerraumes zu verschiedenen Jahreszeiten). Unter GMP-Gesichtspunkt wäre daher aufgrund der weiten Verbreitung, besonders in Kliniken hinsichtlich der Lagerung von Medikamenten, als auch der einfachen Kontrolle, die Lagerung im Kühlschrank bei ($2-8^{\circ}\text{C}$) zu empfehlen. -20°C Gefrierschränke sind nicht so weit verbreitet und bei einem Ausfall würden in kurzer Zeit starke Temperaturschwankungen entstehen, wohingegen klimatisierte Räume selbst in vielen europäischen OP-Lagerräumen nicht einheitlich gegeben sind.

4.3 Tierversuch

Trotz der Limitationen bei der einheitlichen Fertigung konnten Stöckhert und Bischofberger [86, 87] bisher den Machbarkeitsnachweis ("proof of concept") dieses Verfahrens zeigen. Rerupturen trotz sofortiger Belastung post OP wurden nicht beobachtet. Ein Grund hierfür ist sicherlich die Verteilung des Gewichtes auf 4 Beinen beim Schwein. Das gewählte Tiermodell war aufgrund der Erfahrung aus den vorherigen Studien, der anatomischen und funktionellen Ähnlichkeit zum Menschen [89] und der weiten Verbreitung als präklinisches Kreuzbandmodell [10, 32, 36, 39, 103] erneut das Göttinger Minipig. Das Alter der Tiere entspricht in etwa einem Jugendlichen nach Verschluss der Wachstumsfuge mit noch nicht ganz abgeschlossenem Größenwachstum. Somit ist das Modell ideal, um die Altersgruppe der 15-25 Jährigen, die von rund 50% aller Kreuzbandverletzungen betroffen ist, abzubilden (vgl. Abb. 3). Auch die Reaktion auf Kreuzbandverletzung, das muskuloskelettale Wachstum und die vergleichbare Stabilisierung des Kniegelenks durch das ACL sollten in dem gewählten Tiermodell bedacht werden. All diese Punkte erfüllt das Minipig Modell [104].

Nach erfolgter Operation gestaltete sich die Nachbehandlung und Rehabilitation unter sofortiger Belastung mit Ausnahme eines Tieres (leicht verzögerte Rückgewinnung der Gefähigkeit in der ersten Woche) unauffällig. Unter wöchentlicher Kontrolle zeigten sich zudem keine Entzündungs- oder Verletzungszeichen, die für eine Reruptur sprechen würden. Zum Zeitpunkt der Präparation nach Einschläferung der Tiere, zeigten sich in allen Tieren durchgehende ligamentäre Strukturen mit eingeschlossenem FiberTape® und ohne erkennbare einzelne KF oder Knoten mit samt einem glänzenden synovialen Überzug.

Ebenfalls auffällig bei den operierten Knien waren sowohl nach 6 Wochen, wie auch 6 Monaten, ein hohes Maß an Osteophyten und Knorpelschäden, die so bisher nicht beschrieben wurden (siehe Abb. 26 a,b und Tab. 9). Bei genauerer Betrachtung älterer Versuchsknie fiel jedoch ein erhebliches Maß an makroskopischen Arthrosezeichen auf, die durch unzureichende Präparation der Synovia und Menisken initial nicht so offensichtlich erschienen wie in dieser Studie (vgl. Abb. 27). Auch die mikroskopische Untersuchung zeigte das Vorliegen sämtlicher mikroskopischer Arthrosemerkmale (Fissuren, Erosionen, zelleere Areale, Zellcluster, Gefäßeinsprossung, Auflösung der Tidemark, abnehmender GAG-Anteil). Die Schnittebene der histologischen Präparate wurde in direkter Nachbarschaft zum Bohrkanaal gewählt, wo auch die Osteophytenbildung beobachtet wurde. Des Weiteren erlaubte das Versuchsdesign nur eine äußerst begrenzte histologische Untersuchung zweier Proben und dies auch nur in einer Ebene. Wünschenswert wäre dahingehend eine größere

Schnitt- und Probenanzahl, worüber jedoch bisher noch kein Konsens in der Fachgesellschaft für Knorpelreperatur (ICRS) besteht [41]. Um wenigstens einen möglichst guten Überblick über alle Knorpelmerkmale zu gewinnen, wurde daher die Movat-Pentachrom-Färbung, die fünf Färbungen beinhaltet, gewählt. Sie erlaubt es, sämtliche Bindegewebsbestandteile in einem beurteilen zu können. Unterstützt durch das WSI konnte für jede Probe die gesamte Gelenkbreite beurteilt werden. Die am stärksten betroffene ROI grenzte in jedem Fall direkt an den Bohrkanal. Dies deckt sich auch mit den makroskopisch beobachteten Defekten, die wahrscheinlich durch Kontakt der Eminentia intercondylaris tibiae zu der Fossa intercondylaris femoris aufgrund veränderter anatomischer und funktioneller Verhältnisse entstehen. Das Auftreten von Arthrose nach Kreuzbandruptur mit oder ohne Rekonstruktion ist bekannt und fällt meistens erst 10-15 Jahre nach Trauma klinisch und radiologisch auf. Nicht jedoch in direkter Nähe zum Bohrkanal. So berichtet Porat et al. von einer Prävalenz von 78% radiologisch bestätigter OA 14 Jahre nach Kreuzbandruptur unabhängig von der Therapie unter männlichen Fußballspielern [37]. Im Tiermodell zeigt sich demgegenüber Arthrose bereits zwischen 1 Monat und 1 Jahr [80]. Ein Verlust der Knorpelmatrix aus Kollagen und Proteoglykanen tritt sogar schon innerhalb von 14 Tagen nach Trauma auf [36, 105]. Dahingehend ist die beobachtete Arthroseentstehung durchaus zu erwarten. Insbesondere das Göttinger Minipig wurde vor kurzem als Modell für die Untersuchung der posttraumatischen Arthroseentstehung nach ACL-Durchtrennung etabliert [36] und konnte bei allen Versuchstieren nach 6 Monaten deutliche mikroskopische und makroskopische OA Merkmale zeigen. Des Weiteren werden erhöhte Arthroseraten bei nicht anatomischen Kreuzbandersatz diskutiert [80, 106]. Um die Abweichung von der idealen Bohrkanalposition zu kontrollieren wurden MRT Bilder angefertigt. Für die Charakterisierung der Kreuzbandanatomie gibt es eine Reihe von Merkmalen (Länge, Weite, Position in Frontal- und Sagitalebene, Winkel des Bohrkanals). Die Messung des Bohrkanalwinkels konnte aufgrund fehlender Vergleichsdaten in der Literatur nicht durchgeführt werden. Daher konnte der Einfluss des fehlenden Zielgerätes bei der Bohrkanalpositionierung nicht überprüft werden. Auch zum "Footprint" des ACL im Minipig gibt es nur eine kleine Anzahl an Studien in denen verschiedene Tiermodelle betrachtet werden [107]. Aufgrund der Nähe des Minipigkniees zum Menschen [89], trotz der Nähe der vorderen lateralen Meniskusinsertion zum ACL im Schwein, ist die ACL Position am ehesten noch mit den umfangreichen CT und MRT basierten Messwerten des Menschen vergleichbar [97]. Hierbei zeigte sich eine starke Abweichung sowohl der tibialen (zu weit vor dem Interkondylarhöcker) wie auch der femoralen (zu proximal am Dach des Interkondylarraumes) Bohrkanalposition (siehe

Abb. 32). Dies bestätigt die Annahme, dass die freihändige Bohrung wahrscheinlich zur Fehlpositionierung des Implantates geführt hat. Die gezeigte Korrelation der tibialen Positionsabweichung mit dem Knorpelschaden scheint daher verständlich, da der Großteil des beobachteten Knorpelschadens nahe dem Interkondylarhöcker beobachtet wurde, der nicht von Menisken geschützt wird. Am Wahrscheinlichsten ist daher ein erhöhter femoro-tibialer Kontakt postoperativ anzunehmen, der zu diesem Abriebsmuster führte. Auch eine Verletzung der lateralen Meniskusinsertion nahe dem ACL Ursprung könnte für die Arthroseentstehung ursächlich sein.

Den Goldstandard der ACL Rekonstruktion stellt die Hamstring Plastik dar, deren Maximalkraft mit rund 4100 N initial fast doppelt so hoch liegt wie das humane ACL [13]. Dies ist mit der Remodellierung des Implantates und der daraus resultierenden starken Abnahme der Reißfestigkeit auf weniger als ein Viertel des Ursprungswertes zu begründen [108]. Die initiale Reißfestigkeit der KF Konstrukte ist daher nicht mit denen der Hamstringplastik vergleichbar. Dementsprechend ist der signifikant niedrigere Wert von 81,0 N gegenüber 529,17 N der Kontrollen, 6 Wochen nach Implantation zu erwarten. Dies stellt einen Rückgang der Reißfestigkeit auf 41,39% der initialen Maximalkraft der in-vitro getesteten, einfachen FiberTape® Konstrukte (195,71 N) und nur 15,31% der Reißfestigkeit der gesunden Gegenseite (529,17 N) dar (siehe Abb. 21 und 24). Nach 6 Monaten übersteigt das KF Konstrukt jedoch mit 345,56 N das initiale Konstrukt mit 176,57% der initialen in vitro-Reißfestigkeit (195,71 N) und 36,62% der Maximalkraft der gesunden Gegenseite (943,50 N). Nach initialer Remodellierung (Abfall der Reißfestigkeit nach 6 Wochen) zeigt das implantierte KF Konstrukt einen signifikanten Zugewinn der Reißfestigkeit über das ursprüngliche Niveau hinaus. Auffällig ist nicht nur der signifikante Zugewinn des Implantates sondern ebenfalls der verglichenen Kontrollknie (siehe Abb. 24).

Hierfür lassen sich mehrere Gründe finden. Zum einen könnte es sich um eine Abweichung aufgrund der Verteilung der Versuchstiere nach Alter und Geschlecht und präoperativem Gewicht handeln. Diesem Punkt wurde durch Randomisierung der Versuchsgruppen Rechnung getragen, was jedoch bei der kleinen Gruppengröße immernoch zu Gruppenunterschieden führen kann (siehe "law of small numbers"). Eine größere Versuchsgruppe ließ sich jedoch aus finanziellen, organisatorischen und behördlichen Gesichtspunkten nicht verwirklichen. Dies ist auch bei vielen humanen orthopädischen klinischen Studien der Fall (verglichen mit anderen medizinischen Fachrichtungen), da meistens große Effektgrößen erwartet werden, wie auch in diesem Fall zu sehen. Oder die Zunahme spricht für ein noch stattfindendes muskuloskelettales Wachstum und eine weitere Ausreifung der Tiere, und sollte auch bei

der Betrachtung des guten 6 Monatsergebnis kritisch gesehen werden. Jedoch ist in diesem Zusammenhang zu beachten, dass die gewählten Minipigs im Alter von 2,5 Jahren noch eine sehr homogene Gruppe darstellen. Erst in den späteren Entwicklungsjahren ist mit größeren Gewichtsunterschieden zwischen männlichen und weiblichen Tieren, sowie auch innerhalb einer Geschlechtergruppe zu rechnen. Diese Unterschiede sind auf den Rang des Tieres innerhalb der Gruppe zurückzuführen und stellt daher bei der Haltung der Tiere in einer Stallgemeinschaft für ältere Tiere einen entsprechend schwer zu kontrollierenden Einflussfaktor dar [109].

Derselbe Effekt wurde bereits in der Arbeit von Simon Bischofberger in einem geringeren Umfang beobachtet [87]. Auch die vermehrte Belastung des nicht operierten linken Hinterfußes, wie dies durch eine kompensatorisch erhöhte Muskelmasse zu sehen ist, könnte Einfluss auf die Stärke des ACL des Kontrollkniees haben. Nichts desto trotz stellen diese 6 Monatsergebnisse das beste Halbjahresergebnis aller bisherigen Tierstudien dar. Neben dem eingesetzten FiberTape können Unterschiede in der Fertigung durch verschiedene Personen oder Abweichungen im Operationsablauf durch ein anderes Operationsteam ebenfalls Einfluss auf die vorliegenden Ergebnisse haben. Diesen Punkten wurde durch Standardisierung weitmöglichst Rechnung getragen. Weitere Limitationen der Aussagekraft der vorliegenden Arbeit ist das Fehlen einer Scheingruppe (oft auch als engl. sham group bezeichnet) mit operativer Kniegelenksöffnung aber ohne Kreuzbanddurchtrennung oder Ersatz, um für den operativen Eingriff kontrollieren zu können sowie der Vergleich zu einer ACL Rekonstruktion (derzeitiger Goldstandard der Therapie). Beides ließ sich aufgrund der geringen Anzahl an Minipigs nicht realisieren.

Auch das einfache, unidimensionale Testverfahren muss beachtet werden. Zum einen ist es ein Standardverfahren in der Materialtestung, welches sehr gut reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse über Reißfestigkeit und Steifigkeit liefert. Zum anderen ist es auch von der Testsequenz (Vorspannung, Traversengeschwindigkeit, Einspannwinkel) abhängig [110] und kann besonders die Rotationsbewegungen im Knie nicht abbilden, unter denen das Kreuzband besonderen Belastungen ausgesetzt ist [8]. Realitätsnäher ist daher wahrscheinlich eine zyklische Belastung besonders hinsichtlich der Inhomogenität des getesteten Konstruktes [111]. Diesen Punkten wird durch computergestützte Robotertestsysteme neuerdings Rechnung getragen [112]. Aufgrund beschränkter finanzieller Mittel konnte ein solches Messverfahren jedoch nicht realisiert werden.

4.4 Fibertape

Die besonders in den 80er und 90er Jahren erprobten synthetischen Verfahren wie Gore-Tex®[®], PDS®[®], Dacron®[®], Carbon fiber versagten als Kreuzbandersatz und Trägermaterial aufgrund von Abnutzungserscheinungen und Implantatversagen über die Zeit [69]. Einzig Dacron besitzt weiterhin einen Stellenwert in der Reparatur von Rotatorenmanschettenrupturen [113]. Auch als Unterstützung zu einem biologischen Scaffold (wie Kennedy-LAD) zeigten sich Nachteile wie Entzündungsreaktionen oder eine schwache Ligamentisierung aufgrund vollständiger Kraftabschirmung des Implantates [71, 114]. In den letzten Jahren zeigte sich dennoch ein Stellenwert dieser einst als Ligament Augmentation Devices verwendeten Verfahren, wie mit dem LARS®[®] oder InternalBrace[™] (mittels FiberTape®[®]) derzeit erprobt wird [75, 115, 116].

Nach Implantation durchlaufen Autografts drei Phasen. In einer frühen Heilungsphase, die geprägt ist von Gewebsnekrose und Zelleinwanderung in den Graft von Seiten der Bohrkanäle, bleibt ein Großteil der initialen Bandstabilität noch erhalten und die noch insuffiziente Verankerung des Implantates im Knochen stellt die größte Schwachstelle dar. Dem schließt sich die Proliferationsphase (4-12 Wochen post-OP) an. Myofibroblasten besiedeln das Konstrukt und das Kreuzband ist besonders schwach zwischen 6. und 8. Woche. Dies liegt an den stattfindenden Umbauprozessen (erhöhte Vaskularisierung, Verlust der KF-Struktur und crimp pattern, Erniedrigung der KF Dichte und Durchmesser, vorwiegende Kollagen III Produktion). Mit Abschluss dieser zellulären Vorgänge schließt sich nach 12 Wochen die Ligamentisierungsphase an, in der die ursprüngliche ligamentäre Struktur versucht wird zu remodellieren. Diese wird jedoch nie erreicht, und wie lange dieser Prozess anhält ist nicht bekannt [100, 117]. Dies erklärt auch die nach Ekdahl et al. erniedrigte Reißfestigkeit nach 7 Wochen in Primaten nach BTB Graft auf nur noch 16% der Kontrollseite und nur 39% nach einem Jahr [108], was dennoch über den 12,4% nach 6 Wochen und 19.9% der vorherigen Tierstudie [87] liegt. Ähnlich niedrige Ergebnisse zeigten andere Tierstudien (siehe [118] und Abb. 33).

Die initial geringe Reißfestigkeit der Konstrukte während der Ligamentisierung in vivo [87] konnte durch das cross linking Verfahren mittels Genipin [88] nicht gelöst werden. Daher wurde basierend auf dem zunehmenden klinischen und experimentellen Einsatz synthetischer Materialien das FiberTape®[®] der Firma Arthrex®[®] zur initialen mechanischen Unterstützung ausgewählt, wie dies beim InternalBrace[™] der Fall ist. Um eine alleinige Belastung des FiberTapes®[®] zu vermeiden, wurde sowohl bei der

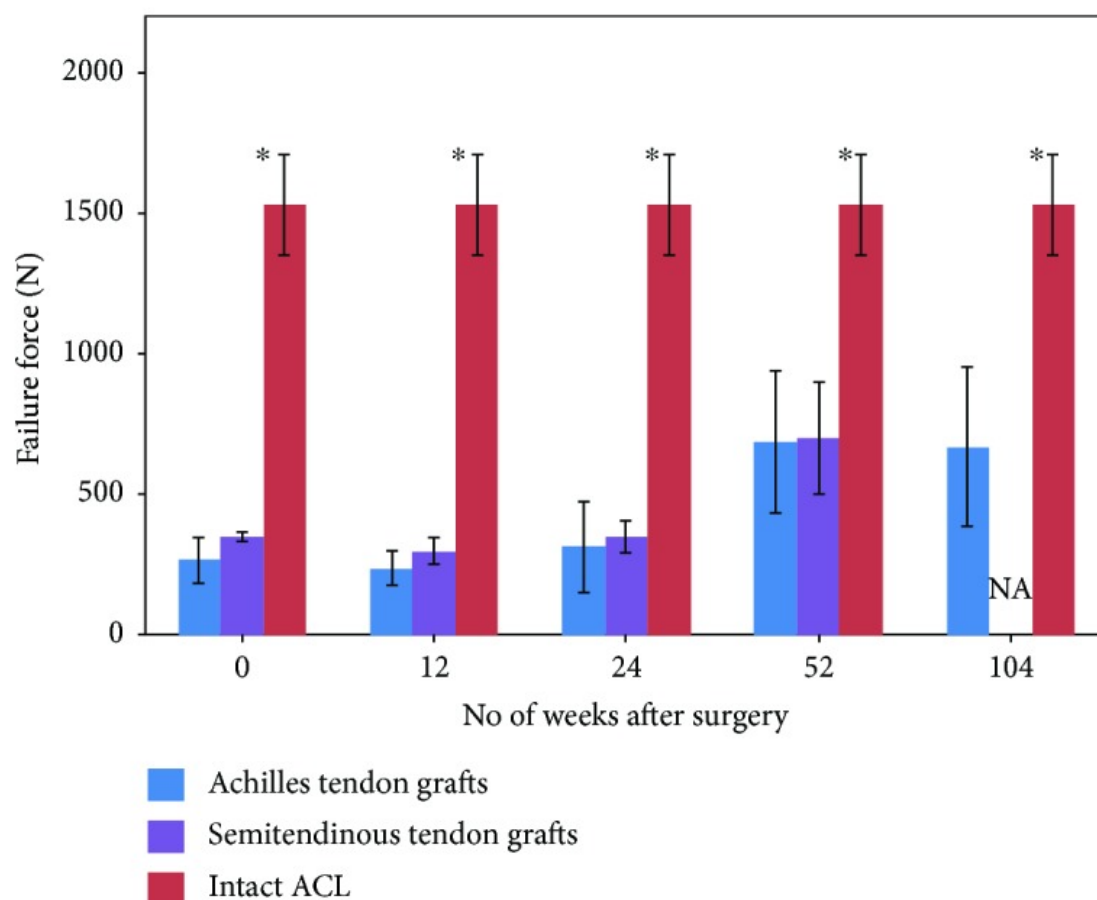


Abb. 33: Vergleich der maximalen Reißfestigkeit verschiedener ACL-Sehnenersatzverfahren im Langzeitversuch im Schaf. Signifikanter ($p < 0,05$ *) Unterschied des Autografts zur intakten Gegenseite. Aus [118] mit Daten von [119, 120], mit freundlicher Genehmigung durch den Herausgeber.

in-vitro Materialtestung, als auch der in-vivo Implantation das Fibertape lediglich lose ohne Vorspannung verwendet. In der Materialtestung zeigte sich alleine durch das Hinzufügen des FiberTapes® keine signifikante ($p > 0,05$) Zunahme der Reißfestigkeit oder Steifigkeit der Minipig-Konstrukte. Dies war sowohl gegenüber der einfachen Kontrolle, als auch einem gewebten Konstrukt der Fall, was den internen Reibungswiderstand erhöhen sollte. Folglich sollte die Implantation im Tierversuch die primäre Stabilität nicht erhöhen, sondern vielmehr das KF Konstrukt vor zu hohen Zug- und Scherkräften schützen, was über eine lose Verankerung ohne Vorspannung über die Endobuttons erreicht wurde. Das im Tierversuch gesehene zweite Maximum nach initialem Riss des rekonstruierten ACL zeigt daher, dass das FiberTape® nach 6 Wochen sowie 6 Monaten nichttragend ist. Außerdem zeigte sich makroskopisch eine gute Integration mit vollständigem Synovialüberzug des FiberTapes® in das spätere ACL.

Vergleicht man außerdem die maximale Reißfestigkeit dieser Tierstudie mit den vorangegangenen Daten ohne FiberTape® [87], so liegen die Implantate nach 6 Wochen noch sehr dicht beieinander 81,0 N zu 80,5 N wohingegen nach 6 Monaten die FiberTape®-Minipigs mit 345,6 N signifikant höher liegen als die normalen Konstrukte mit 161,6 N ($p = 0,004$). Dieser Vergleich unterliegt der Limitation, dass für beide Versuche gleiches Alter der Tiere, gleiche Konstruktfer-tigung, OP, Haltung, Präparation und Materialtestung angenommen wird. Unter diesen Annahmen wäre es möglich, den zusätzlichen Einsatz des Fibertapes® zur Unterstützung der Ligamentremodellierung zu diskutieren. Auch eine berichtete Fremdkörperreaktion gegen ein solches intraartikuläres synthetisches Material [71], ebenso wie eine erhöhte Neigung zur Arthroseentstehung, konnte, verglichen zu den Resultaten von Bischofsberger [87] nicht gezeigt werden (siehe Abb. 27).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die weiterhin bestehenden Probleme bei der Behandlung von ACL Rupturen. Sowohl die Wahl des operativen Verfahrens, die Wiederherstellung der ursprünglichen anatomischen Verhältnisse, als auch die postoperative Versorgung (Rehabilitation und "back to sports") und posttraumatische Arthroseentstehung (PTOA) sind weiterhin Diskussion aktueller Forschung. Gleichzeitig konnte besonders im Langzeitversuch kein überlegenes Verfahren bestätigt werden [38]. Dies wird auch durch das derzeitige kommerzielle Interesse an sogenannten ACL-Reparatur-Verfahren bestätigt, die genau diese Schwachstellen zu lösen versprechen [75, 76, 79].

Es besteht daher weiterhin ein Bedarf an innovativen Therapieansätzen. Das hier vorgestellte Verfahren zeigt als Erstes die Verbindung eines rein biomaterialbasierten Transplantatersatzes mit einer synthetischen Augmentation zur Verbesserung der initialen Transplantatschwäche während der Remodellierung, wie auch kürzlich für humane autologe Hamstringplastiken berichtet [116]. Das verwendete Fibertape ist Bestandteil bestehender ACL Operationen (siehe Internal Brace Ligament Augmentation von Arthrex) und somit ein interessanter Kandidat für die Verwendung im Rahmen dieser Studie.

Es konnte gezeigt werden, dass der aus RS-Kollagen gefertigte Ersatz nach initial stark herabgesetzter Reißfestigkeit während der Remodellierungsphase, nach 6 Monaten mit 36,62% zur Gegenseite ein sehr gutes Ergebnis verglichen zu weiteren Tierstudien liefert [118]. In wie weit dies durch die Fibertapeaugmentation zustande kommt, kann nicht abschließend geklärt werden. Die gute Integration des Fibertapes, die Tatsache, dass es zu beiden Zeitpunkten nichttragend ist (siehe 2. Maximum in der Kraft-Dehnungskurve) und das beste in-vivo Ergebnis aller drei Studien, indiziert jedoch einen positiven Einfluss. Das PTOA Risiko besteht wie bei jedem bisherigen Therapieansatz weiterhin, sollte aber aufgrund der Unterschiede zwischen dem Tiermodell und Menschen nicht in diesem Maße und so früh postoperativ zu beobachten sein [36, 80]. Für diese Aussage fehlt ein Vergleich zu dem bisherigen Goldstandard.

Bezüglich der Lagerungsbedingungen scheint unter Vorbehalt der großen Variabilität in der Fertigung jeglicher Zeitraum und jede der getesteten Temperaturen akzeptabel. Aufgrund der klinischen Praktikabilität wäre die Lagerung im Kühlschrank zu empfehlen. Vor der klinischen Anwendung sollte jedoch versucht werden die KF-Vorauswahl auf dickere Fasern zu fokussieren. Durch das rund vierfach größere Volumen humaner Konstrukte kann jedoch auch von durchschnittlich geringerer Variabilität ausgegangen werden. Außerdem ist durch die höhere Erfahrung des

Operateurs eine Bohrkanalfehlpriorisierung im Menschen unwahrscheinlicher.
Zur weiteren Validierung wäre ein Vergleich zum derzeitigen therapeutischen Goldstandard anzudenken bevor die vielversprechenden Ergebnisse dieser Studie im Menschen erprobt werden.

6 Anhang

6.1 Entwässerungsprotokoll

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

6.2 Färbeprotokoll Movat-Pentachrom-Färbung

entplasten in MEA	3 x 30 min
absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 80%)	je 2 min
Aqua dest.	2 min
Alcianblau	10 min
Abspülen mit Leitungswasser	
Alkalischer Ethylalkohol	1 h
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest., eintauchen	
Weigert's Eisenhämatoxylin	10 min
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest.	2 min
Brilant Crocein-Säurefuchsin	10-15 min
Essigsäure 0,5%, abspülen	
PWS (Phosphorwolframsäure) 5%	20 min
Essigsäure 0,5%, abspülen	
Ethylalkohol 100%	3 x 5 min
Saffron du Gatinais	1 h
Ethylalkohol 100%	3 x abspülen
Ethylalkohol 100%	2 min
Xylol	2 x 5 min

Literaturverzeichnis

- [1] P. Komdeur, F. E. Pollo, and R. W. Jackson. Dynamic knee motion in anterior cruciate impairment: A report and case study. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 15(3):257–259, 2002.
- [2] D. Drenckhahn. *Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Elsevier, Urban & Fischer, 2008.
- [3] F. Flandry and G. Hommel. Normal anatomy and biomechanics of the knee. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 19(2):82–92, 2011.
- [4] R. C. More, B. T. Karras, R. Neiman, D. Fritschy, S. L.-Y. Woo, and D. M. Daniel. Hamstrings—an anterior cruciate ligament protagonist. *The American Journal of Sports Medicine*, 21(2):231–237, 1993.
- [5] A. Wilcke. *Vordere Kreuzbandlasion : Anatomie, Pathophysiologie, Diagnose, Therapie, Trainingslehre, Rehabilitation ; mit 106 Tabellen*. Steinkopff, Darmstadt, 2004.
- [6] M. Girgis and A. Monajem. The cruciate ligaments of the knee joint. anatomical, functional and experimental analysis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (106):216–231, 1975.
- [7] W. Petersen. *Das vordere Kreuzband : Grundlagen und aktuelle Praxis der operativen Therapie ; mit 29 Tabellen*. Dt. Arzte-Verl, Koln, 2009.
- [8] M. T. Hirschmann and W. Müller. Complex function of the knee joint: the current understanding of the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 23(10):2780–2788, Dec 2015.
- [9] A. Neuberger and H. G. B. Slack. The metabolism of collagen from liver, bone, skin and tendon in the normal rat. *Biochemical Journal*, 53(1):47–52, 1953.
- [10] M. M. Murray, P. Vavken, and B. Fleming. *The ACL Handbook Knee Biology, Mechanics, and Treatment*. Springer New York, 2013.
- [11] Z. Halata, C. Wagner, and K. I. Baumann. Sensory nerve endings in the anterior cruciate ligament (lig. cruciatum anterius) of sheep. *The Anatomical Record*, 254(1):13–21, Jan 1999.

- [12] P. Sjölander, H. Johansson, P. Sojka, and A. Rehnholm. Sensory nerve endings in the cat cruciate ligaments: A morphological investigation. *Neuroscience Letters*, 102(1):33–38, 1989.
- [13] S. L.-Y. Woo, J. M. Hollis, D. J. Adams, R. M. Lyon, and S. Takai. Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex. *The American Journal of Sports Medicine*, 19(3):217–225, 1991.
- [14] P. Renstrom, A. Ljungqvist, E. Arendt, B. Beynnon, T. Fukubayashi, W. Garrett, T. Georgoulis, T. E. Hewett, R. Johnson, T. Krosshaug, and et al. Non-contact acl injuries in female athletes: an international olympic committee current concepts statement. *British Journal of Sports Medicine*, 42(6):394–412, Jul 2008.
- [15] Patrick W. Cawley, Robert S. Heidt, Pierce E. Scranton, Gary M. Losse, and Mark E. Howard. Physiologic axial load, frictional resistance, and the football shoe—surface interface. *Foot Ankle International*, 24(7):551–556, 2003.
- [16] M. Lind, F. Menhert, and A. B. Pedersen. The first results from the danish acl reconstruction registry: epidemiologic and 2 year follow-up results from 5,818 knee ligament reconstructions. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 17(2):117–124, 2008.
- [17] A. Pearle. Ipsilateral graft and contralateral acl rupture at five years or more following acl reconstruction. *JBJS Orthopaedic Highlights: Sports Medicine*, 1(3), 2011.
- [18] R. W. Wright, W. R. Dunn, A. Amendola, J. T. Andrish, J. Bergfeld, C. C. Kaeding, R. G. Marx, E. C. Mccarty, R. D. Parker, M. Wolcott, and et al. Risk of tearing the intact anterior cruciate ligament in the contralateral knee and rupturing the anterior cruciate ligament graft during the first 2 years after anterior cruciate ligament reconstruction. *The American Journal of Sports Medicine*, 35(7):1131–1134, 2007.
- [19] L. Salmon, V. Russell, T. Musgrove, L. Pinczewski, and K. Refshauge. Incidence and risk factors for graft rupture and contralateral rupture after anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic Related Surgery*, 21(8):948–957, 2005.
- [20] M. Hope and T. S. Saxby. Tendon healing. *Foot and Ankle Clinics*, 12(4):553–567, 2007.

- [21] G. Yang, B. B. Rothrauff, and R. S. Tuan. Tendon and ligament regeneration and repair: Clinical relevance and developmental paradigm. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 99(3):203–222, 2013.
- [22] H. M. Kim, G. Nelson, S. Thomopoulos, M. J. Silva, R. Das, and R. H. Gelberman. Technical and biological modifications for enhanced flexor tendon repair. *The Journal of Hand Surgery*, 35(6):1031–1037, 2010.
- [23] H. Miyashita, M. Ochi, and Y. Ikuta. Histological and biomechanical observations of the rabbit patellar tendon after removal of its central one-third. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 116(8):454–462, Jan 1997.
- [24] R. C. Bray, C. A. Leonard, and P. T. Salo. Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(6):1118–1123, 2003.
- [25] M. M. Murray, S. D. Martin, T. L. Martin, and M. Spector. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture*. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 82(10):1387–1397, 2000.
- [26] C. M. Haslauer, B. L. Proffen, V. M. Johnson, and M. M. Murray. Expression of modulators of extracellular matrix structure after anterior cruciate ligament injury. *Wound Repair and Regeneration*, 22(1):103–110, 2014.
- [27] A. N. Mastrangelo, B. M. Haus, P. Vavken, M. P. Palmer, J. T. Machan, and M. M. Murray. Immature animals have higher cellular density in the healing anterior cruciate ligament than adolescent or adult animals. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010.
- [28] F. L. Hefti, A. Kress, J. Fasel, and E. W. Morscher. Healing of the transected anterior cruciate ligament in the rabbit. *The Journal of Bone Joint Surgery*, 73(3):373–383, 1991.
- [29] L. M. Galatz, C. M. Ball, S. A. Teefey, W. D. Middleton, and K. Yamaguchi. The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. *The Journal of Bone Joint Surgery*, 86(2):219–224, 2004.
- [30] M. Lundberg and K. Messner. Long-term prognosis of isolated partial medial collateral ligament ruptures. *The American Journal of Sports Medicine*, 24(2):160–163, 1996.

- [31] A. J. Harrold. The defect of blood coagulation in joints. *Journal of Clinical Pathology*, 14(3):305–308, Jan 1961.
- [32] M. M. Murray and K. P. Spindler. Anterior cruciate ligament healing and repair. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 13(3):151–155, 2005.
- [33] R. F. Loeser. Aging processes and the development of osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(1):108–113, 2013.
- [34] M. D. Kohn, A. A. Sassoon, and N. D. Fernando. Classifications in brief: Kellgren-lawrence classification of osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 474(8):1886–1893, Dec 2016.
- [35] R. F. Loeser, S. R. Goldring, C. R. Scanzello, and M. B. Goldring. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheumatism*, 64(6):1697–1707, 2012.
- [36] G. Reisig, M. Kreinest, W. Richter, M. Wagner-Ecker, D. Dinter, U. Attenberger, B. Schneider-Wald, S. Fickert, and M. L. Schwarz. Osteoarthritis in the knee joints of göttingen minipigs after resection of the anterior cruciate ligament? missing correlation of mri, gene and protein expression with histological scoring. *Plos One*, 11(11), Jul 2016.
- [37] A. V. Porat. High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient relevant outcomes. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(3):269–273, Jan 2004.
- [38] C. Wen and L. S. Lohmander. Does post-injury acl reconstruction prevent future oa? *Nature Reviews Rheumatology*, 10(10):577–578, 2014.
- [39] J. T. Sieker, B. L. Proffen, K. A. Waller, K. E. Chin, N. P. Karamchedu, M. R. Akelman, G. S. Perrone, A. M. Kiapour, J. Konrad, M. M. Murray, and et al. Transcriptional profiling of articular cartilage in a porcine model of early post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, Mar 2017.
- [40] Y. Krishnan and A. J. Grodzinsky. Cartilage diseases. *Matrix Biology*, 63, May 2018.
- [41] C. B. Little, M. M. Smith, M. A. Cake, R. A. Read, M. J. Murphy, and F. P. Barry. The oarsi histopathology initiative – recommendations for histological

- assessments of osteoarthritis in sheep and goats. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, 2010.
- [42] V. B. Kraus, B. Burnett, J. Coindreau, S. Cottrell, D. Eyre, M. Gendreau, J. Gardiner, P. Garnerio, J. Hardin, Y. Henrotin, and et al. Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(5):515–542, 2011.
- [43] B. D. Matteo, V. Tarabella, G. Filardo, P. Tomba, A. Viganò, M. Marcacci, and S. Zaffagnini. Knee multi-ligament reconstruction: a historical note on the fundamental landmarks. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 23(10):2773–2779, Oct 2015.
- [44] O’Donoghue D. H., Rockwood C. A. Jr., Frank G. R., Jack S. C., and Kenyon R. Repair of the anterior cruciate ligament in dogs. *American Journal of Bone Joint Surgery*, 48(3):503–19, 1966.
- [45] J. L. Marshall, R. F. Warren, and T. L. Wickiewicz. Primary surgical treatment of anterior cruciate ligament lesions. *The American Journal of Sports Medicine*, 10(2):103–107, 1982.
- [46] J. A. Feagin and W. W. Curl. Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study. *The American Journal of Sports Medicine*, 4(3):95–100, 1976.
- [47] M. Odensten, P. Hamberg, M. Nordin, J. Lysholm, and J. Gillquist. Surgical or conservative treatment of the acutely torn anterior cruciate ligament. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, NA;(198), 1985.
- [48] M. Bauer and R. Sandberg. Surgical versus non-surgical treatment of knee ligament injuries. *Surgery and Arthroscopy of the Knee*, page 121–122, 1988.
- [49] J. T. Bertoia, E. P. Urovitz, R. R. Richards, and A. E. Gross. Anterior cruciate reconstruction using the macintosh lateral-substitution over-the-top repair. *The Journal of Bone Joint Surgery*, 67(8):1183–1188, 1985.
- [50] J. Insall, D. M. Joseph, P. Aglietti, and R. D. Campbell. Bone-block iliotibial-band transfer for anterior cruciate insufficiency. *The Journal of Bone Joint Surgery*, 63(4):560–569, 1981.
- [51] M. P. Nogalski and B. R. Jr. Bach. A review of early anterior cruciate ligament surgical repair or reconstruction. results and caveats. *Orthop Rev*, 11:1213–23, 1993.

- [52] T. Iriuchishima, K. Shirakura, and F. H. Fu. Graft impingement in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 21(3):664–670, 2012.
- [53] N. G. Mohtadi, D. S. Chan, K. N. Dainty, and D. B. Whelan. Patellar tendon versus hamstring tendon autograft for anterior cruciate ligament rupture in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Jul 2011.
- [54] A. Kurz, N. Evaniew, M. Yeung, K. Samuelsson, D. Peterson, and O. R. Ayeni. Credibility and quality of meta-analyses addressing graft choice in anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 25(2):538–551, 2016.
- [55] R. B. Frobell, E. M. Roos, H. P. Roos, J. Ranstam, and L. S. Lohmander. A randomized trial of treatment for acute anterior cruciate ligament tears. *New England Journal of Medicine*, 363(4):331–342, 2010.
- [56] K. G. Jones. Reconstruction of the anterior cruciate ligament. *The Journal of Bone Joint Surgery*, 45(5):925–932, 1963.
- [57] J. Kartus, T. Movin, and J. Karlsson. Donor-site morbidity after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts. *Anterior Knee Pain and Patellar Instability*, page 305–319.
- [58] X. Xie, X. Liu, Z. Chen, Y. Yu, S. Peng, and Q. Li. A meta-analysis of bone–patellar tendon–bone autograft versus four-strand hamstring tendon autograft for anterior cruciate ligament reconstruction. *The Knee*, 22(2):100–110, 2015.
- [59] D. J. Biau, C. Tournoux, S. Katsahian, P. J. Schranz, and R. S Nizard. Bone–patellar tendon–bone autografts versus hamstring autografts for reconstruction of anterior cruciate ligament: meta-analysis. *Bmj*, 332(7548):995–1001, Jul 2006.
- [60] A. Heijne and S. Werner. A 2-year follow-up of rehabilitation after acl reconstruction using patellar tendon or hamstring tendon grafts: a prospective randomised outcome study. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18(6):805–813, 2009.
- [61] S. Kohl. Vordere Kreuzband-OP-Technik: State of the Art und Zukunft. *Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie*, 61(2):25–30, 2013.

- [62] M. Marcacci, A. P. Molgora, S. Zaffagnini, A. Vascellari, F. Iacono, and M. L. Presti. Anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with hamstrings. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic Related Surgery*, 19(5):540–546, 2003.
- [63] A. Torkaman, H. Yazdi, and M. Hosseini. The results of single bundle versus double bundle acl reconstruction surgery, a retrospective study and review of literature. *Medical Archives*, 70(5):351, 2016.
- [64] S. B. Cohen and J. K. Sekiya. Allograft safety in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clinics in Sports Medicine*, 26(4):597–605, 2007.
- [65] C. Bait, P. Randelli, R. Compagnoni, P. Ferrua, R. Papalia, F. Familiari, A. Tecame, P. Adravanti, E. Adriani, E. Arnaldi, and et al. Italian consensus statement for the use of allografts in acl reconstructive surgery. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, Feb 2018.
- [66] C. C. Kaeding, B. Aros, A. Pedroza, E. Pifel, A. Amendola, J. T. Andrish, W. R. Dunn, R. G. Marx, E. C. Mccarty, R. D. Parker, and et al. Allograft versus autograft anterior cruciate ligament reconstruction. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*, 3(1):73–81, Dec 2010.
- [67] A. J. Krych, J. D. Jackson, T. L. Hoskin, and D. L. Dahm. A meta-analysis of patellar tendon autograft versus patellar tendon allograft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic Related Surgery*, 24(3):292–298, 2008.
- [68] F. Lange. Künstliche Bänder aus Seide. *Med Wochenschrift*, 52:834–836, 1907.
- [69] W. Satora, A. Królikowska, A. Czamara, and P. Reichert. Synthetic grafts in the treatment of ruptured anterior cruciate ligament of the knee joint. *Polymers in Medicine*, 47(1):55–59, Feb 2017.
- [70] J. C. Richmond, C. J. Manseau, R. Patz, and O. Mcconville. Anterior cruciate reconstruction using a dacron ligament prosthesis. *The American Journal of Sports Medicine*, 20(1):24–28, 1992.
- [71] K. Kumar and N. Maffulli. The ligament augmentation device: An historical perspective. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic Related Surgery*, 15(4):422–432, 1999.

- [72] P. Thuresson, R. Sandberg, O. Johansson, B. Balkfors, and N. Westlin. Anterior cruciate ligament reconstruction with the patellar tendon-augmentation or not? *Scandinavian Journal of Medicine Science in Sports*, 6(4):247–254, 2007.
- [73] J. Rading and L. Peterson. Clinical experience with the leeds-keio artificial ligament in anterior cruciate ligament reconstruction. *The American Journal of Sports Medicine*, 23(3):316–319, 1995.
- [74] B. Mody, L. Howard, M. Harding, H. Parmar, and D. Learmonth. The abc carbon and polyester prosthetic ligament for acl-deficient knees. early results in 31 cases. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 75-B(5):818–821, 1993.
- [75] G. Anthony and Mackay I. C. Anterior cruciate ligament repair revisited. preliminary results of primary repair with internal brace ligament augmentation: A case series. *Orthopedic Muscular System*, 04(02), 2015.
- [76] P. Ranger, A. Senay, G. R. Gratton, M. Lacelle, and J. Delisle. Lars synthetic ligaments for the acute management of 111 acute knee dislocations: effective surgical treatment for most ligaments. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2018.
- [77] K. S. Bieri, S. M. Scholz, S. Kohl, E. Aghayev, and L. P. Staub. Dynamic intraligamentary stabilization versus conventional acl reconstruction: A matched study on return to work. *Injury*, 48(6):1243–1248, 2017.
- [78] P. Mahapatra, S. Horriat, and B. S. Anand. Anterior cruciate ligament repair – past, present and future. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 5(1), 2018.
- [79] M. M. Murray, B. M. Flutie, L. A. Kalish, K. Ecklund, B. C. Fleming, B. L. Proffen, and L. J. Micheli. The bridge-enhanced anterior cruciate ligament repair (bear) procedure. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 4(11):232596711667217, 2016.
- [80] A. M. Kiapour, B. C. Fleming, and M. M. Murray. Structural and anatomic restoration of the anterior cruciate ligament is associated with less cartilage damage 1 year after surgery: Healing ligament properties affect cartilage damage. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 5(8):232596711772388, 2017.

- [81] G. S. Perrone, B. L. Proffen, A. M. Kiapour, J. T. Sieker, B. C. Fleming, and M. M. Murray. Bench-to-bedside: Bridge-enhanced anterior cruciate ligament repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(12):2606–2612, Sep 2017.
- [82] R. Langer and J. Vacanti. Tissue engineering. *Science*, 260(5110):920–926, 1993.
- [83] A. Ignatius and L. Dürselen. Möglichkeiten und Grenzen des tissue engineering“ des vorderen Kreuzbandes. *Der Orthopäde*, 38(11):1080–1086, Jan 2009.
- [84] M. M. Murray, P. Vavken, and B. Fleming. *The ACL Handbook Knee Biology, Mechanics, and Treatment*. Springer New York, 2013.
- [85] G. Vunjak-Novakovic. Tissue engineering: Basic considerations. *Culture of Cells for Tissue Engineering*, page 129–155, Sep 2006.
- [86] F. Stöckhert. Biokompatibilitätsmessungen, Anwendung und histologische Untersuchung eines Kreuzbandtransplantats aus Kollagen-I basiertem Biomaterial am Tiermodell, Dissertationsschrift, 2009.
- [87] S. Bischofberger. Biomechanische Untersuchung von biomaterialbasierten Kreuzbandkonstrukten, Dissertationsschrift, 2013.
- [88] A. Klug. Biomechanische und zellbiologische Untersuchung von augmentierten biomaterialbasierten Kreuzbandkonstrukten, Dissertationsschrift, 2015.
- [89] J. W. Xerogeanes, R. J. Fox, Y. Takeda, H-S. Kim, Y. Ishibashi, G. J. Carlin, and S. L-Y. Woo. A functional comparison of animal anterior cruciate ligament models to the human anterior cruciate ligament. *Annals of Biomedical Engineering*, 26(3):345–352, 1998.
- [90] A. M. Kiapour, M. R. Shalvoy, M. M. Murray, and B. C. Fleming. Validation of porcine knee as a sex-specific model to study human anterior cruciate ligament disorders. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 473(2):639–650, Jan 2014.
- [91] M. Csizy and N. F. Friederich. Bohrkanallokalisation in der operativen Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. *Der Orthopäde*, 31(8):741–750, Aug 2002.
- [92] J. W. Freeman, M. D. Woods, and C. T. Laurencin. Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid–twist scaffold design. *Journal of Biomechanics*, 40(9):2029–2036, 2007.

- [93] N. Caplan and D. F. Kader. Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. *Classic Papers in Orthopaedics*, page 145–147, Jul 2013.
- [94] B. Forsythe, S. Kopf, A. K Wong, C. Aq Martins, W. Anderst, S. Tashman, and F. H. Fu. The location of femoral and tibial tunnels in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction analyzed by three-dimensional computed tomography models. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 92(6):1418–1426, 2010.
- [95] M. Bernard, P. Hertel, H. Hornung, and T. Cierpinski. Femoral insertion of the acl: radiographic quadrant method. *Am J Knee Surg*, pages 14–21, Oct 1997.
- [96] H. U. Staeubli and W. Rauschnig. Tibial attachment area of the anterior cruciate ligament in the extended knee position. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2(3):138–146, 1994.
- [97] A. P. Parkar. The anatomic centers of the femoral and tibial insertions of the anterior cruciate ligament: A systematic review of imaging and cadaveric studies reporting normal center locations. *The American Journal of Sports Medicine*, 45(2):2180–2188, 2016.
- [98] B. Parkinson, R. Gogna, C. Robb, P. Thompson, and T. Spalding. Anatomic acl reconstruction: the normal central tibial footprint position and a standardised technique for measuring tibial tunnel location on 3d ct. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 25(5):1568–1575, Jan 2015.
- [99] A. A. Amis and R. P. Jakob. Anterior cruciate ligament graft positioning, tensioning and twisting. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 6, 1998.
- [100] R. P. A. Janssen and S. U. Scheffler. Intra-articular remodelling of hamstring tendon grafts after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 22(9):2102–2108, 2013.
- [101] H.-J. Jung, G. Vangipuram, M. B. Fisher, G. Yang, S. Hsu, J. Bianchi, C. Ronholdt, and S. L-Y. Woo. The effects of multiple freeze-thaw cycles on the biomechanical properties of the human bone-patellar tendon-bone allograft. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(8):1193–1198, Apr 2011.

- [102] S. Giannini, R. Buda, F. D. Caprio, P. Agati, A. Bigi, V. D. Pasquale, and A. Ruggeri. Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons. *International Orthopaedics*, 32(2):145–151, Oct 2007.
- [103] M. M. Murray, P. Vavken, and B. Fleming. *The ACL Handbook Knee Biology, Mechanics, and Treatment*. Springer New York, 2013.
- [104] P. Vavken and M. M. Murray. Translational studies in anterior cruciate ligament repair. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(1):5–11, 2010.
- [105] C. M. Haslauer, K. A. Elsaid, B. C. Fleming, B. L. Proffen, V. M. Johnson, and M. M. Murray. Loss of extracellular matrix from articular cartilage is mediated by the synovium and ligament after anterior cruciate ligament injury. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(12):1950–1957, 2013.
- [106] C. D. Murawski, C. F. V. Eck, J. J. Irrgang, S. Tashman, and F. H. Fu. Operative treatment of primary anterior cruciate ligament rupture in adults. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 96(8):685–694, 2014.
- [107] B. L. Proffen, M. Mcelfresh, B. C. Fleming, and M. M. Murray. A comparative anatomical study of the human knee and six animal species. *The Knee*, 19(4):493–499, 2012.
- [108] M. Ekdahl, J. H.-C. Wang, M. Ronga, and F. H. Fu. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 16(10):935–947, 2008.
- [109] L. Schrader, B. Bünger, M. Marahrens, I. Müller-Arnke, C. Otto, D. Schäffer, and F. Zerbe. Anforderungen an eine tiergerechte Nutztierhaltung. *Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft Schrift*, (446):19–25, 2006.
- [110] M. D. Newton, A. A. Davidson, R. Pomajzl, J. Seta, M. D. Kurdziel, and T. Maerz. The influence of testing angle on the biomechanical properties of the rat supraspinatus tendon. *Journal of Biomechanics*, 49(16):4159–4163, 2016.
- [111] L. Linnanmäki, H. Göransson, J. Havulinna, P. Sippola, T. Karjalainen, and O. V. Leppänen. Validity of parameters in static linear testing of flexor tendon repair. *Journal of Biomechanics*, 49(13):2785–2790, 2016.

- [112] S. P. Harms, F. R. Noyes, E. S. Grood, A. W. Jetter, L. E. Huser, M. S. Levy, and E. J. Gardner. Anatomic single-graft anterior cruciate ligament reconstruction restores rotational stability: A robotic study in cadaveric knees. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic Related Surgery*, 31(10):1981–1990, 2015.
- [113] J. Chen, J. Xu, A. Wang, and M. Zheng. Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Review of Medical Devices*, 6(1):61–73, 2009.
- [114] R. Mascarenhas and P. B. MacDonald. Anterior cruciate ligament reconstruction: a look at prosthetics - past, present and possible future. *McGill Journal of Medicine*, 11(1):29–37, Jan 2008.
- [115] J. H. Lubowitz. Editorial commentary: Synthetic acl grafts are more important than clinical nonbelievers may realize. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic Related Surgery*, 31(5):969–970, 2015.
- [116] M. Aboalata, A. Elazab, A. Halawa, A. B. Imhoff, and Y. Bassiouny. Internal suture augmentation technique to protect the anterior cruciate ligament reconstruction graft. *Arthroscopy Techniques*, 6(5), 2017.
- [117] L. Pauzenberger, S. Syré, and M. Schurz. “ligamentization” in hamstring tendon grafts after anterior cruciate ligament reconstruction: A systematic review of the literature and a glimpse into the future. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic Related Surgery*, 29(10):1712–1721, 2013.
- [118] M. Marieswaran, I. Jain, B. Garg, V. Sharma, and D. Kalyanasundaram. A review on biomechanics of anterior cruciate ligament and materials for reconstruction. *Applied Bionics and Biomechanics*, 2018:1–14, 2018.
- [119] E. Kondo, K. Yasuda, T. Katsura, R. Hayashi, Y. Kotani, and H. Tohyama. Biomechanical and histological evaluations of the doubled semitendinosus tendon autograft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *The American Journal of Sports Medicine*, 40(2):315–324, 2011.
- [120] A. Weiler, G. Peters, J. Mäurer, F. N. Unterhauser, and N. P. Südkamp. Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *The American Journal of Sports Medicine*, 29(6):751–761, 2001.