

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. M. Rudert**

**Entwicklung und biomechanische Untersuchungen eines  
Kreuzbandkonstrukts aus biomaterialbasiertem Kollagen I**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Simon Bischofberger  
aus Freiburg**

**Würzburg, Juli 2012**

Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Nöth

Koreferent: Prof. Dr. Heike Walles

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2013

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie gewidmet

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb	Abbildung
ACL	Anterior Cruciate Ligament
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BPTB	Bone-Patella-Tendon-Bone
CPRP	Collagen-Platelet-Rich-Plasma
cm	Zentimeter
EGF	Endothelial Growth Faktor
FDA	US Food and Drug Administration
HKB	Hinteres Kreuzband
IGF1	Insulin Growth like Factor 1
KF	Kollagenfaser
LCA	Ligamentum Cruciatum Anterius
m	Meter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Newton
N/mm <sup>2</sup>	Newton pro Quadratmillimeter
MPa	Megapascal
MRB	Magnetic Resonance Bavaria
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale stem cells
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Posterior Cruciate Ligament
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGA	Polyglycolic Acid
PLAGA	Poly-Co-Glycolic-Acid
PLLA	Poly-L-Lactid-Acid
PLA	Poly lactide Acid
RS	Rattenschwanz
ST	Sehne des Musculus semitendinosus
Tab.	Tabelle

TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor $\alpha$
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
VKB	Vorderes Kreuzband
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin Würzburg
$\mu\text{m}$	Mikrometer

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das vordere Kreuzband	1
1.1.1 Folgen einer Kreuzbandruptur	1
1.1.2 Entwicklung der Kreuzbandchirurgie	3
1.1.3 Regeneration von Sehnen und Bändern	5

1.1.4	Mögliche chirurgische Therapieoptionen	6
1.2	Anatomie des vorderen Kreuzbandes	8
1.3	Biomechanik im Kniegelenk	10
1.3.1	Biomechanische Eigenschaften des vorderen Kreuzbandes	11
1.4	Tissue Engineering	13
1.5	Fragestellung	15

## **2. Material und Methoden** **16**

2.1	Isolierung von Kollagenfasern	16
2.2	Herstellung von Kollagenfäden	18
2.3	Herstellung der ACL-Kreuzbandkonstrukte	19
2.4	Biomechanischen Messungen	22
2.5	Die Tierstudie	23
2.5.1	Der chirurgische Eingriff	24
2.5.2	Präparation der Kadaver	27
2.5.3	Biomechanische Untersuchung der Kadaverkniegelenke	28
2.6	Statistische Auswertung	29
2.7	Materialien	30

## **3. Ergebnisse** **32**

3.1	Charakterisierung von Kollagenfasern	32
3.1.1	Vergleich von Kollagenfasern unterschiedlicher Länge	32
3.1.2	Vergleich von Kollagenfasern unterschiedlichen Geschlechts	34
3.1.3	Vergleich von Kollagenfasern unterschiedlicher Chargen	35
3.1.4	Einfluss der Vorkraft auf die Maximalkraft von	

Kollagenfasern	37
3.1.5 Einfluss der Sterilisation auf die Maximalkraft von Kollagenfasern	38
3.2 Die verschiedenen ACL-Konstruktvarianten	39
3.2.1 Konstruktvariante <i>A</i>	41
3.2.2 Konstruktvariante <i>B</i>	41
3.2.3 Konstruktvariante <i>C</i>	42
3.3 Ergebnisse der Tierstudie	45
3.3.1 Natives ACL im Vergleich mit den ACL-Konstrukten der 6-Wochen- und der 6-Monatsgruppe	45
<b>4. Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1 Methodische Überlegungen	49
4.2 Unterschiedliche Trägermaterialien	51
4.3 Isolierung von Kollagenfasern und Herstellung von Kollagenfäden	55
4.4 Die unterschiedlichen ACL-Konstruktvarianten	56
4.5 Ergebnisse der Tierstudie	58
4.6 Ergebnisse der biomechanischen Messungen	59
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Das vordere Kreuzband

Das vordere Kreuzband (VKB; synonym LCA=Lig. cruciatum anterius oder ACL=Anterior cruciate ligament) ist eine der am häufigsten verletzten Strukturen des menschlichen Körpers bei Sportunfällen. Sportarten wie Fussball, Handball oder Ski Alpin, welche mit starken Torsionsmomenten des Kniegelenkes verbunden sind, können zu einer Ruptur insbesondere des ACL führen. Tempo und Physis haben sich enorm erhöht, besonders schnelle Richtungswechsel und zunehmender Körperkontakt erhöhen das Risiko einer Verletzung. Im letzten Jahrzehnt ist zudem ein wachsendes Interesse an Extremsportarten zu erkennen, welches einen zusätzlichen Anstieg solcher Verletzungsmuster erwarten lässt.

Die Ursache einer Kreuzbandruptur besteht in einem indirekten Valgus- und Rotationstrauma.<sup>1</sup> Der Körperschwerpunkt liegt hier meist hinter dem Kniegelenk. Circa 90% der ligamentären Knieverletzungen beinhalten einen Riss des ACL sowie des Innenbandes.<sup>2</sup> Sie resultieren in 30% der Fälle aus einer Kontaktsituation, in 70% der Fälle rupturiert das ACL ohne gegnerische Kontakteinwirkung.<sup>3</sup> Nicht immer wird die Verletzung von den Patienten als Trauma wahrgenommen. Oft kann ein leichtes Stechen im Knie schon ein Zeichen einer Ruptur sein.

### 1.1.1 Folgen einer Kreuzbandruptur

Die Kreuzbänder gelten als passive Führungselemente im Knie und sind insbesondere für die anterior-posteriore Stabilität zuständig. Bei einer Verletzung des ACL ist in erster Linie die anteriore Stabilität beeinträchtigt. In einem komplexen Kapsel-Bandapparat wie dem Kniegelenk führt ein Riss des ACL häufig zu Begleitverletzungen, welche zu weiteren Läsionen im Gelenk führen können. Es resultiert eine veränderte Kniekinematik, da der ursprüngliche Roll-Gleit-Mechanismus im Knie verloren geht. Die hieraus entstehenden übermässigen Bewegungen führen zu einer vermehrten Belastung des Knorpels und der Menisken insbesondere im dorsalen Bereich, sowie der

peripheren Bandstrukturen. Es resultieren Meniskusschäden, Knorpelläsionen und Multiligamentverletzungen bis hin zu knöchernen Ausrissen. Nicht selten entsteht ein komplexes Krankheitsbild mit gravierenden Spätfolgen. Eine chronische Instabilität im Knie kann zu chondralen bis hin zu osteochondralen Schäden führen. Aus diesem Grund sollten Begleitverletzungen bei einer Operation mitversorgt werden. Eine Gonarthrose kann die Folge sein. Diese Zusammenhänge sind jedoch individuell sehr unterschiedlich ausgeprägt. Es sind keine evaluierten Messparameter bekannt, welche eine Voraussage für die Entwicklung einer Arthrose zulassen. Das Ziel einer Therapie ist es, Begleitverletzungen und Spätfolgen zu verhindern oder zumindest zu verzögern.<sup>4</sup>

Über kaum eine andere Bandstruktur des menschlichen Körpers wurde in den letzten Jahrzehnten so viel geforscht und publiziert wie über das ACL.<sup>1</sup> Dies unterstreicht die Bedeutung dieser Struktur vor allem im Hinblick auf klinische und sozioökonomische Faktoren nach einer Verletzung. Die Anzahl neu diagnostizierter Kreuzbandrupturen beläuft sich in den USA auf über 250.000 pro Jahr.<sup>5</sup> Daraufhin folgen circa 150.000 Operationen pro Jahr und verursachen Kosten von über zwei Milliarden Dollar.<sup>6,7</sup> Das ACL ist für Verletzungen anfälliger als das hintere Kreuzband (Posterior Cruciate Ligament=PCL). Im König-Ludwig-Haus, Orthopädische Klinik der Universität Würzburg, werden durchschnittlich pro Jahr 180-200 ACL und 5-10 PCL Rupturen rekonstruiert. Hauptgründe für die unterschiedlichen Zahlen sind vor allem ein anderes Verletzungsmuster, der größere Durchmesser, welcher für eine höhere Belastungsfähigkeit sorgt, sowie die anders geartete Funktion des PCL.<sup>8</sup> Es fällt auf, dass die Verletzungsrate bei Frauen höher ist als bei Männern. Das Verhältnis wird in der aktuellen Literatur mit 4-9:1 angegeben.<sup>9</sup> Gründe sind vor allem eine erhöhte Bandlaxizität, ein verhältnismäßig größeres Kniegelenk, muskuläre Dysbalance, unterschiedliche Trainingstechnik sowie hormonelle Unterschiede.<sup>10</sup> Als geschlechtsunabhängige Merkmale konnten unterschiedliche Volumina der Kreuzbänder, eine schmalere Kreuzbandhöhle, neurokognitive und propriozeptive Defizite, sowie schnellere Ermündererscheinungen im Vergleich zu Kontrollgruppen als Risikofaktoren für eine ACL-Ruptur nachgewiesen werden.<sup>11,12,13,14</sup>

In der Versorgung stehen sich die konservative und operative Therapie gegenüber. Die Wahl sollte im Hinblick auf die individuellen Ansprüche des Patienten entschieden werden. Die konservative Therapie kann bei fehlender klinischer Symptomatik bevorzugt werden. Sie sollte heutzutage jedoch die Ausnahme bleiben.<sup>1</sup> Der Gefahr der chronischen Instabilität im Kniegelenk wird durch jährliche Kontrollen entgegengewirkt. Individuelle neurophysiologische und anatomische Verhältnisse können eine Verletzung teilweise kompensieren, so dass Patienten im Alltag asymptomatisch sein können. Eine alleinige Kräftigung der Muskulatur ist oft unzureichend und die Gefahr, bereits bestehende Läsionen zu verschlimmern, bleibt bestehen. Kontaktarme Sportarten wie Schwimmen oder Rad fahren sind zu bevorzugen. Eine operative Strategie dagegen wird bei jungen und aktiven Patienten genauso angewandt wie bei Patienten mit bestehender Instabilität. Bei Kindern und Jugendlichen ist aufgrund ihrer hohen körperlichen Aktivität und ihrer Lebenserwartung immer eine Operation indiziert.<sup>15</sup> Nach derzeitigem Wissen vermindert eine ACL-Rekonstruktion die Inzidenz sekundärer Meniskusschäden und chronischer Instabilität im Kniegelenk.<sup>16,17</sup> Die Prophylaxe sekundärer Schäden durch Stabilisierung des Gelenks und der Schutz vor wiederholten Mikro- und Makrotraumen stellen wichtige Ziele einer operativen Therapie dar. Die Schmerzfreiheit hat jedoch oberste Priorität.

### **1.1.2 Entwicklung der Kreuzbandchirurgie**

Die Kreuzbänder wurden schon sehr früh als Ursache von Kniegelenksbeschwerden entdeckt. Seit 5000 Jahren sind Schriften über die anatomische Struktur der Kreuzbänder bekannt. Der griechische Arzt Galen bezeichnete sie im 2. Jahrhundert n.Chr. als stabilisierende Strukturen im Knie, als „genu cruciata“.<sup>18</sup> Im Jahre 1836 beschrieben die Gebrüder Weber den Roll-Gleit-Mechanismus im Kniegelenk, die Funktion der Kreuzbänder und die unterschiedliche Spannung der jeweiligen Bündel in Abhängigkeit der Flexion. Sie beobachteten auch eine pathologische anterior-posteriore Translation nach einer ACL-Transsektion.<sup>19</sup> Zehn Jahre später publizierte der Franzose Amadé Bonnet in Lyon die Ergebnisse aus einer Kadaverstudie zu den Mechanismen

der Kreuzbänder. Sie zeigten, dass das ACL meist mit einem krachenden Geräusch an seiner femoralen Insertion reißt. Zudem erkannte er, dass Schmerzen und Hämarthros wichtige Symptome einer ACL-Verletzung sind. Bonnet erwähnte auch die dabei auftretende Subluxation im Kniegelenk, die erst um 1970 wieder als Pivot-Shift Test aufgegriffen wurde.<sup>20</sup>

Die erste operative Versorgung durch eine Kreuzbandnaht fand im Jahre 1895 durch Robson statt. Kritik an dieser Variante kam jedoch schnell auf.<sup>21</sup> Jones beschrieb 1916, dass die narbige Ausheilung alleine für die Stabilität verantwortlich sei.<sup>22</sup> Seine These wurde 60 Jahre später durch Feagin und Curl bestätigt, welche in einer größeren Studie die negativen Auswirkungen einer Kreuzbandnaht beschrieben. Die Folge war ein zunehmender Wandel in Richtung neuer Rekonstruktionsmöglichkeiten.<sup>22</sup>

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden rupturierte Kreuzbänder mittels autologem Sehnenmaterial versorgt. Der russische Arzt Gregow setzte 1913 Sehnenmaterial des Tractus Iliotibialis ein und fünf Jahre später folgte Groves mit Transplantationen der Sehnen des M. semitendinosus sowie des M. gracilis. Er legte mit seiner Operationstechnik den Grundstein für viele weitere autologe, homologe, allogene und synthetische Bandersatzplastiken.<sup>24,25</sup> Der Ersatz mittels Patellarsehne wurde erstmals im Jahre 1935 von Wittek realisiert. Er entnahm die Sehne mit einem Knochenblock zur besseren Fixierung.<sup>26</sup> Die Grundlagen für die heutige Kreuzbandchirurgie bilden bis heute die Arbeiten von Jones und Brückner. Jones zog 1963 ein Transplantat erstmals durch ein proximales Bohrloch. Wenige Jahre später publizierte Brückner ohne Kenntnis über die Arbeiten von Jones diese neue Operationstechnik. Bis heute ist diese Methode als Brückner-Plastik bekannt.<sup>27</sup>

In den 80er Jahren wurden vermehrt synthetische Materialien wie Gore-Tex®, Dacron® oder Kohlefasern für die Rekonstruktion eingesetzt.<sup>28</sup> Nach anschließender Publikation schlechter Studienergebnisse legte sich diese Euphorie jedoch bald wieder. Die Vorteile wie kleinere Operationsnarben, Schmerzreduktion, der Einsatz ausgesuchter Transplantatgrößen und geringere Morbidität der Donorseite sind auch heute noch wichtige Ziele in der Entwicklung neuartiger ACL-Konstrukte. Die sehr hohe Quote gerissener

Transplantate zeigte die Probleme körperfremden Materials auf. Abrieb und Fremdkörperreaktionen führten oft zu Schädigungen der Transplantate.<sup>29,30</sup>

Die Wahl des Transplantats ist bis heute das meist diskutierte Thema in der Kniechirurgie. Es herrscht noch keine Einigung über die bestmögliche Methode. Durchgesetzt haben sich hauptsächlich zwei Varianten. Die Verwendung der Sehne des M. semitendinosus oder die der Patellarsehne.

### **1.1.3 Regeneration von Sehnen und Bändern**

Aufgrund der vorgegebenen Physiologie und Anatomie im Kniegelenk wird eine Regeneration des ACL im Gegensatz zum Innenband selten beobachtet.<sup>31</sup> Dies hat mehrere Gründe. Nach einer Verletzung kann der Heilungsprozess in vier Phasen unterteilt werden. In der hämorrhagischen Phase kommt es aufgrund des Traumas zu starken Einblutungen und zu einer Infiltration von Lymphozyten und Leukozyten in den verletzten Gelenkspalt. Diese lösen über autokrine und parakrine Signale eine Entzündungsphase aus, welche in den ersten 72 Stunden nach Verletzung auftritt. Während dieser Phase kommt es an den rupturierten Bandstrukturen und im angrenzenden Gewebe zu mehreren Reaktionen. Eingewanderte Makrophagen phagozytieren nekrotisches Material und setzen Wachstumsfaktoren frei, welche die Granulation und die Neovaskularisation fördern. Dazu gehören PDGF (*platelet derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*).<sup>32</sup> Diese wirken chemotaktisch auf Fibroblasten und stimulieren diese zur Proliferation und zur Synthese von Kollagen Typ I, III, V und von nicht kollagenösen Proteinen.<sup>33</sup>

In der Proliferationsphase erfolgt eine Neubildung der extrazellulären Matrix und eine Vaskularisation des Gewebes beginnt. Eine wichtige Rolle spielt die Anzahl der Zellen und die Ausrichtung und Orientierung dieser in Reihen. Dieser Mechanismus ist eine wichtige Voraussetzung, damit sich das neugebildete Kollagen in längs gerichtete Bündel anordnen kann.<sup>34,35</sup> Nach sechs Wochen steht in der letzten Phase die Umwandlung in ligamentäre Strukturen (*Remodelling*) und die Reifung des Ligaments im Vordergrund. Die Matrix wird dichter und die Anteile an Kollagen I bis III erreichen wieder

ursprüngliche Werte. Es wurde nachgewiesen, dass ein gerissenes ACL weder in seiner morphologischen Struktur noch in seinen biomechanischen Eigenschaften ursprüngliche Werte erreicht.<sup>36</sup> Dies ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Zum einen spielt die Konzentration der Kollagenfibrillen vom Typ I, welche einen hohen Durchmesser besitzen, eine große Rolle.<sup>37</sup> Zum anderen die Fähigkeit dieser Fibrillen untereinander relativ stabile Querverbindungen (*Crosslinks*) auszubilden.<sup>38</sup> Veränderte Eigenschaften neugebildeter Kollagen-typen führen zu einer geringeren Dichte fibrillärer *Crosslinks* und mindern die Stabilität. Weitere Gründe sind eine verändert neugebildete extrazelluläre Matrix mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Proteoglycanen und lokale Faktoren, welche den Heilungsprozess negativ beeinflussen.<sup>39</sup> Andere Studien zu diesem Thema beschäftigten sich mit den Unterschieden zwischen Band-strukturen in Abhängigkeit ihrer anatomischen Lage, zum Beispiel extra- und intraartikulär oder extra- und intrasynovial.<sup>40</sup> Der Hauptgrund für eine unzureichende Ausheilung einer ACL-Ruptur liegt vor allem in einer mangelnden Vaskularisation während der Proliferationsphase.<sup>41,42</sup> Große Zellverluste und veränderte metabolische Prozesse sind die entscheidenden Faktoren. Sie werden durch intrinsische und extrinsische Metaboliten und durch die teils umliegende Synovialflüssigkeit beeinflusst.<sup>43</sup> Der Einfluss solcher Faktoren auf immigrierte Zellen verhindert zusammen mit der biomechanischen Komplexität des ACL eine befriedigende Ausheilung.<sup>44</sup>

#### **1.1.4 Mögliche chirurgische Therapieoptionen**

Die vordere Kreuzbandplastik ist die häufigste bandplastische Operation am Bewegungsapparat. Das Ziel hierbei ist eine vollständige Wiederherstellung der Funktionen eines nativen Kreuzbandes. Über den Operationszeitpunkt gibt es bis heute noch kontroverse Meinungen. Bei gesicherter Diagnose besteht die Möglichkeit einer Rekonstruktion noch innerhalb der ersten 60 Stunden. Zu betonen sind die sozioökonomischen Vorteile einer frühen Intervention wie geringere Krankenhaus- und Rehabilitationskosten, eine kürzere Berufsunfähigkeit oder eine frühere Rückkehr in den Leistungssport.<sup>45</sup> Auch konnten bessere klinische Testwerte hinsichtlich Laxizität und Stabilität festgestellt

werden.<sup>46</sup> Ein operativer Eingriff in der subakuten Phase erhöht hingegen die Inzidenz einer postoperativen Bewegungseinschränkung. Eine weitere Möglichkeit ist, die Operation nach Abklingen des akuten Reizzustandes mit wiedererlangter Beweglichkeit im Kniegelenk durchzuführen. Der Zeitpunkt sollte drei bis sechs Wochen nach Verletzung gewählt werden. Auch hier konnten verbesserte Ergebnisse im Hinblick auf chronische Langzeitverletzungen gezeigt werden.<sup>47</sup>

Heute haben sich in der Kreuzbandchirurgie vor allem zwei arthroskopische Verfahren mit autologen Sehnentransplantaten etabliert. Einerseits besteht die Möglichkeit die Sehnen des M. semitendinosus und M. gracilis (*Semitendinosus-Ersatzplastik, ST-Ersatzplastik*), andererseits können Teile der Patellarsehne (*Bone-Patella-Tendon-Bone-Technik, BPTB-Technik*) als Transplantat verwendet werden. Unabhängig von der Operationsmethode ist es das Ziel, eine möglichst effiziente biologische Verbindung zwischen Transplantat und Knochen zu erreichen. Dies gewährleistet eine optimale ossäre Transplantatintegration, welche die Lebensdauer des Transplantats beeinflusst. Beide möglichen Operationsvarianten unterscheiden sich wesentlich hinsichtlich ihrer Entnahmetechnik, der damit verbundenen Entnahmemorbidität, der Operationsmethode und ihrer biomechanischen und histologischen Eigenschaften.

Die Vorteile der *BPTB-Technik* liegen in einer variierenden Transplantatbreite, einer leichten Entnahmetechnik und der Möglichkeit einer festen Verankerung mit Knochenblöcken. Der Eingriff verursacht hingegen eine erhebliche Schwächung des Streckapparates. Die Gefahren einer Patellarfraktur oder einer Patellarsehnenruptur sind ebenso gegeben wie Einschränkungen im femopatellaren Gelenk. Hinzu kommt die Frakturgefahr des tibial entnommenen Knochenblocks. Patienten mit knienden Tätigkeiten im Alltag ist von dieser Variante abzuraten.

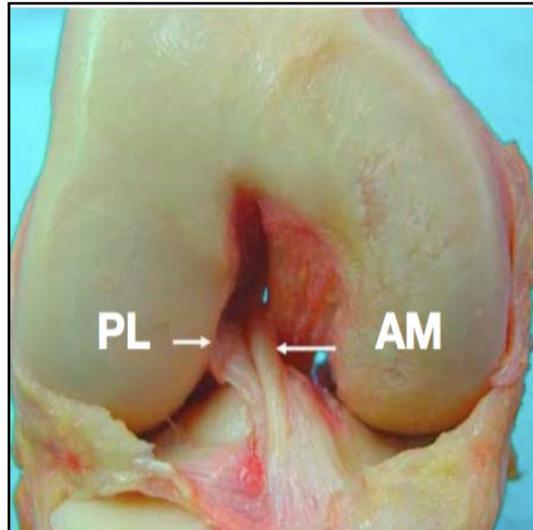
Die Vorteile einer *ST-Ersatzplastik* sind die geringere Entnahmemorbidität, die einfachere Fixierung und ein kleinerer, kosmetischer Schnitt. Mit einer Doppelung der Semitendinosussehne können die Eigenschaften der anatomischen Bündelstruktur des nativen Kreuzbandes besser imitiert und höhere Kraftwerte simuliert werden. Oft wird aufgrund einer zu dünnen Bandstruktur die

Sehne des M. gracilis hinzugenommen, so dass das Konstrukt vierfach gelegt wird. Als Nachteil können die aufwendigere Entnahme und die länger andauernde ossäre Transplantatintegration aufgeführt werden. Weiterhin muss intraoperativ damit gerechnet werden beide Sehnen als Transplantat zu verwenden. Im Vergleich beider Varianten konnte gezeigt werden, dass bei der ST-Ersatzplastik höhere Kraftmaxima im Bereich der Knieextensoren zu finden sind. Dies ist auf eine Traumatisierung der Patella bei der *BPTB*-Technik zurückzuführen. Auch im Vergleich von betroffener und nicht betroffener Seite schneidet die *BPTB*-Technik schlechter ab. Die Patienten zeigten deutliche Kraftunterschiede, während Patienten mit ST-Plastik eine deutlich schnellere Regeneration ihrer Maximalkraft vorweisen konnten.<sup>48</sup>

Unabhängig von der Operationsvariante kann es zu Komplikationen wie Transplantatinsuffizienz, Bewegungseinschränkungen, beschleunigte Arthrosebildung, propriozeptive Insuffizienz oder Zyklopbildung kommen. Auch die Gefahr der Entwicklung eines intraartikulären Infektes muss in Betracht gezogen werden.

## **1.2 Anatomie des vorderen Kreuzbandes**

Das ACL entspringt fächerförmig an der Innenfläche des Condylus lateralis ossis femoris und verläuft schräg nach ventro-medial zur Area intercondylaris tibiae. Die freie Länge variiert zwischen 27 und 32 mm. Der Querschnitt ist im mittleren Drittel am kleinsten und nimmt proximal und distal zu. Obwohl es vom Gelenkbinnenraum durch einen Synovialüberzug getrennt ist, wird es klinisch als intrakapsuläres Band eingeordnet.<sup>49</sup> Das ACL besteht aus mehreren Faserbündeln, welche umeinander rotieren.<sup>50</sup> Diese lassen sich hauptsächlich in ein antero-mediales (AM) und ein postero-laterales Bündel (PL) unterteilen. Die femoro-cranial entspringenden Fasern inserieren im antero-medialen Anteil, die femoro-caudalen Anteile im postero-lateralen Teil der tibialen Insertionszone. Folgende Abb. 1 zeigt den Blick auf beide Bündel in einem eröffneten Kniegelenk.



**Abb. 1:** Eröffnetes rechtes Kniegelenk, Ansicht von anterior auf das antero-mediale (AM) und postero-laterale (PL) Bündel, Patella und Gelenkkapsel entfernt (aus Zantop et al., 2009).

Das ACL besteht mehrheitlich aus straffem Bindegewebe. Kollagenfibrillen vom Typ I stellen mit 90% den Hauptanteil dar. Sie verlaufen in Zugrichtung zur Längsachse des ACL und werden von Kollagenfibrillen vom Typ III zu Bündeln zusammengefasst. Kollagen I ist vor allem für die Zugfestigkeit des Bandes verantwortlich, während Kollagen III für die Viskoelastizität und den Schutz der Vaskularisation zuständig ist. An den Insertionszonen befinden sich in Reihen angeordnete Knorpelzellen. Hier fehlt die Synovia und das Gewebe des ACL ähnelt dem Aufbau von Faserknorpel. Zwischen den Kollagenfibrillen sind perlschnurartig Fibroblasten eingelagert, welche den Auf- und Abbau der Extrazellulärschubstanz regulieren. Ansonsten finden sich zwischen den Fibrillen extrazelluläre Komponenten wie Elastin, Proteoglykane oder Glykoproteine.<sup>51</sup>

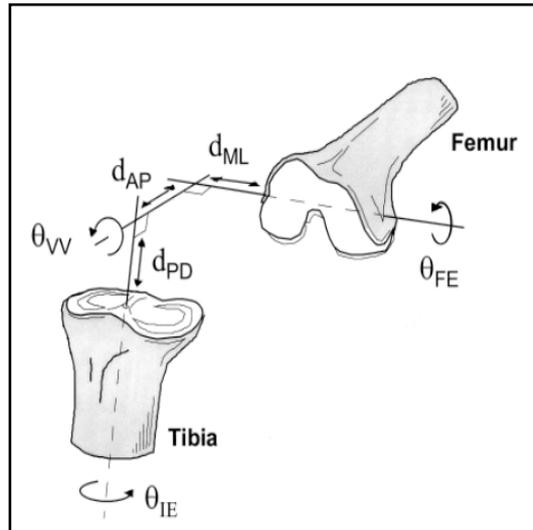
Die femoralen und tibialen Insertionszonen entsprechen denen chondraler-apophysärer Bandansätze. Dort befinden sich die für die Kinematik des Kniegelenks zuständigen Mechanorezeptoren. Im Bandgewebe selbst befinden sich Ruffini- und Pacinikörperchen, Golgi-Sehnenorgane und freie Nervenendigungen. Sie registrieren den Spannungszustand der Bänder, den intra-

artikulären Druck, die Knieposition und Schmerzreize.<sup>52</sup> Die Gefäßversorgung erfolgt durch Endäste der Arteria genus media und Arteriae genus inferiores am proximalen beziehungsweise am distalen Pol. Diese bilden dichte, periligamentäre Netzwerke aus denen kleine Äste in das ACL ziehen. An den Insertionszonen befinden sich avaskuläre Zonen.

### **1.3 Biomechanik im Kniegelenk**

Die Hauptfunktion der Bänder im Kniegelenk besteht im Führen eines komplizierten Bewegungsmechanismus. Einerseits gewährleisten sie in einem funktionellen Zusammenspiel den Kontakt der femoralen und tibialen Gelenkflächen und somit die Gelenkbeweglichkeit, andererseits wirken sie bestimmten Kräften entgegen und schränken die Bewegungsfreiheit ein. Bewegungen in einer Ebene kommen im Kniegelenk praktisch nicht vor, so dass Translations- (distal-proximal, anterior-posterior, medial-lateral) und Rotationsbewegungen um verschiedene Achsen (sagittal, horizontal, frontal) grundsätzlich aneinander gekoppelt sind. Der Grad der Kopplung ist stark von der Belastung im Knie abhängig. Bei unbelasteter Flexion oder Extension findet nahezu keine Tibiarotation statt, während schon bei einer geringen Kraft von axial oder anterior zusätzlich zur Flexion auch eine Innenrotation stattfindet. Ebenso findet bereits bei einer Extension mit geringer Krafteinwirkung von axial oder posterior eine Aussenrotation statt. Dies ist in der Form der Gelenkflächen begründet. Es bedeutet, dass der tatsächliche Bewegungsablauf im Kniegelenk von der externen Belastung abhängig ist und die Bewegungsachsen schwer zu definieren sind. Bei reiner Flexion ohne Tibiarotation befindet sich die Achse horizontal, bei Rotation ohne Flexion vertikal. Bei einer Kombination befinden sich die Achsen in zur Horizontalen schrägen Ebenen. Eine zusätzliche Valgusbeziehungsweise Varusrotation findet statt. Die anterior-posteriore Translationsbewegung entspricht dem Gleitmechanismus der Femurkondyle.<sup>55</sup>

Die unten aufgeführte Abb. 2 zeigt eine Übersicht über die Achsenverhältnisse im Kniegelenk.



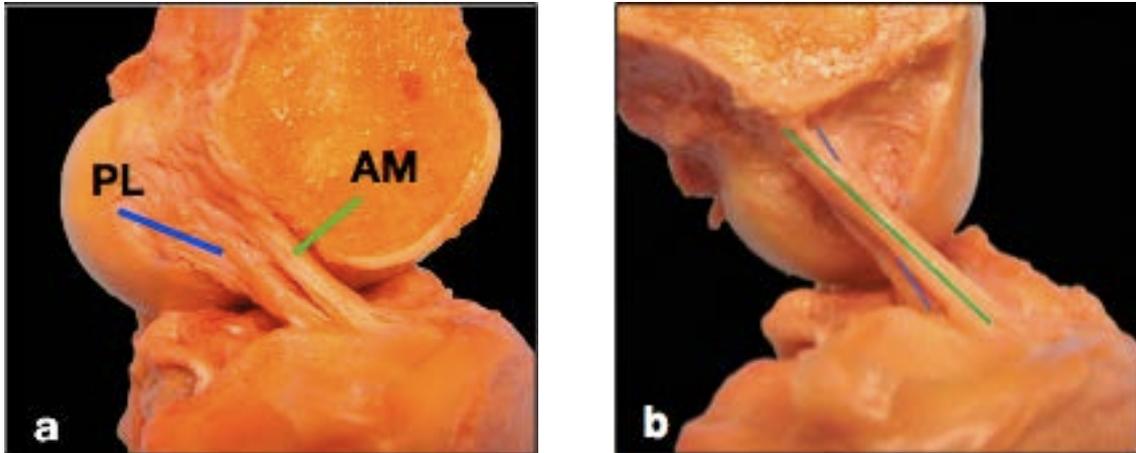
**Abb. 2:** Achsenübersicht im Kniegelenk. Die verschiedenen Achsen im Kniegelenk können in einem Koordinatensystem dargestellt werden. Dieses teilt die Bewegungen im Kniegelenk in sechs anatomische Achsen:

- Translationsbewegungen: Anterior-posterior (AP), medial-lateral (ML), proximal-distal (PD) und
- Rotationsbewegungen: Flexion-Extension (FE), intern-extern (IE) und Varus-Valgus (VV) (aus Woo et al., 2000).

### 1.3.1 Biomechanische Eigenschaften des vorderen Kreuzbandes

Das ACL schützt während der Roll-Gleit-Bewegung vor einer übermäßigen anterioren Translation. Zudem wirkt es gegen varisierende, valgierende und innenrotatorische Kräfte. Das anterior-mediale Bündel liegt näher am Kniedrehpunkt und wird aufgrund seines größeren Bewegungssektors auch als Führungsbündel bezeichnet. Bei 30° Flexion übernimmt es circa 95% der im Gelenk gegebenen Kraft.<sup>56</sup> Die Spannung erhöht sich in zunehmender Flexion mit einem Maximum bei etwa 40° Flexion. Das postero-laterale Bündel wird bei zunehmender Streckung gespannt und dient als Sicherungsbündel besonders für die rotatorische Stabilität. Das Maximum liegt bei etwa 10° Flexion.<sup>53</sup> Durch die Verdrehung der Fasern kommt es während des Bewegungsablaufes von maximaler Flexion zu maximaler Extension zu einer fortwährenden Anspannung der Bündel mit einer Faserelongation von bis zu 3 mm.

Abbildung 3 zeigt die beiden Bündel in Abhängigkeit von Extension und Flexion in einem eröffneten Kniegelenk.



**Abb. 3:** Eröffnetes Kniegelenk in Darstellung der Extension (a) und Flexion (b) von medial. Die mediale Femurkondyle wurde entfernt. Ansicht auf antero-mediales (AM, grün) und postero-laterales (PL, blau) Bündel. Zu sehen ist die Rotation der Fasern und die zunehmende Spannung des AM-Bündels bei Flexion (aus Ziegler et al., 2011).

Die Belastungen des ACL reichen von 67 N beim Treppensteigen, über 630 N während eines Jogginglaufs, bis zu einer maximalen Reißfestigkeit von 1730 N bei starken Belastungen.<sup>54</sup> Das ACL verhält sich wie andere Kollagenstrukturen viskoelastisch. Dies bedeutet, dass es sich bei schneller Belastung steifer verhält als bei langsamer Belastung. Die Viskoelastizität ist stark abhängig von Alter, Mobilität und Trainingszustand des Patienten. Diese Faktoren beeinflussen den Wassergehalt des Kollagens, die die Fasern umgebenden Proteine und deren komplexe Interaktion mit der Grundsubstanz.<sup>51</sup> Auch spielen variable Komponenten wie Vordehnung, Ausrichtung und Rekrutierung der Kollagenfasern für die mechanischen Eigenschaften des ACL eine große Rolle. Unter Rekrutierung versteht man die im Bewegungsablauf zunehmende Anzahl angespannter Kollagenfasern. Dieser Prozess ist sehr wichtig, da er bei einer vorgegebener Anzahl an Kollagenfasern die Kniefunktion bestimmt. Durch die komplexen Achsenverhältnisse im Kniegelenk sind in jedem Stand andere

Fasern angespannt. Die Bänder funktionieren als ein Komplex von Fasern, die in Abhängigkeit von den Bewegungen rekrutiert werden.<sup>82</sup> Die Erkenntnisse über die Rekrutierung spielen auch in den Operationsverfahren eine große Rolle. Wird ein Kreuzbandersatz zu weit anterior befestigt kommt es zu einer übermäßigen Kraftentwicklung und zu einer geringeren Gelenkbeweglichkeit. Ein zu weit posterior gelegenes Band hingegen kann zu Instabilität führen. Der geänderte Bewegungsablauf kann aber auch dazu führen, dass ein falsch positioniertes Bündel nicht zum richtigen Zeitpunkt rekrutiert wird und es zu Kompensationsmechanismen anderer Bänder kommt.<sup>55</sup>

#### **1.4 Tissue Engineering**

Tissue Engineering zielt darauf, die Heilung körperlicher Gewebe zu verbessern und ihre ursprüngliche Funktion wiederzuerlangen. Das Konzept basiert auf der Manipulation von Zellen und deren biochemischen Mediatoren. Es soll die Proteinbiosynthese beeinflussen und die Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur beschleunigen. Mit Hilfe neuer Methoden wie dem Einsatz von Wachstumsfaktoren, Gentransfer, Gentherapie, Zelltherapie oder Trägermaterialien, sowie Methoden der Ingenieurwissenschaften, werden neue Therapiewege eingeschlagen.

Es gibt drei grundsätzliche Prinzipien, die unter dem Begriff Tissue Engineering zusammengefasst werden können:

1. Verwendung dreidimensionaler Trägermaterialien oder Matrizen
2. Einsatz von isolierten, in vitro gezüchteten Zellen
3. Einsatz von Wachstumsfaktoren.

Gerade im Hinblick auf ACL-Allografts gab es schon einige Versuche mit synthetischen Materialien, welche sich jedoch nicht durchsetzen konnten.<sup>55</sup> Eine zu hohe oder zu geringe Steifigkeit, mangelnde Zugfestigkeit oder ischämische Prozesse waren die Gründe. Der Kreuzbandersatz mit Methoden des Tissue Engineering befindet sich noch in der Phase der Grundlagenforschung. Die Schwierigkeit besteht in der Ausbildung einer extrazellulären

Matrix unter schlechten Vaskularisierungsbedingungen, welche in der Lage ist, ein Neoligament mit ausreichender Festigkeit zu bilden. Das ideale ACL-Konstrukt ist eine biokompatible, biologisch abbaubare Trägersubstanz (*Scaffold*) mit minimal inflammatorischen Eigenschaften. In den Punkten Reißfestigkeit, Form und biomechanischem Verhalten ist sie dem ACL ähnlich. Eine verbindende Porosität, auf dessen Grundlage Zellen einwandern und sich neue Strukturen ausbilden können, ohne dass Rupturgefahr besteht, muss gegeben sein. Mit zunehmender Porosität nehmen jedoch wiederum Materialvolumen und Festigkeit ab.<sup>57</sup>

Die klinischen Aspekte eines mit Tissue Engineering entwickelten ACL-Konstruktes stellen sich wie folgt dar:

1. Geringere Patientenmorbidity durch Schonung autologer Sehnentransplantate
2. Schnellerer Heilungsprozess und geringere Infektionsrate
3. Unmittelbar höhere Kniestabilität
4. Kürzere Operations- und Liegezeiten im Krankenhaus.

Diese Faktoren erlauben den Patienten eine frühzeitigere Rückkehr zu ursprünglichen Belastungen als mit autologen Transplantaten.<sup>58</sup>

Für die Entwicklung eines solchen Konstrukts bedarf es ausreichender Grundlagenforschung mit dem Ausgangsmaterial. Biomechanische Kenntnisse sind ebenso zu erforschen wie die Biokompatibilität einer solchen Substanz. In vitro Versuche können zwar gewisse Eigenschaften simulieren, jedoch erlangt man diese Erkenntnisse erst durch in vivo Versuchsstudien mit Tieren. Durch diese Studien können Antworten auf oben beschriebene, komplexe Fragestellung gegeben werden. Ziel der vorliegende Arbeit war es auf solche Fragen einzugehen und sie zu beantworten.

## **1.5 Fragestellung**

Die Methode des Tissue Engineering hat neue Perspektiven in der Regeneration von traumatisiertem Gewebe des muskuloskelettalen Systems eröffnet.<sup>58</sup> Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung und den biomechanischen Untersuchungen eines Kreuzbandkonstrukts aus biomaterial-basiertem Kollagen I. Zunächst sollten biomechanische Kenntnisse über Kollagen I gewonnen werden, welches aus Ratten isoliert wurde. Die Untersuchungen dienten als Grundlage für die Entwicklung eines ACL-Konstrukts. Dieses sollte bei einem Durchmesser von 8 mm eine Maximalkraft von 1000 N aufweisen.

Im zweiten Teil folgte in einer Tierstudie an 16 *Mini-Pig* Tiermodellen die Implantation der ACL-Konstrukte. Acht Tiere wurden nach sechs Wochen und acht Tiere nach sechs Monaten biomechanischen Tests unterzogen. Das Ziel war eine hohe Maximalkraft zu erhalten. Die Untersuchungen sollten darüber Aufschluss geben, in wie weit ein in vitro hergestelltes ACL-Konstrukt aus Kollagen I nach sechs Wochen, beziehungsweise nach sechs Monaten, zu einem stabilen ACL umgebaut worden ist. Weiterhin sollten Erkenntnisse über das Verhalten eines Kollagen I ACL-Konstrukt im Kniegelenk gewonnen werden.

## **2. Material und Methoden**

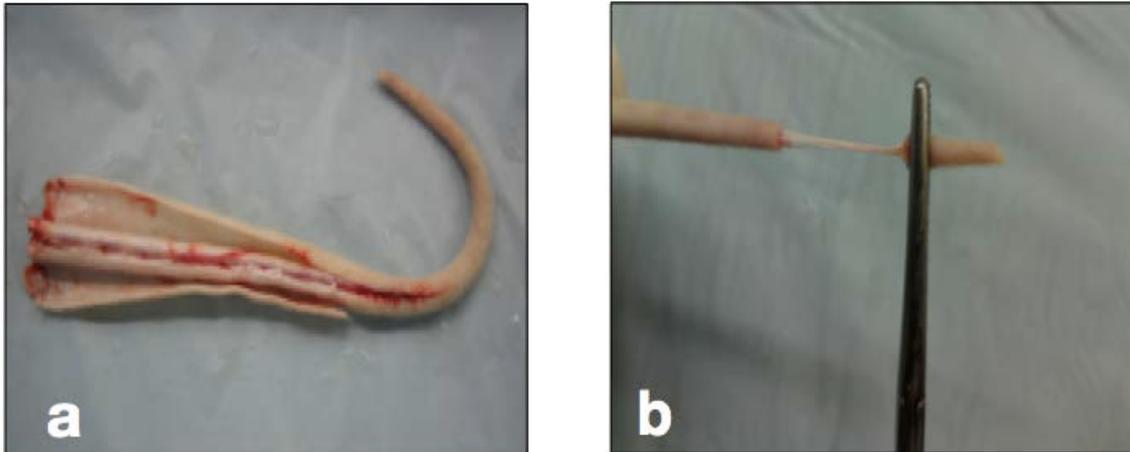
### **2.1 Isolierung von Kollagenfasern**

Für die Entwicklung eines ACL-Konstrukts wurden Kollagenfasern (KF) verwendet, welche aus Rattenschwänzen (RS) isoliert wurden. Die Ratten wurden in einer externen Firma (Charles River, Sulzfeld) gezüchtet. Die RS wurden nach Liefereingang in Chargen eingeteilt. Dies war im Hinblick auf die spätere Qualitätskontrolle wichtig, um Konstrukte einzelnen Chargen zuordnen zu können.

Eine Lieferung enthielt 500 RS und wurde bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Die Isolierung stellte als ersten Arbeitsschritt die Voraussetzungen für das spätere ACL-Konstrukt dar. Die gefrorenen RS wurden erst im Kühlschrank und anschließend in *PBS (phosphate buffered saline)* aufgetaut. Um Überschuss zu vermeiden, wurde nur die benötigte Anzahl aufgetaut. Es wurden zwei

Methoden der Isolation angewandt, benannt Methode *A* und Methode *B*. Bei Methode *A* wurde die Haut der Länge nach eingeritzt und abgezogen. Hier wurde auf die Schnitttiefe geachtet, um die KF nicht zu beschädigen. Die KF, Muskeln und Blutgefäße schimmerten dunkel durch die Haut und durften nicht beschädigt werden. Anschließend wurden hinter den einzelnen Knorpelspangen die KF mit der chirurgischen Pinzette im Bündel unter kräftigem Ziehen herausgelöst.

Da diese Methode mit hohem Kraftaufwand verbunden war und dies die Gefahr der Beschädigung der KF erhöhte, wurde Methode *B* entwickelt und beibehalten. Hier wurde mit einer Arterienklemme, ohne den RS vorher zu enthäuten, das Ende des RS abgeklemmt und so lange rotiert, bis sich die KF lösten und vorsichtig herausgezogen werden konnten. Dieser Schritt wurde wiederholt und die einzelnen Knorpelspangen abgelöst. Man erhielt KF verschiedener Längen, welche sich vorsortieren ließen. Das Restgewebe wurde mit dem Skalpell abgetrennt und mit der Pinzette abgestreift. Die Fasern wurden direkt nach Größe sortiert und in kurze (6-8 cm), mittellange (8-10 cm) und lange Fasern (10-12 cm) eingeteilt. Zu kurze oder zu lange Fasern wurden aussortiert und verworfen. Während dieser Arbeitsschritte wurde auf die ausreichende Benetzung der Fasern mit *PBS* geachtet. Ein Austrocknen der Fasern führte zu irreversiblen Schäden. Die Fasern werden folglich unbrauchbar. Die folgende Abb. 4 zeigt die verschiedenen Methoden der Kollagenisolation.



**Abb. 4:** Isolation der Kollagenfasern aus einem Rattenschwanz. Zu sehen sind die beiden Isolationsmöglichkeiten im Vergleich. Bei Methode A werden die Fasern von cranial durch kräftiges Ziehen isoliert (a), bei Methode B von caudal durch Rotation (b).

Die sortierten Fasern wurden in 50 ml Röhrcchen mit *PBS* gegeben und gekühlt bis zur anschließenden Sterilisation aufbewahrt. Die Röhrcchen wurden mit Datum, Namen, Faserlänge und Chargennummer der RS gekennzeichnet. Die Sterilisation erfolgte in der Sterilbank. Das sterile *PBS* wurde vorsichtig aus den Röhrcchen in ein Becherglas abgegossen. Das Röhrcchen wurde mit 70% Ethanol aufgefüllt und 10 min inkubiert. Durch gelegentliches Schütteln und Umdrehen des Röhrcchens wurde eine vollständige Benetzung des Röhrcchens und der Fasern sichergestellt. Das Ethanol wurde vorsichtig in das Becherglas abgegossen. Um die Fasern von Ethanol zu befreien, wurden sie zweimal mit sterilem *PBS* gewaschen. Anschließend wurden die Röhrcchen mit sterilem *PBS* gefüllt und verschlossen. Die Röhrcchen wurden als steril markiert und bis zur Weiterverarbeitung gekühlt gelagert.

## 2.2 Herstellung von Kollagenfäden

Um ein Konstrukt fertigen zu können, musste eine Verbindung zwischen den einzelnen Fasern hergestellt werden. Zu lange Fasern wurden aussortiert. Die kurzen und mittleren Fasern wurden zuerst mit einer Kraft von 6 N und anschließend mit einer Kraft von 5 N belastet. Die Fasern wurden an den Enden mit den Fingern fixiert und um einen Haken gelegt, welcher mit einem 600 g,

beziehungsweise mit einem 500 g schweren Gewicht verbunden war. Nun wurden diese Gewichte für 2 s mit der Faser hochgehoben. Gerissene Fasern wurden aussortiert.

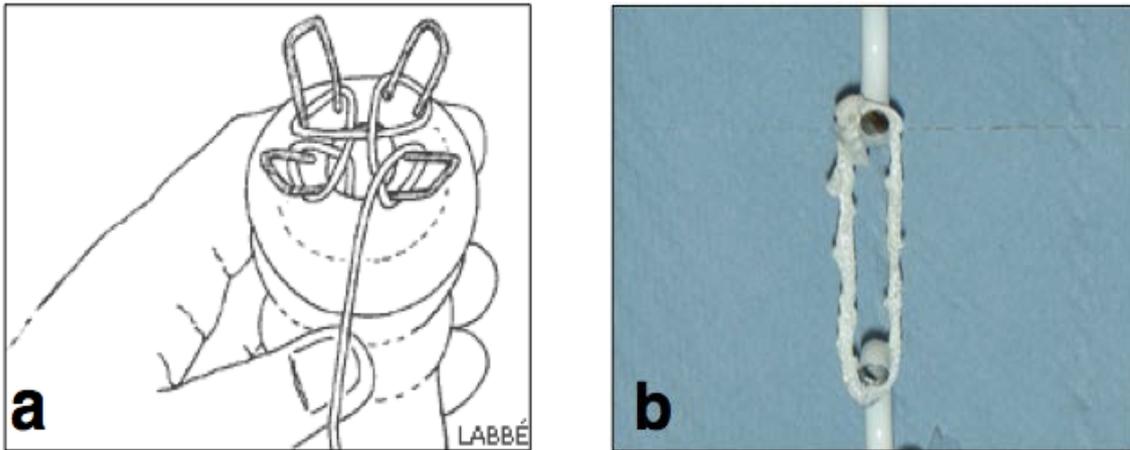
Die Verbindung zweier KF erfolgte mit Hilfe von Knoten. Hierbei wurden die Varianten *A* und *B* unterschieden. Bei Variante *A*, genannt Parallelknoten, wurden zwei Fasern an den Enden gleichlang zusammengelegt und mit einem Knoten verbunden. Ein vorsichtiges Ziehen an beiden Enden festigte diesen. Variante *B* wurde nach dem Prinzip eines einfachen Knotens konstruiert. Es wurden drei Knoten hintereinander gelegt und mit einer anatomischen Pinzette zusammengezogen. Dabei wurde darauf geachtet, den Überstand am Ende des Knotens möglichst gering zu halten, um nicht zu viel Faden zu verwerfen. Jedoch musste ein gewisser Spielraum eingehalten werden, damit sich die Fäden beim Festziehen nicht lösten.

Nach diesem Verfahren wurde ein langer Faden geknotet. Nach vier verbundenen Fäden wurde nochmals ein Zwischentest mit einer Kraft von 2 N eingelegt. Dabei wurde der Faden an den Enden fixiert und um einen Haken gelegt, welcher mit einem 200 g schweren Gewicht verbunden war. Nun hob man dieses Gewicht mit dem Faden für 2 s an. Dieser Test überprüfte die Stabilität der Knoten und sorgte nochmals dafür, dass sich die Knoten festzogen. Auch bei diesem Schritt wurde auf eine ordentliche Benetzung der Fasern geachtet. Der zusammengeknotete Faden wurde auf einer leeren 1 ml Spritze aufgerollt und wie in 2.1 beschrieben sterilisiert.

### **2.3 Herstellung der ACL-Kreuzbandkonstrukte**

Während des Entwicklungsprozesses hatten sich drei Varianten in der Produktion der Konstrukte herauskristallisiert. Nach den Vorgaben wurde anfangs ein Konstrukt in Form einer Kordel, Variante *A*, entwickelt. Aus den Erfahrungen im Umgang mit dem Ausgangsmaterial und den biomechanischen Tests wurde diese Variante schließlich weiterentwickelt und es entstand Variante *B*, genannt Faserbündel. Im weiteren Verlauf setzte sich das Konstrukt mit den besten biomechanischen Eigenschaften durch. Diese Variante *C*, genannt Doppelbündel, wurde später auch in den Tierversuchen verwendet.

Variante A funktioniert nach dem Prinzip einer Strickliesel, wie in folgender Abb. 5 zu sehen. Diese uralte Technik kommt ganz ohne Stricknadeln aus. Zuerst wurde eine Strickliesel entworfen, die für unsere Zwecke dienlich war. Hierbei half die Hülle einer 1 ml Spritze, an dessen oberen Ende außen vier Stecknadeln befestigt wurden. Diese besaßen am Ende einen Stecknadelkopf. Die Nadeln wurden in Form eines Quadrates befestigt. Mit Hilfe einer spitzen Pinzette wurde ein Stück Faden durch das Innere der 1 ml Spritzenhülle geführt, bis unten 5 cm Faden herausschauten. Im Uhrzeigersinn wurde der Faden nun um die Stecknadeln geschlungen und die Spritzenhülle leicht weitergedreht. Der Stecknadelkopf verhinderte das Hinausgleiten der Fäden. Nach einer Umdrehung wurde der Faden vor der nächst liegenden linken Stecknadel geführt. Der Faden verlief über den Zeigefinger zum Mittelfinger und das herunterhängende Ende wurde zwischen Ringfinger und kleinem Finger gestrafft. Mit der spitzen Pinzette wurde die untere Schlinge aufgenommen. Der Faden wurde immer stramm gehalten. Die Schlinge wurde über den Faden und über den Stecknadelkopf gehoben und nach hinten fallen gelassen. Die Spritzenhülle wurde eine Vierteldrehung bis zur nächsten Stecknadel weitergedreht. Wieder wurde die Schlinge über Faden und Stecknadelkopf gehoben und weitergedreht. Nach ein paar Umdrehungen wurde leicht an dem unteren Fadenende gezogen, um die entstehende Kordel zu straffen. Diese Prozedur wiederholte sich so lange, bis eine Kordel von circa 20 cm Länge gefertigt wurde. Zum Schluss wurde der Faden durch alle vier auf den Stecknadeln verbliebenen Schlingen gezogen, um die Kordel zu verschließen. Während all dieser Arbeitsschritte war es wichtig die ausreichende Benetzung der entstehenden Kordel und des benutzten Fadens zu sichern. Aus diesem Grund wurde mit einer 1 ml Spritze alle 1 bis 2 min *PBS* von oben in die Apparatur und auf den Faden geträpfelt, um auch den Teil der Kordel zu erreichen, welcher sich innerhalb der Apparatur befand. Abbildung 5 zeigt die Entstehung von Variante A und ein fertiges Konstrukt.



**Abb. 5:** Entwicklung der ACL-Konstruktvariante A. Zu sehen ist das Modell einer Strickliesel (a) und ein gefertigtes ACL-Konstrukt der Variante A (b) während einer biomechanischen Messung wie in 2.4 beschrieben (aus <http://shop.labbe.de/techniken/naehen-weben-sticken/strickliesel.html>).

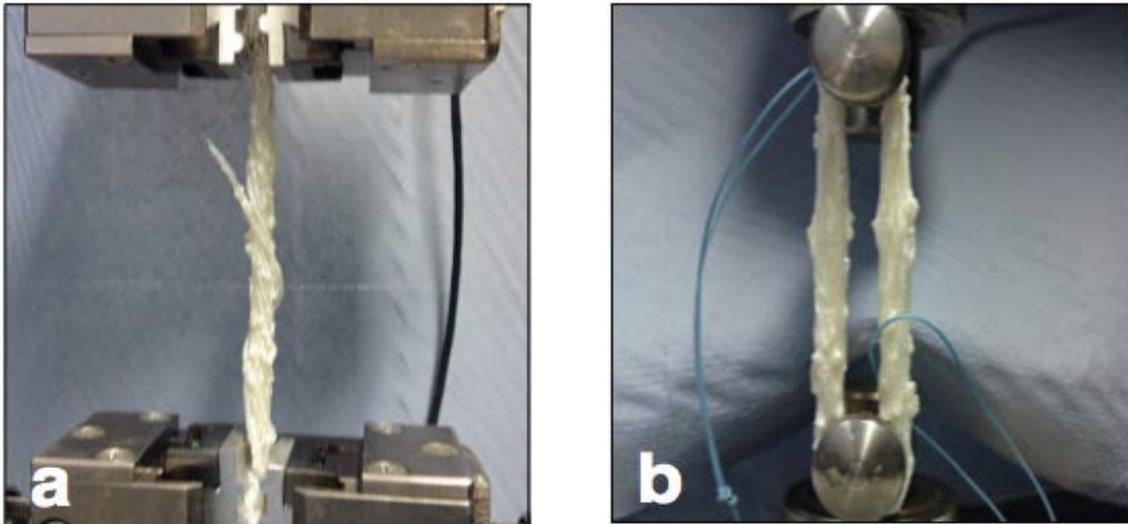
Variante *B*, genannt Faserbündel, orientierte sich an dem Konstruktionsprinzip eines Stahlseils. Dieses wird aus vielen Einzelfäden konstruiert, welche umeinander rotieren. Es wurden zehn Einzelfäden mit einer Länge von 10 cm nebeneinander zusammengefasst, an den Enden mit einem Parallelknoten verbunden und verdreht. Anschließend wurden wiederum drei solcher Bündel miteinander verdreht und an den Enden verknotet. Dieser Zwischenschritt wurde Strang genannt. Um ein Faserbündel zu erhalten, verdrehte man nun 20 solcher Stränge miteinander und verknotete sie an beiden Enden.

Die Entwicklung der ACL-Konstruktvariante *C* basiert auf den Ergebnissen der biomechanischen Messungen von Variante *A* und *B*. Zudem wurde im Hinblick auf die Tierstudie auf die Anatomie der Versuchstiere geachtet. Die Vorgaben waren ein 4 mm dickes und 4 cm langes Konstrukt zu fertigen. Um die Gleichmäßigkeit der Konstrukte zu gewährleisten, wurde eine Halterung entwickelt. Sie bestand aus zwei 10 ml Spritzenhüllen. In diese wurden im Abstand von 3 cm zwei dünne Löcher gebohrt. Darin befestigt wurden zwei Plastikstäbe mit 8 cm Länge, so dass die Halterung aus zwei runden Stäben bestand, welche einen Abstand von 8 cm zueinander besaßen. Nun konnten die Fäden um diese Halterung gewickelt werden. Das Konstrukt hatte eine

gleichmäßige Länge von 8 cm. Nach 15 Wicklungen wurden ein Durchmesser von 2 mm erreicht und die beiden Enden der Fäden wurden wie in 2.2 beschrieben verknotet. Um ein doppelbündiges Konstrukt zu erhalten, wurden die gewickelten Fäden halbiert und um die Halterung gelegt. Anfangs wurden die Fäden parallel gewickelt und diese Form des Konstrukts beibehalten, später schließlich umeinander verdreht.

Die Parallelwicklung wurde im Hinblick auf die anatomische Form des ACL weiterentwickelt. Hierbei wurde das 8 cm lange Konstrukt viermal gedreht und um die Halterung gelegt. Sie bestand wieder aus zwei Plastikstäben mit einem Abstand von 4 cm, um welche die Schlaufen des Doppelbündels gelegt wurden. Dieses war nun 4 cm lang, hatte einen Durchmesser von 4 mm und bestand aus zwei Bündeln. Zur Überprüfung des Durchmessers wurde das Konstrukt durch eine 4 mm Lochplatte geführt, welche den Bohrkanal im Knochen simulierte. Anschließend wurde es in ein 50 ml Tube mit *PBS* gefüllt, aufbewahrt und noch am selben Tag wie in 2.1 sterilisiert. Auf den Tubes wurden Eigenschaften des Konstrukts wie Dicke, Länge, Chargennummer der Fasern, Fertigungsdatum und Hersteller mit Namen vermerkt. Abbildung 6 zeigt die Konstruktvarianten *B* und *C* während einer biomechanischen Messung.

Im Hinblick auf die anstehenden Tierversuche wurden die dafür vorgesehenen Konstrukte zusätzlich einer Gamma-Sterilisation (BBF Sterilisationservice GmbH, Kernen) unterzogen. Die Methode bietet sich bei Medizinprodukten mit hoher Dichte und Volumen an, da sie ein hohes Durchdringungsvermögen und eine hohe Dosishomogenität besitzt. Das Verfahren sichert die Qualität des Konstrukts im Hinblick auf die Vermeidung der Kontamination mit Mikroorganismen und Viren.



**Abb. 6:** ACL-Konstruktvarianten *B* und *C* während einer biomechanischen Messung. Zu sehen ist die rotierende Struktur der Kollagenfasern bei Variante *B* und die Aufhängung zwischen den Spannbacken (a), sowie im Vergleich die parallel gewickelte Struktur bei Variante *C* mit der Aufhängung an zwei Bolzen (b). Die biomechanische Messung ist in 2.4 beschrieben.

## 2.4 Die biomechanischen Messungen

Die Messungen der Fasern, Fäden und Konstrukte fanden in der Zahnklinik, Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde (Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll) an der Materialprüfmaschine Z010 der Firma Zwick Roell AG statt. Die Haltevorrichtungen richteten sich nach den zu messenden Fasern, Fäden oder Konstrukten. Die Fasern, Fäden und Konstruktvarianten *A* und *B* wurden zwischen zwei Spannbacken festgeklemmt. Konstruktvariante *C* wurde an den Enden mit den Schlaufen um zwei Bolzen gelegt und gespannt. Die Zwick wurde auf eine Spannung von 1 N bei Kollagenfasern und Fäden und von 5 N bei den Konstruktvarianten vorgefahren. Die Testobjekte wurden mit einer Geschwindigkeit von 30 mm/min auseinander gezogen. Anschließend wurde die Maximalkraft bestimmt.

Aufgrund der Ungleichmäßigkeit der Kollagenfasern und der Konstrukte an sich kann der Vergleich der Konstruktvarianten *A*, *B* und *C* nur über die Spannung vorgenommen werden. Die Spannung  $\delta$  bezieht sich auf die Kraft pro Fläche und hat die Einheit  $\text{N}/\text{mm}^2$  oder MPa. Die Messung des Durchmessers wurde

bei Variante A und B mit dem Messschieber und bei Variante C zusätzlich mit der Lochplatte vorgenommen. Als Zielwert wurde eine Kraft von 1000 N vorgegeben. In Betracht auf ein zukünftiges Humankonstrukt mit dem Durchmesser 8 mm beträgt die Spannung  $19,9 \text{ N/mm}^2$ , wobei

$$\sigma = F/A \text{ und } A = d^2 \times \pi / 4$$

ist. Anhand dieser Vorgaben wurde ein ACL-Konstrukt entwickelt, welches diesen Anforderungen entsprach und auch für die Tierstudie geeignet war.

## 2.5 Die Tierstudie

ACL-Konstruktvariante C wurde schließlich in *Mini-Pigs* implantiert. Das Studiendesign umfasste insgesamt 32 Tiere, je 16 Tiere für die Biomechanik und für die Histologie. Schließlich wurden die Tiere nochmals in acht 6-Wochentiere und acht 6-Monatstiere unterteilt. Acht Tiere wurden nach sechs Wochen euthanasiert, die anderen acht Tiere sechs Monate postoperativ. Aus jedem Studientier wurden die gesunden Hinterläufe zur Kontrolle verwendet. Das ACL-Konstrukt wurde in das rechte Kniegelenk implantiert, das native ACL des linken Kniegelenks wurde als Kontrolle verwendet.

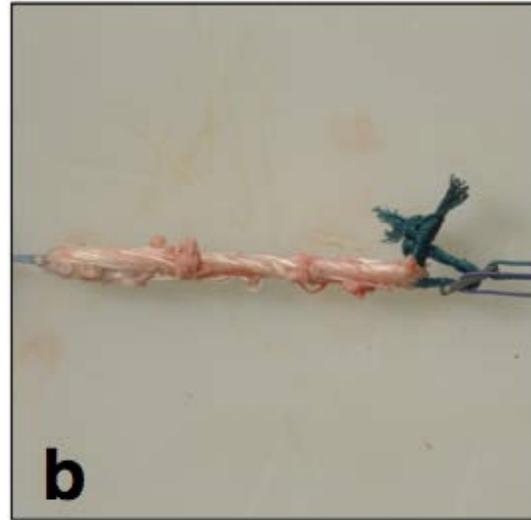
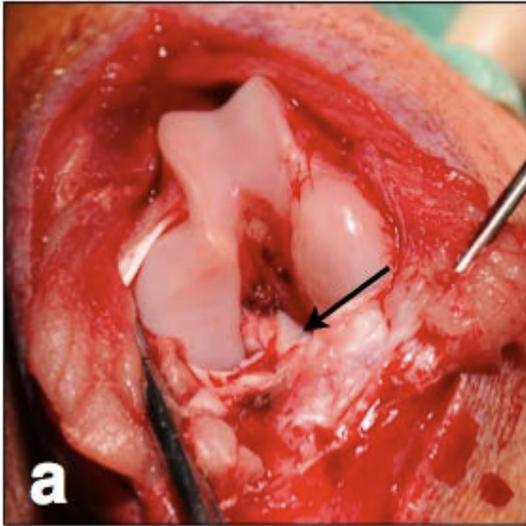
Die Operationen fanden im ZEMM, Zentrum für experimentelle Medizin, der Universitätsklinik Würzburg statt. Zu einem Operationsteam gehörten ein Operateur, ein Assistent, ein OP-Pfleger und eine Tierärztin. Die Operationen fanden unter ähnlichen Bedingungen wie bei humanen Operationen statt. Das narkotisierte Versuchstier wurde auf einen Operationstisch gehoben und auf den Rücken gelagert. Die Hinter- und Vorderläufe wurden am Tisch fixiert. Der zu operierende rechte Hinterlauf wurde rasiert und in mehreren Schritten mit Iod desinfiziert. Über den Huf wurde ein steriler Handschuh gezogen und mit Folien abgeklebt. Anschließend wurde das Versuchstier mit OP-Tüchern abgedeckt. Hierbei wurde extrem auf optimale die Sterilität geachtet.

### 2.5.1 Der chirurgische Eingriff

Der 10 cm lange Hautschnitt wurde mit einem Hautmesser durchgeführt und verlief von cranial nach caudal über dem Kniegelenk. Nach ausreichender Blutstillung wurde die Gelenkkapsel von medial eröffnet und die Patella nach lateral luxiert. Unter ständiger Blutstillung wurde mit der Präparierschere der Gelenkspalt eröffnet, der Hoffa'sche Fettkörper dargestellt und teilweise reseziert. Der Gelenkspalt wurde mit Blick auf das vordere Kreuzband dargestellt, wobei das Knie in einem Winkel von 90° gehalten wurde. Mit einer Klemme wurde das ACL mittig umfasst und das caudale und craniale Ende knochenah mit dem Skalpell abgetrennt. Kleine Überreste wurden vorsichtig mit dem scharfen Löffel entfernt. Die Bohrkanäle lagen in der anatomischen Achse des ACL. Mit einem Kirschnerdraht wurde ein tibialer Bohrkanal von 20 mm Länge gesetzt und mit einem kanülierten 3,5 mm Bohrer erweitert. Der Bohrkanal verlief von medio-caudal, etwa 4 cm unter dem Tibiaplateau, zum Ansatzpunkt des ACL. Der Winkel zur tibialen Längsachse betrug 20°. Ausgehend vom Ursprung des ACL wurde ein femoraler Bohrkanal mit Hilfe eines Kirschnerdrahtes gebohrt, diesmal von intraartikulär in Richtung cranio-lateral. Die Länge betrug 20 mm und der Winkel zur femoralen Längsachse 20°. Der Kirschnerdraht wurde mit einem 3,5 mm kanülierten Bohrer überbohrt.

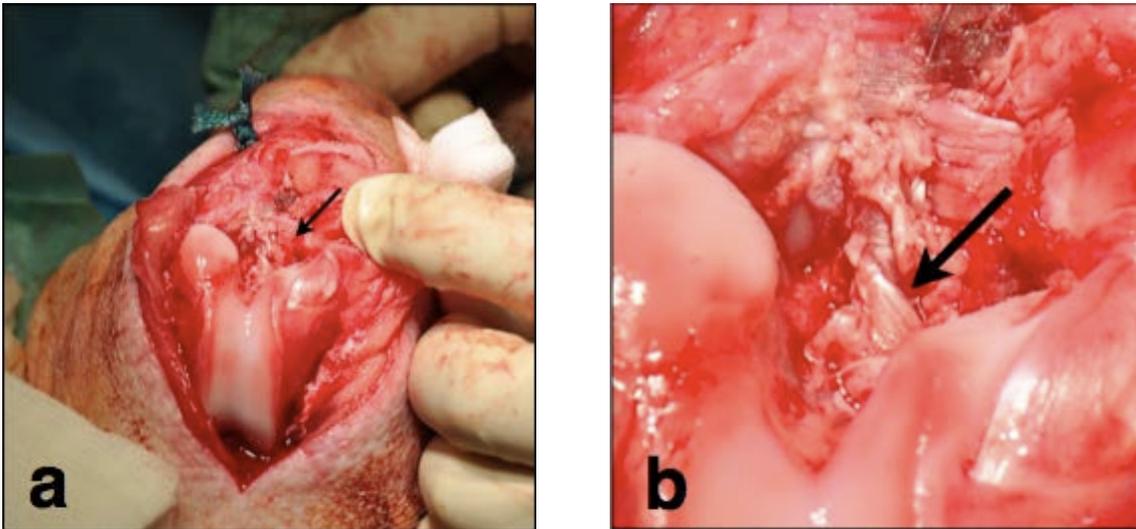
Das ACL-Konstrukt wurde auf einem separaten Beistelltisch präpariert und durch die Schlaufen an beiden Enden eine Surgical-Loop (Braun, Melsungen) gezogen. Am cranialen Ende wurde mit einem Abstand von 10 mm ein Endobutton (Arthrex, Karlstedt) angebracht und mit einem dreifachen Knoten fixiert. Durch den Endobutton wurde ein Faden Ethibond® (3/0), (Johnson & Johnson, Norderstedt) gezogen. Das caudale Ende wurde freigelassen, um später das Konstrukt unter Zug einspannen zu können.

Abbildung 7 zeigt intraoperative Bilder der eröffneten Gelenkhöhle eines *Mini-Pigs* und eines präparierten ACL-Konstrukts.



**Abb. 7:** Intraoperativer Blick auf die eröffnete Gelenkhöhle eines *Mini-Pigs*. Zu sehen sind das native ACL vor Entnahme (a) und das frisch präparierte ACL-Konstrukt vor der Implantation (b).

Das craniale Ende des ACL-Konstrukts wurde mit Hilfe eines Kirschnerdrahtes, an dessen Ende sich eine Öse befand, durch den femoralen Bohrkanal gezogen. Hierbei wurde der Ethibondfaden durch den Kirschnerdraht gezogen und der Draht von intraartikulär nach cranial durch den femoralen Bohrkanal geschoben. Durch ein leichtes Flippen und eine Arretierung beim Gegenziehen wurde sichergestellt, dass sich der Endobutton quer über das Bohrloch gelegt hatte. Ähnlich wurde mit dem tibialen Ende des Konstruktes verfahren. Mit dem Kirschnerdraht wurde es von intraartikulär durch den Bohrkanal nach caudal gezogen. An dem Ende der Surgical-Loop befestigte der Operateur einen Endobutton. Das Kniegelenk des *Mini-Pig* wurde in einem 30° Winkel arretiert und die Surgical-Loop gespannt. Anschließend wurde der Endobutton mit einem dreifachen Knoten quer über dem Bohrloch der Tibia fixiert. Wichtig war dabei auf eine ausreichende Spannung des ACL-Konstrukts zu achten. Die knöcherne Verbindung tibial und femoral betrug 1 mm und die freie Länge intraartikulär 2 mm. In Abb. 8 ist die eröffnete Gelenkhöhle mit einem implantierten Konstrukt zu sehen.



**Abb. 8:** Intraoperativer Blick von cranial auf die eröffnete Gelenkhöhle eines Mini-Pig. Zu sehen sind das implantierte ACL-Konstrukt (a) und das implantierte ACL-Konstrukt in 4-facher Vergrößerung (b).

Die Patella wurde wieder in ihr physiologisches Gleitlager zurück geklappt und der Bewegungsmechanismus auf pathologische Zeichen überprüft. Die Kapsel, Faszien und subkutane Hautnaht wurden mit 1 mm Vicryl® versorgt (Johnson & Johnson, Norderstedt). Die Haut wurde mit einem Manipler (Braun, Melsungen) verschlossen und Sprühpflaster (Beiersdorf, Hamburg) aufgebracht. Auf den sorgfältigen Verschluss der Schnittländer wurde besonders geachtet, um späteren Infektionen vorzubeugen. Die Tiere standen bis zum Abklingen der Narkose unter strenger Beobachtung. Postoperativ wurden mehrmals täglich Vitalzeichen, Wundränder und Allgemeinzustand der Tiere kontrolliert, zudem wurde postoperativ drei Tage Penicillin verabreicht. Die Tiere durften sich frei im Stall bewegen und waren mobil.

### 2.5.2 Präparation der Kadaver

Das Ziel der Präparation war die Freilegung des ACL in der Gelenkhöhle. Alle tragenden und haltenden Strukturen wurden durchtrennt. Die Präparation und

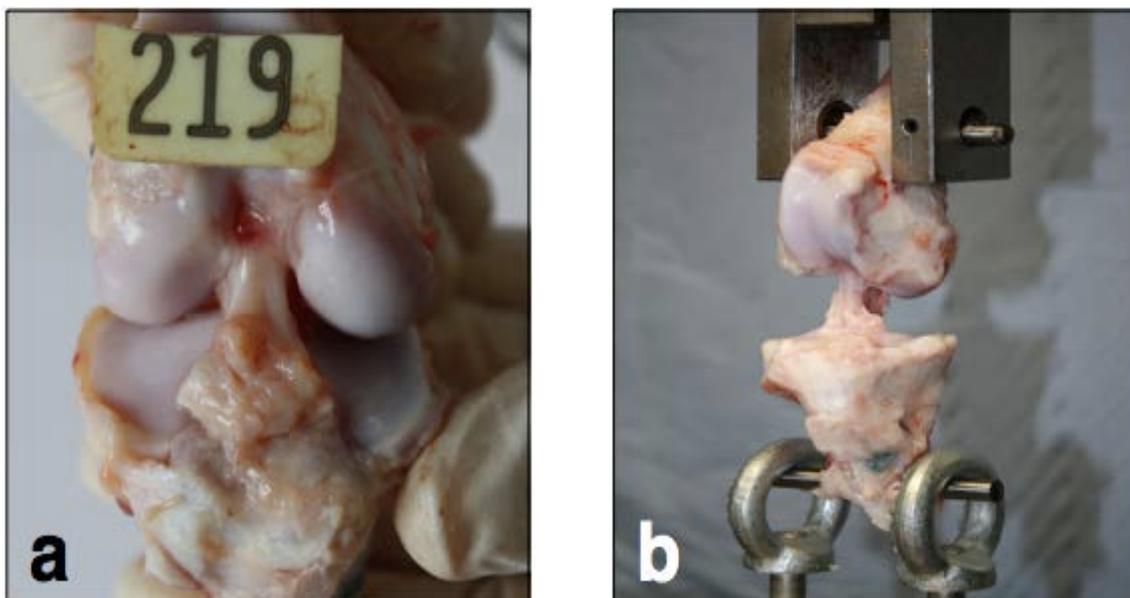
biomechanischen Untersuchungen fanden am gleichen Tag statt. Die Tiere wurden in das MRB Forschungszentrum der Universität Würzburg gebracht. Dort wurde unter Narkose eine MRT-Aufnahme des Kniegelenks gemacht. Die Euthanasierung erfolgte unmittelbar darauf und beide Hinterläufe wurden mit einer Säge vom Kadaver abgetrennt.

Die Kniegelenke wurden in einem Abstand von 10 cm nach cranial und caudal herausgelöst. Größere Haut-, Muskel- und Gewebereste wurden entfernt und entsorgt. Anschließend wurden sie in einem Behälter mit NaCl ins Labor transportiert. Dort wurde vorsichtig in den Gelenkspalt präpariert. Ein Horizontalschnitt caudal der Patella durchtrennte die Patellarsehne. Anschließend wurden das Ligamentum collaterale mediale und laterale durchtrennt und entfernt. Die Gelenkkapsel wurde nach cranial geklappt und ebenfalls verworfen. Unter Berücksichtigung des ACL-Konstrukts, beziehungsweise des nativen ACL, wurden der mediale und laterale Meniskus entfernt und die Sprungsehne durchtrennt. Es wurde auf eine saubere Schnittführung mit einer dünnen Skalpellklinge geachtet, um das Band nicht zu schädigen. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde die Synovialschicht, welche die nativen Kreuzbänder überzieht, angehoben. Diese wurde durchtrennt und abgezogen. Durch leichte Innenrotation ließ sich das PCL gut darstellen und vom ACL abgrenzen. Zur Sicherheit wurde eine anatomische Pinzette zwischen beiden Kreuzbändern angebracht und das PCL durchtrennt. Das Gelenk enthielt nach Präparation das native ACL, beziehungsweise das ACL-Konstrukt, welches nun als einzige Struktur die Verbindung zwischen Femur und Tibia darstellte.

### **2.5.3 Biomechanische Untersuchung der Kadaverkniegelenke**

Die biomechanischen Messungen fanden an der Materialprüfungsmaschine Zwick Z010 (Zwick Roell AG, Ulm, Deutschland) in der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde statt. Es wurden bei jedem Tier zusätzlich das linke, native ACL als Kontrollgruppe gemessen. Im Abstand von 5 cm vom Gelenkspalt wurden mit einem 5 mm Bohrer zwei Löcher in Femur und Tibia gebohrt und in diesen zwei 10 cm lange Bolzen befestigt. Sie dienten

der Aufhängung des Kniegelenks in der Maschine. Die Bohrlöcher verliefen horizontal zur femoralen und tibialen Achse. So konnte sich während der Messung kein Rotationsmoment einstellen. An den Bolzen wurde das präparierte Kniegelenk in die Maschine eingespannt und eine Kraft von 5 N eingestellt. Die Maximalkraft wurde bei einer Geschwindigkeit von 30 mm/s ermittelt. Abbildung 9 zeigt ein frei präpariertes ACL-Konstrukt und den Versuchsaufbau der biomechanischen Messungen.



**Abb. 9:** Ansicht von ventral auf das eröffnete Kniegelenk eines *Mini-Pig*. Dargestellt ist ein ACL-Konstrukt nach Präparation mit Versuchstiernummer (a) und ein Kniegelenk mit ACL-Konstrukt während einer biomechanischen Messung (b) wie in 2.5.3 beschrieben.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel und Apple's Numbers. Die Mittelwerte normverteilter Daten wurden durch einen zweiseitigen ungepaarten t-Test verglichen. Die jeweils geltenden Umrechnungen der Ergebnisse der statistischen Methoden auf den gebräuchlichen p-Wert wurden im Anschluss an die Berechnungen durchgeführt. Das

Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha=5\%$  festgelegt. Als marginal signifikant gelten Assoziationen mit einem p-Wert von  $0,05 \leq p \leq 0,1$ , als signifikant ein p-Wert von  $0,01 \leq p \leq 0,05$  und als hochsignifikant Assoziationen mit  $p < 0,01$ .

## **2.7 Materialien**

- Abdecktuch rechteckig mit Klebestreifen
- Aluschale mit Tupfer
- Arterienklemme
- Becherglas (Hartenstein, Würzburg)
- Bohrer steril
- Bohrer kanüliert (3.0, 3.5, 4.0, 4.5) Set
- Elektrokauter
- Ethanol 70%
- Gewicht 200 g
- Gewicht 500 g
- Gewicht 600 g
- Graftmaster® (Arthrex, Karlsfeld)
- Kirschnerdraht mit Öse (Arthrex, Karlsfeld)
- Längenmessgerät (Arthrex, Karlsfeld)
- Lineal (Hartenstein, Würzburg)
- Lochplatte mit Durchmesserangabe
- Löffel scharf
- Manipler® (Braun, Melsungen)
- Materialprüfungsmaschine Z010® (Zwick Roell AG, Ulm)
- Melaminschale weiß
- Mullkompressen (Braun, Melsungen)

- NaCl 0,9% steril und unsteril
- Nadelhalter (Braun, Melsungen)
- Op-Faden Vicryl® (1.0), (Johnson & Johnson, Norderstedt)
- Op-Faden Ethibond® (3/0), (Johnson & Johnson, Norderstedt)
- PBS steril und unsteril (Zusammensetzung 10 l PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Pinzette anatomisch
- Pinzette chirurgisch
- Pinzette spitz
- Polyethylen Green® 3 mm, (Johnson & Johnson, Norderstedt)
- Präparierschere
- Rattenschwänze (Charles River, Sulzfeld)
- Schlauchüberzüge steril (Molnlycke Health Care, Erkrath)
- Schlitztuch (Cardinal Health, Tuttlingen)
- Seralon® OP-Faden (Serag-Wiessner, Nailla)
- Skalpellgriff (Hartenstein, Würzburg)
- Skalpellklinge (Hartenstein, Würzburg)
- Sprühpflaster (Beiersdorf AG, Hamburg)
- Suture Button® 3,5 mm (Arthrex, Karlsfeld)
- Tube 50 ml, Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen)

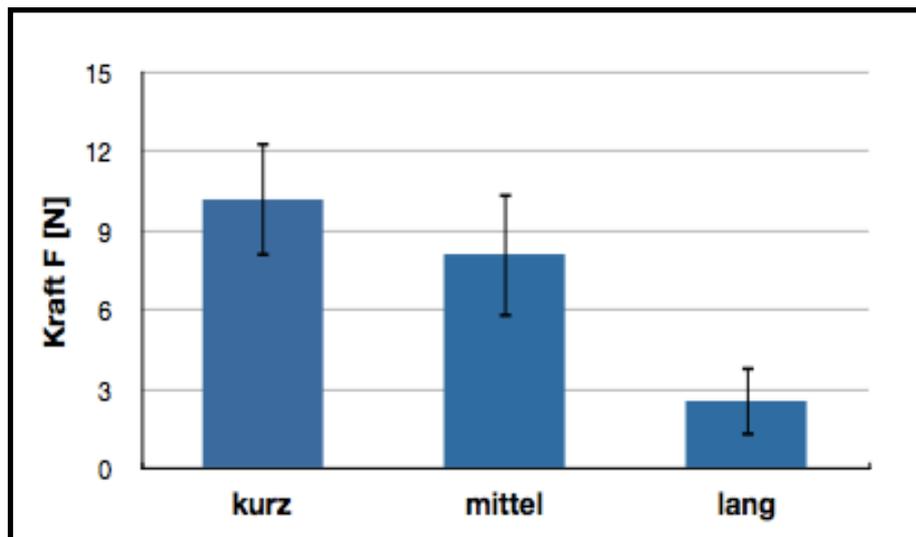
## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Charakterisierung der Kollagenfasern**

Die Isolierung von KF aus Ratten stellt einen neuen Weg der Kollagenverwendung dar. Es wurden zunächst verschiedene biomechanische Tests an KF durchgeführt, um die Eigenschaften dieser besser charakterisieren zu können (siehe 2.4). Die Fasern wurden nach ihrer Isolation in Bezug auf unterschiedliche Gesichtspunkte wie Länge, Geschlecht und Chargen miteinander verglichen.

#### **3.1.1 Vergleich von Kollagenfasern unterschiedlicher Länge**

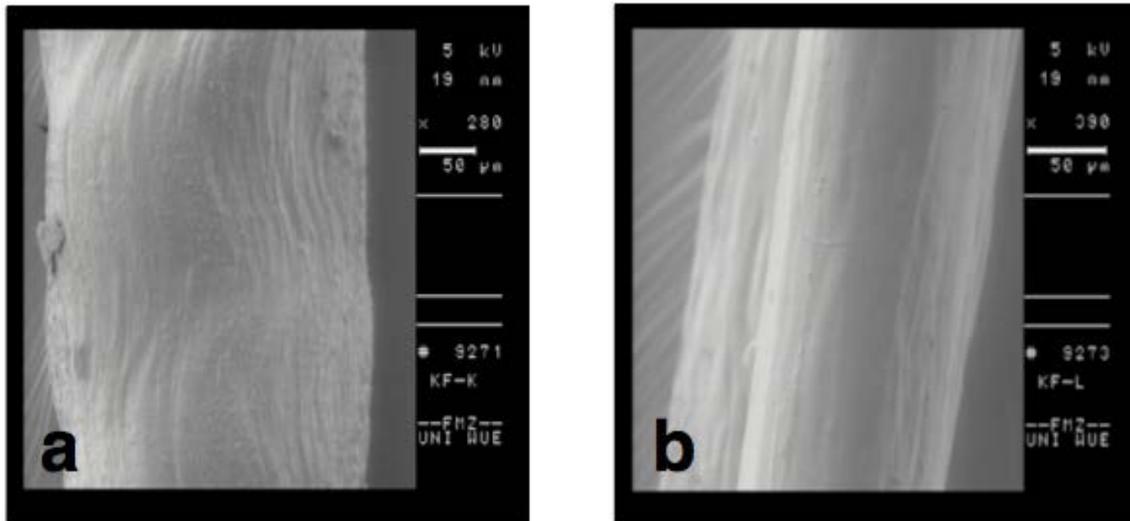
Die isolierten KF wurden anhand ihrer Länge in kurz (6 bis 8 cm), mittellang (8 bis 10 cm) und lang (10 bis 12 cm) eingeteilt, und biomechanisch getestet. Abb. 10 zeigt den Vergleich zwischen den unterschiedlichen Faserlängen in Bezug auf ihre Maximalkraft.



**Abb. 10:** Biomechanische Belastbarkeit von KF im Vergleich. Die Messung von KF erfolgte wie in 2.4 beschrieben. Zu sehen ist die Maximalkraft von Kollagenfasern. Diese sind anhand ihrer Länge in kurze, mittel und lange Fasern eingeteilt (n=40 pro Messgruppe). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die KF zeigten in Abhängigkeit ihrer Länge unterschiedliche biomechanische Eigenschaften. Kurze Fasern erreichten mit Kraftwerten von 10,24 N ( $\pm 2,2$ ) im Mittel die höchsten Werte. Mittlere Fasern kamen auf 8,12 N ( $\pm 2,38$ ) und lange Fasern auf 2,56 N ( $\pm 1,32$ ).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Fasern genauer untersucht. Unter dem Rasterelektronenmikroskop können die Fasern besser veranschaulicht werden. Abb. 11 zeigt einen Vergleich zwischen kurzen und lange Fasern.



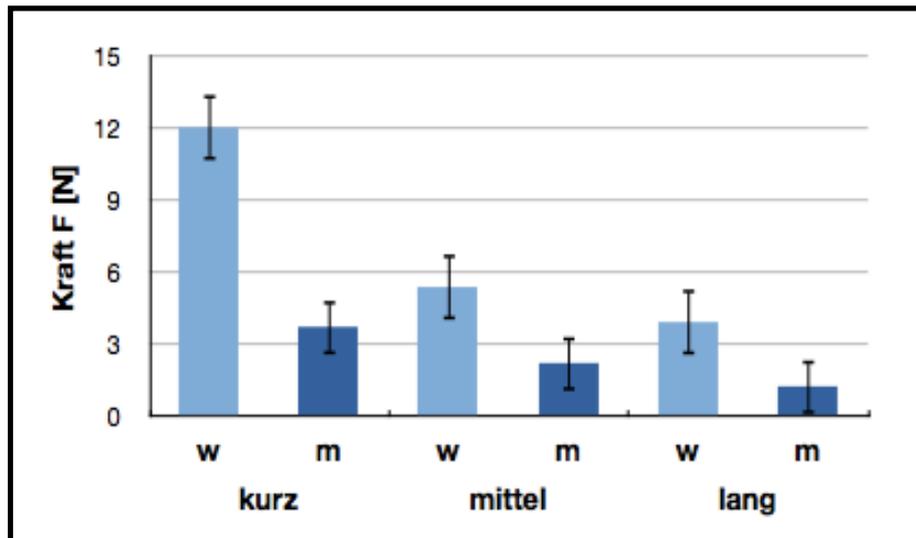
**Abb. 11:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Kollagenfasern. Die Bilder zeigen die unterschiedlichen anatomischen Eigenschaften einer kurzen (a) und einer langen (b) Kollagenfaser.

Abbildung 11 verdeutlicht die anatomischen Unterschiede zwischen beiden Fasern. Die kurze Faser zeigt eine inhomogene, raue Oberfläche. Die Faser scheint kompakter und ist in ihrer Struktur gewellt. Es sind längsgerichtete Faserzüge zu erkennen. Im Durchmesser ist sie mit 315 µm dicker als die lange Faser, welche einen Durchmesser von 185 µm besitzt. Diese wirkt dagegen homogener und gleichmäßiger. Die Oberfläche ist glatt und nicht gewellt.

Um genauere Informationen über die Eigenschaften der KF zu erhalten, wurden in folgenden Versuchen die KF anhand ihres Geschlechts in männliche und weibliche Fasern unterteilt.

### 3.1.2 Vergleich von Kollagenfasern unterschiedlichen Geschlechts

Die KF wurden direkt nach Liefereingang nach Geschlecht getrennt. Nach Isolierung erfolgte eine weitere Unterteilung anhand der Länge. Abbildung 12 zeigt den Vergleich zwischen den Geschlechtern der Tiere und der Länge der KF in Abhängigkeit ihrer Maximalkraft.



**Abb. 12:** Biomechanische Belastbarkeit von KF unterschiedlichen Geschlechts im Vergleich. Die Messung erfolgt wie in 2.4 beschrieben. Unterteilt wurden die Fasern nach Geschlecht in weiblich (w) und männlich (m), sowie nach ihrer Länge in kurze, mittel und lange Fasern (n=10 pro Messgruppe). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Kurze Fasern erreichten sowohl in der männlichen als auch in der weiblichen Versuchsgruppe die höchsten Ergebnisse. Bei weiblichen Tieren lagen die Werte für die Maximalkraft bei 12,03 N ( $\pm 1,36$ ) und für männliche bei 3,72 N ( $\pm 1,15$ ). Mittellange und lange Fasern schnitten in beiden Geschlechtsgruppen schlechter ab. Bei weiblichen Tieren lagen die Werte bei 5,38 N ( $\pm 1,26$ ) für mittellange Fasern und bei 3,91 N ( $\pm 1,07$ ) für kurze Fasern. Bei männlichen Tieren verhielten sich die Ergebnisse ähnlich, sie lagen bei 2,21 N ( $\pm 0,63$ ) für mittellange Fasern und bei 1,24 N ( $\pm 0,40$ ) für lange Fasern. Die Tests zeigten außerdem, dass weibliche Tiere den männlichen in allen Faserlängen überlegen sind. Lange Fasern waren in beiden Geschlechtsgruppen für das Konstrukt unbrauchbar, da die Maximalkraft zu gering ausfiel. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nur noch kurze, weibliche Fasern für die Konstruktentwicklung verwendet.

Die RS wurden in einer Stückzahl von 500 geliefert. Die verschiedenen Lieferungen wurden als Chargen bezeichnet. Zwischen den einzelnen Chargen unterschieden sich die RS optisch in der Größe und nach Geschlecht. Um die

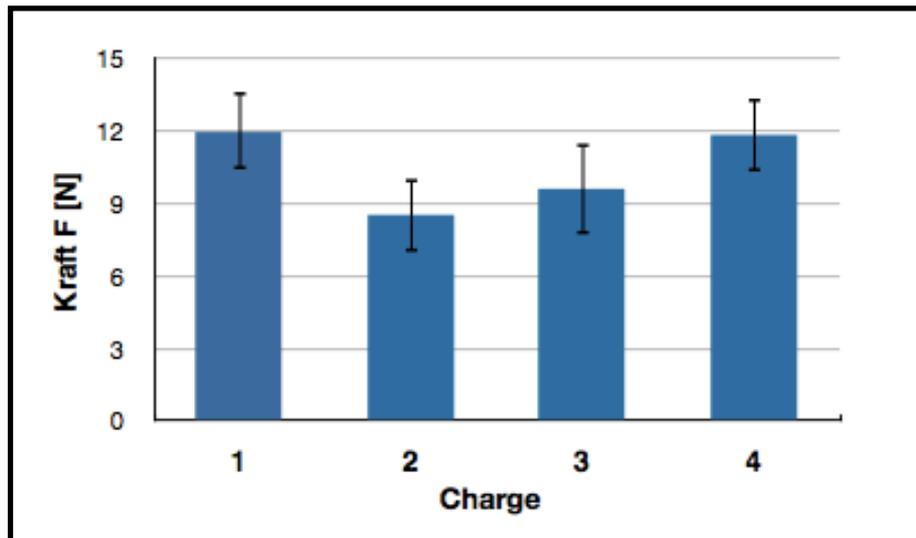
Unterschiede der einzelnen Chargen zu untersuchen wurden folgende biomechanische Versuche durchgeführt.

### **3.1.3 Vergleich von Kollagenfasern aus unterschiedlicher Chargen**

Die verschiedenen Lieferungen (n=500 RS) wurden nummeriert und in Chargen eingeteilt. Alle männlichen RS wurden aussortiert und verworfen. Aus den weiblichen Tieren unterschiedlicher Chargen wurden kurze Fasern isoliert und miteinander verglichen. In den Lieferungen unterschieden sich die RS augenscheinlich in Größe und Dicke. Chargen mit unzureichenden biomechanischen Ergebnissen sollten erfasst und aussortiert werden, bevor man deren Fasern in ACL-Konstrukten verarbeitet.

Die Ergebnisse der Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Chargen sind in unten folgender Abb. 13 dargestellt.

Kurze Fasern der Charge 1 zeigten im Mittel mit 12,03 N ( $\pm 1,61$ ) höhere Werte als kurze Fasern der Charge 2, welche im Mittel einen Wert von 8,53 N ( $\pm 1,53$ ) erreichten. Auch die Chargen 3 (9,61N ( $\pm 1,88$  )) und 4 (11,84 N ( $\pm 1,51$ )) erzielten im Mittel eine geringere Maximalkraft. Aus den Auswertungen wird deutlich, dass nicht nur die Länge und das Geschlecht die biomechanischen Eigenschaften der Fasern beeinflussen, sondern auch die unterschiedlichen Chargen. Nach Auswertung dieser Versuchsreihe wurden Voruntersuchungen chargenspezifisch durchgeführt, um deren Einfluss zu reduzieren. Chargen, welche in Voruntersuchungen zu geringe Werte erzielten wurden aussortiert und nicht für die Entwicklung eines ACL-Konstrukts verwendet.

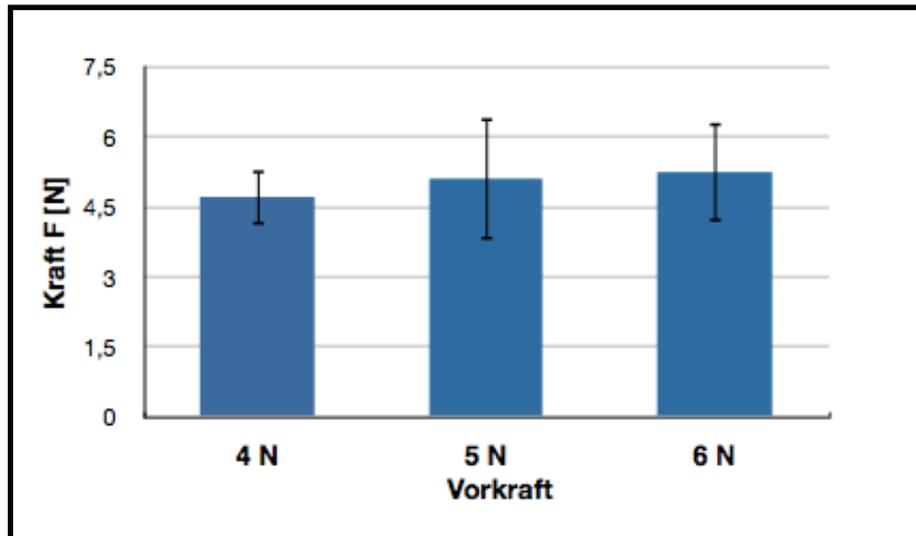


**Abb. 13:** Biomechanische Messung von KF unterschiedlicher Chargen im Vergleich. Die Messung erfolgte wie in 2.4 beschrieben. Getestet wurden ausschließlich kurze Fasern weiblicher Tiere. Die unterschiedlichen Chargen (1 bis 4) sind im Vergleich ihrer Maximalkraft dargestellt (n=10 pro Messgruppe). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Um eine maximale Reißfestigkeit der KF zu gewährleisten und bereits beschädigte Fasern auszusortieren, wurden die Fasern mit verschiedenen Gewichten belastet. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt 3.1.4 dargestellt.

### 3.1.4 Einfluss der Vorkraft auf die Maximalkraft von Kollagenfasern

Kurze Fasern wurden nach der Isolierung mit einer Kraft von 4, 5 und 6 N belastet. Dieser Test diente dem Ausschluss schwacher und beschädigter Fasern. Im Hinblick auf die spätere Konstruktentwicklung sollte die maximale Belastbarkeit kurzer Fasern getestet werden, ohne zu viel Ausschuss zu erhalten. Anschließend wurden mehrere Fasern zu einem Faden verknotet. Nach Zusammenschluss der Fasern wurden die Fäden biomechanisch auf ihre Maximalkraft getestet. Abbildung 14 fasst die Ergebnisse der Belastbarkeit der Fasern und der Knoten zusammen.



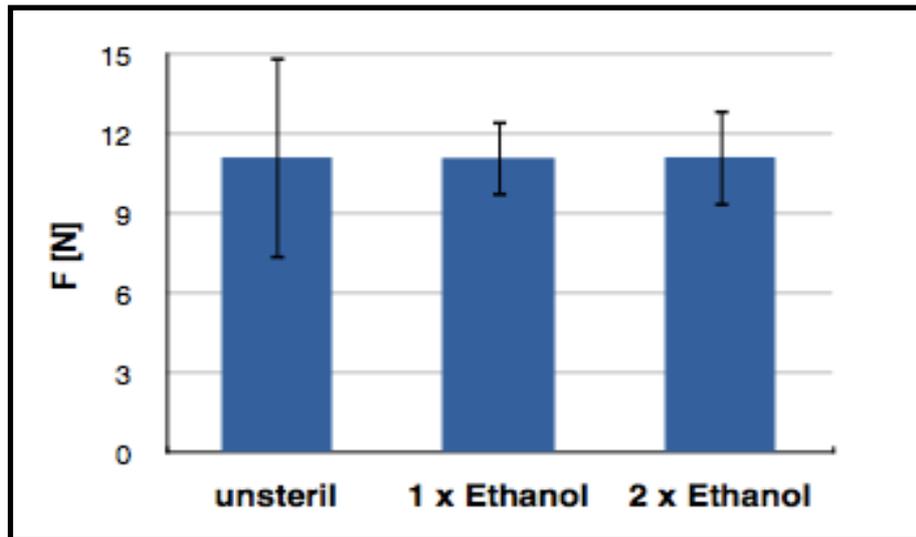
**Abb. 14:** Biomechanische Messung von Kollagenfasern wie in 2.4 beschrieben. Dargestellt ist der Einfluss einer Vorkraft von 4, 5 und 6 N auf die Maximalkraft von Kollagenfasern (n=10 pro Messgruppe). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Vorkraft erheblichen Einfluss auf die spätere Maximalkraft eines Konstrukts hat. Bei einer Belastung mit 4 N erreichten die Kollagenfäden einen Mittelwert von 4,71 N ( $\pm 0,63$ ). Bei einer Steigerung der Vorkraft auf 5 N lag die Maximalkraft bei 5,1 N ( $\pm 1,31$ ), bei einer Vorkraft von 6 N bereits bei 5,24 N ( $\pm 1,06$ ). Nach dieser Versuchsreihe wurden die ACL-Konstrukte von nun an aus kurzen, weiblichen Fasern gefertigt. Die Fasern wurden nach Isolation erst mit einer Kraft von 6 N und anschließend mit 5 N getestet.

### 3.1.5 Einfluss der Sterilisation auf die Maximalkraft von Kollagenfasern

Die KF wurden nach ihrer Isolation und Weiterverarbeitung zweimal mit Ethanol sterilisiert. Um die Auswirkungen solcher Maßnahmen auf die biomechanischen Eigenschaften der KF zu untersuchen, wurden kurze, weibliche Fasern einer Charge getestet. Diese wurden erst einmal und schließlich ein zweites Mal mit

Ethanol sterilisiert. Abbildung 15 zeigt die Maximalkraft der KF nach Sterilisation mit Ethanol im Vergleich mit unsterilen KF gleicher Länge und Charge.



**Abb. 15:** Einfluss der Sterilisationsvorgänge auf die Maximalkraft von KF. Die biomechanische Messung erfolgte wie in 2.4 beschrieben. Dargestellt ist die Anzahl der Ethanolsterilisationen im Vergleich zur Kontrolle (unsteril) in Bezug auf die Maximalkraft einer Charge (n=15 pro Messgruppe). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine unterschiedliche Anzahl von Sterilisationsvorgängen mit Ethanol keine Auswirkung auf die Maximalkraft kurzer, weiblicher Fasern einer Charge hat. Im Vergleich zur Kontrolle, welche im Mittel bei 11,13 N ( $\pm 3,82$ ) liegt, zeigte das Ergebnis der Sterilisation bei einem Waschgang Ethanol mit 11,11 N ( $\pm 1,44$ ) ähnliche Werte. Ebenso verhielten sich die Werte für einen zweiten durchgeführten Waschgang mit Ethanol (11,42 N ( $\pm 1,85$  N)).

### 3.2 Die verschiedenen ACL-Konstruktvarianten

Der erste Teil der biomechanischen Messungen diente der Charakterisierung der einzelnen KF anhand ihrer Maximalkraft. Um eine optimale Reißfestigkeit der Konstrukte zu erzielen mussten bereits beschädigte oder schwache Fasern aussortiert werden.

Die folgenden Abschnitte zeigen die Maximalkraft der ACL-Konstruktvarianten. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Messergebnisse der einzelnen ACL-Konstruktvarianten A, B und C. Die Fertigung dieser Varianten ist in 2.3 beschrieben. Tabelle 1 bezieht sich auf die gemessenen maximalen und minimalen Kraftwerte in Abhängigkeit ihres Durchmessers. Ebenso sind die Anzahl der jeweiligen Konstrukte und der Mittelwert dargestellt. Die Ergebnisse und weitere Erläuterungen zu Tab. 1 und Tab. 2 sind in den folgenden Abschnitten 3.2.1, 3.2.2, und 3.2.3 beschrieben.

**Tab. 1:** Biomechanische Messung der Konstruktvarianten A, B und C wie in 2.4 beschrieben. Dargestellt ist die Maximalkraft in Abhängigkeit der unterschiedlichen Durchmesser.

Konstrukt	$\varnothing$ [mm]	n	$\bar{\varnothing}$ F [N]	$F_{\max}$ [N]	$F_{\min}$ [N]
A	4	25	39,1±15,8	64	9,4
	8	2	244±9	253	235
B	4	38	279,8±132,9	697,2	39,3
	8	22	540±261	911	136
C	4	45	260,2±61,6	386	130
	8	10	907,1±134,4	1153	697

Für einen besseren Vergleich zeigt Tab. 2 die Messergebnisse in Abhängigkeit ihrer Spannung  $\delta$ . Dargestellt sind die Anzahl n der Konstruktvarianten A, B und C der mittlere Spannungswert ( $\bar{\varnothing} \delta$ ), sowie die Maximal- und Minimalwerte ( $\delta_{\max}$ ,  $\delta_{\min}$ ). Die unterschiedlichen Durchmesser in der Rechnung sind berücksichtigt.

**Tab. 2:** Errechnete Spannungswerte  $\bar{\delta}$  [N/mm<sup>2</sup>] der Konstruktvarianten A, B und C im Vergleich, Rechnung wie in 2.4 beschrieben.

Konstrukt	n	$\bar{\delta}$	$\bar{\delta}_{\max}$	$\bar{\delta}_{\min}$
A	27	21,9±15,1	59,5	3,5
B	60	24,8±11,4	60,9	5
C	55	20,5±3,7	29,0	13,5

### 3.2.1 ACL-Konstruktvariante A

Wie in Tab. 1 und 2 dargestellt, wurden insgesamt 27 Konstrukte der Variante A gefertigt. Die Werte biomechanischen Messergebnisse der Abreißkraft betragen im Mittel 39,1 N ( $\pm 15,8$ ) für einen Durchmesser von 4 mm, beziehungsweise 244 N ( $\pm 9$ ) bei 8 mm Durchmesser. Die minimale Abreißkraft von Variante A lag bei einem Durchmesser von 4 mm bei 9,4 N, die maximale bei 64 N. Bei 8 mm Durchmesser waren die Maximal- und Minimalwerte deutlich höher (253 N bzw. 235 N). Ähnlich verhielten sich die berechneten Werte für die Spannung. Diese ist der Quotient der Abreißkraft und des Querschnitts der Konstruktvarianten ( $\bar{\delta} = F/A$ ) wobei der Querschnitt sich über den gemessenen Durchmesser berechnen lässt ( $A = d^2 \times \pi / 4$ ).

Konstrukt A hatte eine mittlere Spannung von 21,9 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 15,1$ ). Das Maximum bei dieser Variante lag bei 59,5 N/mm<sup>2</sup>, der minimale Wert bei 3,5 N/mm<sup>2</sup>.

### 3.2.2 ACL-Konstruktvariante B

Die Ergebnisse dieser Messungen basierten auf den Erfahrungen, welche mit Konstruktvariante A gemacht wurden. Verwendet wurden ab diesem Zeitpunkt

nur kurze, weibliche und getestete Fasern. Im Hinblick auf die anstehende Tierstudie wurde vermehrt mit Konstrukten getestet, welche einen Durchmesser von 4 mm besaßen.

Die Ergebnisse der Messungen zeigten eine Weiterentwicklung. Wie in Tab. 1 und 2 dargestellt wurden von Variante *B* insgesamt 60 Konstrukte gefertigt. Es wurden bei den Maximalkraft höhere Werte erzielt wie bei Variante *A*. Diese lagen im Mittel bei 279,8 N ( $\pm 132,9$ ) für einen Durchmesser von 4 mm und bei 540 N ( $\pm 261$ ) für 8 mm. Es konnte eine Maximalkraft von 911 N bei einem 8 mm Konstrukt erzielt werden, der Minimalwert lag bei 136 N. Die Spannung betrug im Mittel bei  $24,8 \pm 11,4$  N/mm<sup>2</sup>, das Minimum 5,0 N/mm<sup>2</sup> und das Maximum 60,9 N/mm<sup>2</sup>. Die Vorgabe von 19,9 N/mm<sup>2</sup> wurde bei fast allen Konstrukten erreicht.

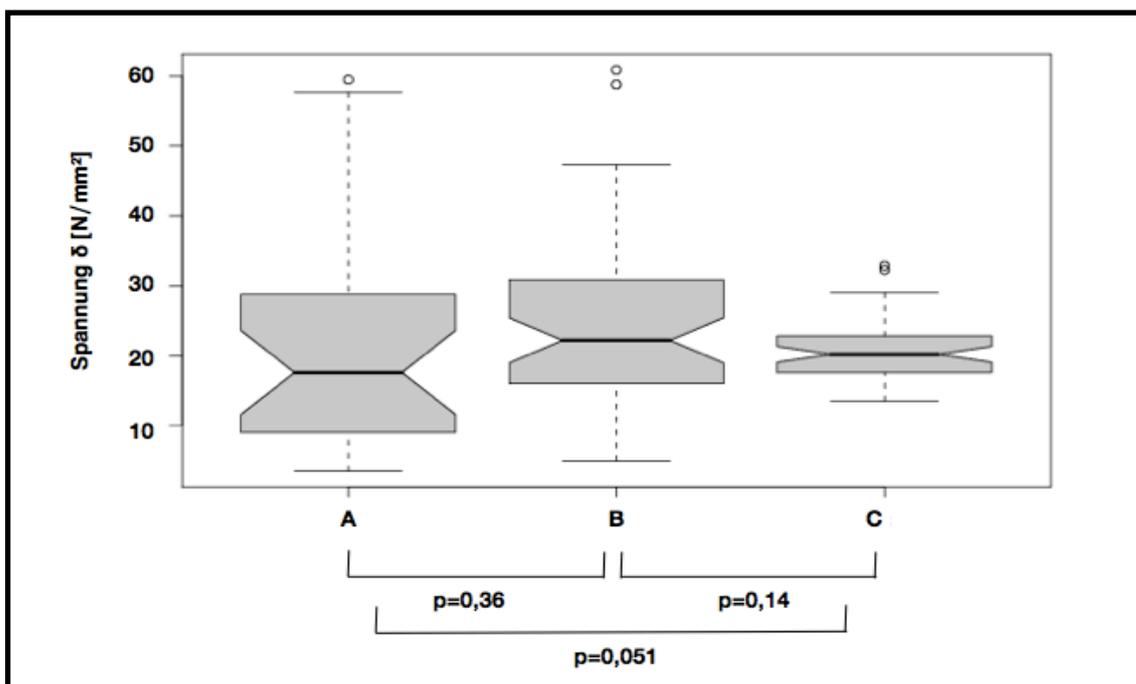
### **3.2.3 ACL-Konstruktvariante C**

ACL-Konstruktvariante *C* orientierte sich an der Anatomie des nativen ACL eines *Mini-Pig*. Dieses bestand aus zwei Bündeln und hat eine Länge von 4 mm und einen Durchmesser von 4 mm. Bei den Durchmessern wurde anfangs viel variiert, um die biomechanischen Eigenschaften der Konstruktvariante *C* zu untersuchen. Zudem wurden zehn Humankonstrukte mit einem Durchmesser von 8 mm gefertigt. Dies ist bei der Betrachtung der biomechanischen Ergebnisse in Tab. 1 zu beachten.

Die Messergebnisse spiegelten den Entwicklungsprozess wieder. Die Erfahrung über die Eigenschaften der KF wurden umgesetzt und es konnte ein einheitliches ACL-Konstrukt entwickelt werden. Von Variante *C* wurden insgesamt 55 Konstrukte gefertigt. Bei der Maximalkraft wurden Ergebnisse von 1153 N für ein Humankonstrukt bei 8 mm Durchmesser erreicht.

Die Spannung zeigte konstante Werte, im Mittel betrug sie  $20,5$  N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 3,7$ ). Der Maximalwert betrug bei  $29$  N/mm<sup>2</sup> und der Minimalwert bei  $13,5$  N/mm<sup>2</sup>. Nahezu alle Werte lagen an der Vorgabe von  $19,9$  N/mm<sup>2</sup> oder darüber. Diese Variante zeigte sich aufgrund ihrer biomechanischen Eigenschaften und ihrer konstanten Messergebnisse geeignet für die Tierstudie.

Folgende Abb. 16 zeigt die Eingrenzung der Werte in einen übersichtlichen Bereich. Er stellt die Spannungswerte aller drei ACL-Konstruktvarianten dar und lässt einen Vergleich zu.



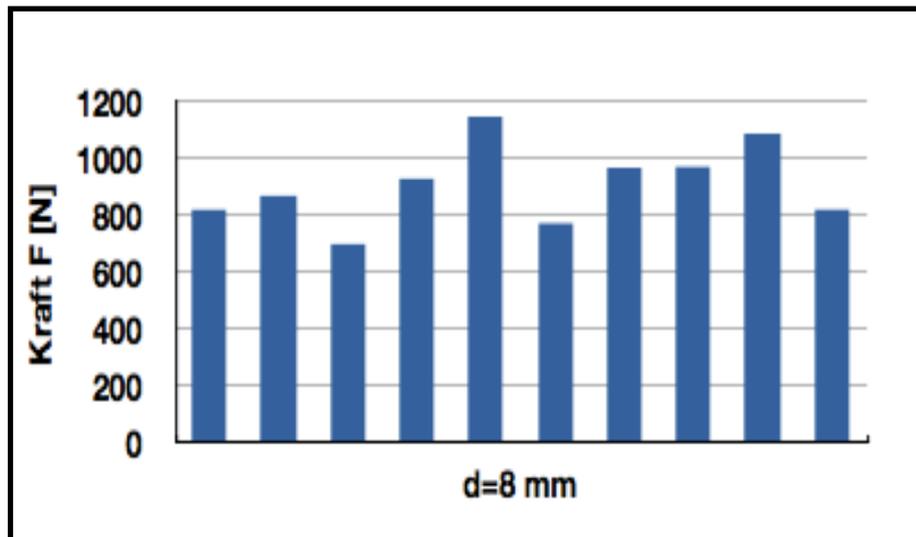
**Abb. 16:** Verteilung der Messwerte der ACL-Konstruktvarianten A, B und C in Bezug auf die Spannung. Im Vergleich zwischen den Konstruktvarianten konnten im student's t-Test keine Signifikanzen zwischen Variante A und B, sowie zwischen B und C festgestellt werden ( $p > 0,1$ ). Zwischen Variante A und C wurde eine marginale Signifikanz ermittelt ( $p > 0,05$ ).

Der Median lag bei Variante A bei 17,6, bei Variante B bei 22,2 und bei Variante C bei 20,2. Der student's t-Test zeigte zwischen Variante A und B keine Signifikanz ( $p = 0,36$ ). Dies galt auch für einen Vergleich zwischen Variante B und C ( $p = 0,14$ ). Zwischen Variante A und C wurde eine marginale Signifikanz ( $p = 0,051$ ) ermittelt.

All diese Messungen hatten am Ende das einheitliche Ziel ein Humankonstrukt zu entwickeln. Um die bisherigen biomechanischen Ergebnisse mit niedrigen

Durchmessern zu überprüfen und zu bestätigen wurden zehn Humankonstrukte gefertigt und getestet. Variante C galt als Vorstufe eines solchen Konstrukts. Eine Maximalkraft von 1000 N verteilt auf einen Durchmesser von 8 mm sollte erreicht werden.

In Abb. 17 sind die Messergebnisse dieser ACL-Humankonstrukte dargestellt.



**Abb. 17:** Biomechanische Messung von ACL-Humankonstrukten wie in 2.4 beschrieben. Dargestellt ist die Maximalkraft von ACL-Konstruktvariante C bei einem Durchmesser von 8 mm (n=10).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Vorgaben umgesetzt werden konnten. Die Maximalkraft betrug im Mittel bei 907,1 N ( $\pm 134$ ), die Spannung erreichte einen Mittelwert von 18,4 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 3,4$ ). Es zeigten sich jedoch immer noch deutliche Abweichungen von 465 N zwischen Minimal- und Maximalwert (697 N bzw. 1153 N).

### **3.3 Ergebnisse der Tierstudie**

#### **3.3.1 Natives ACL im Vergleich mit den ACL-Konstrukten der 6-Wochen- und 6-Monatsgruppe**

Die Operationen verliefen komplikationslos. Intraoperativ wurde ein optimales Ergebnis in Bezug auf Implantatposition und Fixierung erzielt. An allen Versuchstieren konnte eine gute Wundheilung ohne Entzündungszeichen beobachtet werden. Die Versuchstiere zeigten die ersten Tage postoperativ Schonhaltung und ein hinkendes Gangbild. Ab dem zehnten Tag besserte sich das Gangbild bis zur vollständigen Genesung.

Aus den 16 Versuchstieren wurde das rechte, operierte Knie präpariert und das native ACL im linken Knie als Kontrolle gemessen.

Die Präparation der Kadaver erfolgte wie in 2.5.2 beschrieben. Makroskopisch fand sich nach Eröffnung der Gelenkhöhle eine Bandstruktur in Position des implantierten ACL-Konstrukts. Es konnten ligamentäre Strukturen gesehen werden, welche dem anatomischen Verlauf des nativen ACL ähnlich waren. Nach Eröffnung des Gelenks gab es teilweise Probleme das Konstrukt von nahegelegenen Strukturen wie Synovia abzugrenzen. Neu gebildete Weichteil- und Gewebestrukturen bildeten sich in der Area intercondylaris um das Konstrukt bis hin zum dorsalen Anteil der Patella. Die Knorpelflächen zeigten nach sechs Wochen keine Anzeichen von Destruktion. Im direkten Vergleich konnten nach sechs Monaten geringe Knorpeldefekte im Bereich der Femurkondyle gesehen werden. Diese zeigten deutlich degenerative Anteile, welche nicht auf iatrogene Verletzungen während der Operation zurückzuführen waren.

Die Studie umfasste acht 6-Wochentiere und acht 6-Monatstiere. Das implantierte ACL-Konstrukt nach Variante C der beiden Versuchsgruppen hatte eine Länge von 4 cm und einen Durchmesser von 4 mm. Wie in Tab. 1 sichtbar erreichten die im Vorfeld getesteten ACL-Konstrukte der Variante C, welche anschließend implantiert wurden, im Mittel einen Wert von 260,2 N ( $\pm 61,6$ ). Dies ergab eine mittlere Spannung von  $20,5 \pm 3,7 \text{ N/mm}^2$ .

In der folgenden Tab. 3 sind die Ergebnisse aus den biomechanischen Messungen wie in 2.5.3 dargestellt. Zu sehen ist die Maximalkraft der ACL-Konstrukte der verschiedenen Studientiere im Vergleich mit dem nativen ACL der Tiere.

Die Ergebnisse der biomechanischen Messungen ergaben im Mittel einen Wert von 80,5 N ( $\pm 31,5$ ) für die 6-Wochengruppe und für die 6-Monatsgruppe 161,6 N ( $\pm 105,1$ ). Für das native ACL wurden Werte von 709,9 N ( $\pm 165,4$ ) im Mittel gemessen.

**Tab. 3:** Biomechanische Messungen der Tierstudie wie in 2.5.3 beschrieben. Dargestellt ist die Maximalkraft der implantierten ACL-Konstrukte der Variante C nach 6 Wochen (W) sowie nach 6 Monaten (M); n=8. Als Kontrolle ist die Maximalkraft des nativen ACL dargestellt (n=16).

	1	2	3	4	5	6	7	8
F[N] 6 W	61	110	62	67	106	139	41	58
F[N] 6 M	204	102	51	385	137	33	159	222
F[N] ACL	518	530	945	555	825	794	545	461
nativ	684	796	837	920	823	938	692	495

Im Vergleich der Mittelwerte mit der Maximalkraft im Vorfeld gemessener ACL-Konstrukte der Variante C ergab dies einen Anteil von 31,8% für die 6-Wochengruppe und einen Anteil von 63,8% für die 6-Monatsgruppe. Im Vergleich der Maximalkraft der nativen ACL eines *Mini-Pig* mit den implantierten ACL-Konstrukten der Variante C war dies gegenüber der 6-Wochengruppe ein Anteil von 11,3% und gegenüber der 6-Monatsgruppe ein Anteil von 22,8%. Der Mittelwert des in Tab. 1 getestete ACL-Konstrukt der Variante C erreichte 35,7% der Maximalkraft des nativen ACL der Versuchstiere.

Im Vergleich zur 6-Wochengruppe konnten bei den 6-Monatstieren höhere Messwerte erzielt werden, jedoch lag der Minimalwert bei Tier Nr. 6 mit 33 N noch unter dem Minimalwert der 6-Wochengruppe von 41 N bei Tier Nr. 7. Bei allen gemessenen Tieren wurden weder in der 6-Wochengruppe noch in der 6-Monatsgruppe ein Wert aus der Kontrollgruppe erreicht.

Die aus der Maximalkraft errechneten Spannungswerte werden wie folgt in unten folgender Tab. 4 dargestellt.

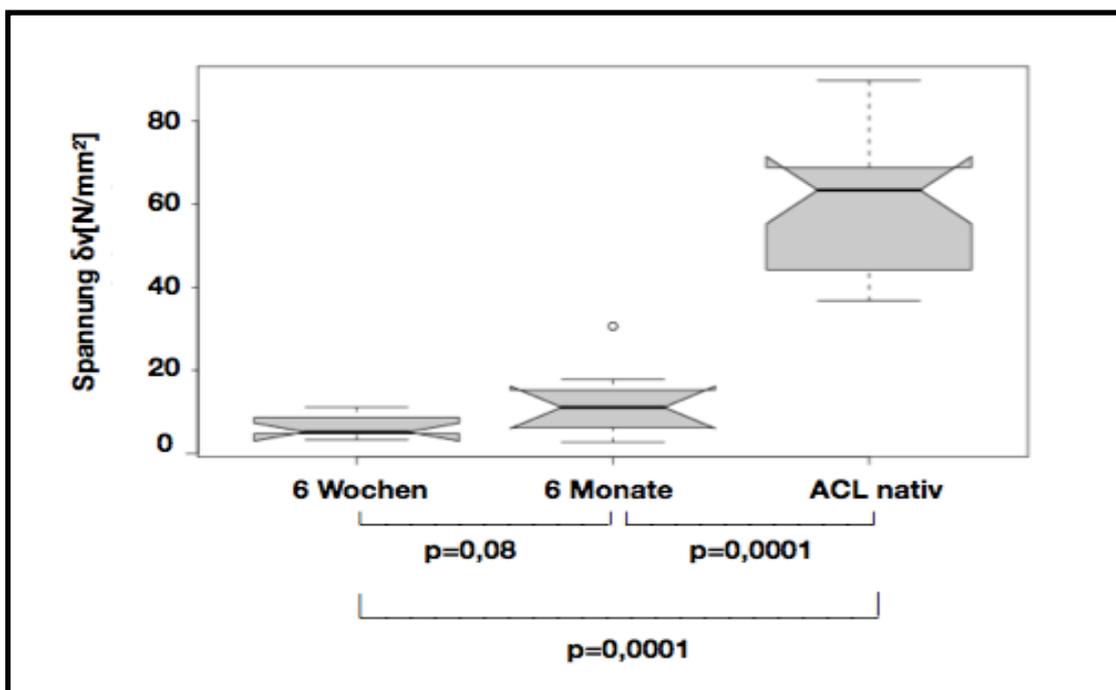
Aus den errechneten Werten errechnete sich im Mittel eine Spannung von 6,4 N/mm<sup>2</sup> (±2,5) bei der 6-Wochengruppe und von 12,9 N/mm<sup>2</sup> (±8,4) bei der 6-Monatsgruppe. Das native ACL erreichte im Mittel 56,5 N/mm<sup>2</sup> (±13,2). In der 6-Wochengruppe betrug bei Tier Nr. 6 der Maximalwert 11,1 N/mm<sup>2</sup>, der Minimalwert von Tier Nr. 7 3,3 N/mm<sup>2</sup>. Bei der 6-Monatsgruppe lag Tier Nr. 5 mit 30,6 N/mm<sup>2</sup> über der Vorgabe von 19,9 N/mm<sup>2</sup>. Der Minimalwert beträgt 2,6 N/mm<sup>2</sup> bei Tier Nr. 7.

**Tab. 4:** Übersicht über die Spannungswerte der Tierstudie. Als Grundlagen für die Berechnungen dienen die Messwerte aus Tab. 3. Ein Durchmesser von 4 mm für ein ACL-Konstrukt wird vorausgesetzt. Dargestellt sind die Konstrukte der 6-Wochengruppe (W) und die der 6-Monatsgruppe (M) (n=8). Im Vergleich die Kontrolle ACL nativ (n=16).

	1	2	3	4	5	6	7	8
δ [N/mm <sup>2</sup> ] 6 W	4,9	8,8	4,9	5,3	8,5	11,1	3,3	4,6
δ [N/mm <sup>2</sup> ] 6 M	16,2	8,1	4,1	17,7	30,6	10,9	2,6	12,7
δ [N/mm <sup>2</sup> ]	41,2	42,2	75,2	44,2	65,7	63,2	36,7	39,4
ACL nativ	55,1	74,6	65,5	73,2	66,6	63,3	54,4	69,2

Die ermittelten Spannungswerte aus Tab. 4 werden zum Vergleich in folgender Abb. 18 in einem Boxplot dargestellt. Dieser veranschaulicht die Unterschiede der einzelnen Gruppen.

Die Ergebnisse veranschaulichen die Unterschiede zwischen den Kadaverknien der Studientiere mit implantierten ACL-Konstrukten und denen mit nativen ACL. Im student's t-Test ergaben sich marginale Signifikanzen ( $p=0,08$ ) zwischen der 6-Wochen- und der 6-Monatsgruppe. Zwischen der 6-Wochengruppe und der Kontrolle wurden ebenso hohe Signifikanzen ermittelt wie zwischen der 6-Monatsgruppe und der Kontrolle ( $p=0,0001$ ).



**Abb. 18:** Verteilung der Messwerte der verschiedenen Studienreihen in Bezug auf die Spannung. Dargestellt sind die 6-Wochen- und die 6-Monatsgruppe im Vergleich zur Kontrolle (ACL nativ). Marginale Signifikanzen ( $p=0,08$ ) zwischen beiden Versuchsgruppen und hohe Signifikanzen ( $p=0,0001$ ) im Vergleich beider Versuchsgruppen zur Kontrolle wurden im student's t-Test (wie in 2.6 beschrieben) ermittelt.

#### 4. Diskussion

#### **4.1 Methodische Überlegungen**

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen ACL-Konstrukts für die Rekonstruktion einer vorderen Kreuzbandruptur. Tissue Engineering wird in Zukunft im Bereich der Kreuzbandchirurgie eine große Rolle spielen, da die Zahl der ACL-Rekonstruktionen über die Jahre weiter ansteigen wird. Die Operation des vorderen Kreuzbandes stellt die Therapie der Wahl für Patienten dar, die Instabilität im betroffenen Kniegelenk oder Einschränkungen der Lebensqualität nach einer Ruptur entwickeln. Bisher angewandte Methoden sind zwar vorhanden, bieten aber nicht die optimale Therapie. Sie beziehen sich vor allem auf autologe oder allogene Sehnen transplantationen. Erstere geht mit einer Schwächung der Donorseite und einer geringen Verfügbarkeit einher, die zweite Methode birgt die Gefahr der Abstoßung oder Infektion und einer geringeren Reißfestigkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kreuzbandkonstrukte aus Kollagen I entwickelt und biomechanisch getestet. Kollagen bietet als Hauptbestandteil des vorderen Kreuzbandes, der extrazellulären Matrix, sowie als Grundsubstanz der im Körper vorkommenden Sehnen und Bänder beste Voraussetzungen für den Einsatz als Trägermatrix und für den Ersatz eines rupturierten Kreuzbandes.

Das Ziel unseres angewandten Verfahren zur Isolation der Kollagens war die Erhaltung ihrer Struktur als einzelne Fasern. Dadurch erzielten wir eine maximale Stabilität und Abreißkraft für die einzelnen Faserlängen. Vor Probleme stellten uns die unterschiedlichen biomechanischen Eigenschaften der einzelnen Faserlängen und Chargen. Die Fasern unterschieden sich in ihrer Maximalkraft, so dass verschiedene Tests durchgeführt wurden, um die Abweichungen zu reduzieren. Durch Belastung der Fasern mit einer Kraft von 6 N wurden bereits beschädigte Fasern oder Fasern mit ungenügender Maximalkraft erfasst und aussortiert. Ab einer Vorbelastung von über 6 N war der Ausschuss der Fasern zu hoch, so dass die Vorkraft nicht weiter erhöht wurde.

Im Verlauf der Versuche wurden verschiedene Varianten von Konstrukten entwickelt.

Während der Entwicklung von Konstruktvariante *A* waren die biomechanischen Eigenschaften der KF noch nicht untersucht. Aus diesem Grund wurden kurze, mittellange und lange Fasern verwendet. Lange Fasern wurden aufgrund des minimalen Durchmessers oft doppelt verwendet, um eine gewisse Grundstabilität zu gewährleisten. Da bei Variante *A* der Durchmesser oft schwer oder nur ungenau zu bestimmen war, fielen die Ergebnisse sehr unterschiedlich aus. Der Grund dafür war die schlauchähnliche Struktur dieser Variante. Hinzu verfangen sich die Knoten in den Zwischenräumen und führten zu Schwachstellen. Im Laufe der Messungen konnten keine einheitliche Spannung erzielt werden und es wurde eine erhebliche Streuung der Ergebnisse beobachtet. Dies gibt die hohe Standardabweichung wieder. Auch spielte der Zeitfaktor bei der Fertigung dieser Variante eine große Rolle. Für ein 8 mm dickes Konstrukt mussten mehrere Tage einberechnet werden. Diese Faktoren sind in der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Bei Variante *B* wurden nur Fasern verwendet, welche zuvor die biomechanischen Tests durchlaufen hatten. Der Verzicht auf die Schlauchstruktur ergab eine hohe Maximalkraft. Jedoch war die Entwicklung eines solchen Konstrukts zu zeitaufwendig.

Variante *C* hingegen orientierte sich mit zwei Bündeln an der anatomischen Form des ACL mit. Durch die Rotation wurde eine konstante Fläche geschaffen, welche die Berechnung der Spannung vereinfachte.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Spannung bei Variante *C* um den vorgegebenen Wert von  $19,9 \text{ N/mm}^2$  bewegt. Die Ungleichmäßigkeit der KF in Variante *A* spiegelte sich in der Verteilung der Ergebnisse in Abb. 16 wieder. Zu sehen war auch die Verbesserung bei Variante *B* gegenüber *A*, welche sich in einer geringeren Verteilung der Ergebnisse zeigte. Ebenso liess sich dies über den Boxplot von Variante *C* behaupten, die Verteilung der Ergebnisse war eingegrenzt.

Mit Variante *C* wurde ein ACL-Konstrukt entwickelt, welches den vorgegebenen Anforderungen gerecht wurde. An den Fasern wurden anhand durchgeführter

biomechanischer Untersuchungen die Maximalkraft erreicht. Durch die vielen biomechanischen Tests war eine Reproduzierbarkeit mit zuverlässigen Werten gewährleistet.

All diese Versuche lassen bisher keine Aussagen über das Verhalten des Konstrukts in Menschen zu. Um erste Ergebnisse zu erzielen eignete sich die Durchführung einer Tierstudie. *Mini-Pigs* gelten auf dem Gebiet der Kreuzbandforschung als etabliertes Tiermodell, da das Kniegelenk in der Anatomie dem Menschen ähnlich ist und das ACL über ähnliche biomechanischen Eigenschaften verfügt.<sup>80</sup> Der Operationsablauf und die verwendeten Materialien ähneln denen einer humanen ACL-Rekonstruktion.

In den letzten Jahrzehnten konnten große Fortschritte in der Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften von verletzten Sehnen und Bändern erzielt werden.<sup>60</sup> Das Bestreben ein Konstrukt mit den Eigenschaften des vorderen Kreuzbandes zu entwickeln ist nicht neu. Cooper et al. (2004) entwickelten ein ACL-Konstrukt aus PLAGA (*Poly-Co-Glycolic-Acid*) mit einer Maximalkraft von 907 N.<sup>5</sup> Laurencin et al. (2005) beschrieben eine Maximalkraft von 2372±72 N bei einem ACL-Konstrukt aus Seide.<sup>50</sup> Konstrukte aus Gore-Tex® erreichten eine 3-fach höhere Maximalkraft gegenüber einem nativen ACL.<sup>88</sup>

Zwar ist es den Arbeitsgruppen gelungen, geeignete Träger zu konstruieren, jedoch sind vergangene Studien mit solchen Scaffolds fehlgeschlagen. Es ist mit den bisherigen Methoden nicht gelungen, die biomechanische Funktion des ACL zu reproduzieren. Dies lag vor allem an der mangelnden Reißfestigkeit Kollagen basierter Konstrukte oder an der mangelnden Biokompatibilität synthetischer Konstrukte.<sup>61</sup> Die Hauptanforderungen eines neuartigen ACL-Konstrukts werden neben einer ausreichenden Reißfestigkeit vor allem Zelladhäsion und Proliferation sein.

## **4.2 Unterschiedliche Trägermaterialien**

Verschiedene Materialien wie Gore-Tex®, Carbon, Dacron® oder Seide als Träger oder Ersatzplastik wurden bereits untersucht und getestet. Der Einsatz von synthetischen Materialien, Wachstumsfaktoren, Zelltherapie, Gentransfer und Gentherapie in Verbindung mit Trägersubstanzen erbrachte neue Möglich-

keiten. Es wurden zwar bis heute erhebliche Fortschritte gemacht, jedoch ist der erhoffte Durchbruch noch nicht gelungen.

Der Einsatz synthetischer Materialien ist nach Misserfolgen in klinischen Studien weitgehend fehlgeschlagen. Die Materialien wurden aufgrund ihrer hohen Maximalkraft und Widerstandsfähigkeit entwickelt. Gore-Tex® wird an der Schulter vor allem bei Rupturen der Rotatorenmanschette verwendet.<sup>87</sup> Es gilt als stabilster synthetischer Träger.<sup>88</sup> Im Kniegelenk hielt es jedoch den zyklischen Bewegungen auf Dauer nicht stand. Ebenso konnten keine Ligamentisierung oder Zellproliferation festgestellt werden. Bei anderen Materialien wie Dacron®, welches vor allem in der Gefäßchirurgie eingesetzt wird, konnte zwar Zellwachstum gesehen werden, jedoch versagten die Konstrukte bei Belastungsspitzen und rissen in Studien aus ihren Verankerungen im Knochen. Carbonfasern sollten diese Probleme lösen. Es kam jedoch zu Abstoßungsreaktionen und Auflösungserscheinungen. Fasern wurden im Gelenk und in regionalen Lymphknoten gefunden.<sup>70</sup> Auch andere synthetische Trägermaterialien konnten keine ausreichenden Ergebnisse diesbezüglich vorweisen. In Bezug auf die Steifigkeit zeigten die synthetischen Träger zu hohe Werte. In Tierstudien kam es aufgrund der hohen Biege- und Reibbelastungen im Kniegelenk zu hohem Materialverschleiß.<sup>71</sup>

Auf dem Gebiet der Gen- und Zelltherapie beschrieben Woo et al. bereits 1999 den Einsatz von aus Knochenmark isolierten MSC (*mesenchymal stem cells*) für die Heilung von Sehnen und Bändern.<sup>36</sup> Später war es ihnen gelungen MSC zu Fibroblasten zu differenzieren, welche sich auf verletzten Bändern ausbreiteten und auch in nicht verletzte Areale proliferierten.<sup>67</sup>

Haddad-Weber et al. (2010) zeigten die Fähigkeit zur Ligamentisierung von MSC- und ACL-Fibroblasten unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie BMP12 (*bone morphogenetic protein 12*) und BMP13.<sup>68</sup> Steinert et al. (2008) beschäftigten sich mit dem Einfluss von IGF1 (*insulin growth like factor 1*) auf das Zusammenwachsen von gerissenen Kreuzbandenden. In beiden Fällen wurde verstärkte Expression von Kollagen I und ligamentären Matrixproteinen festgestellt.<sup>69</sup>

Aufbauend auf diesen Studien beschäftigten sich im weiteren Verlauf Forschungsarbeiten mit einer Kombination von synthetischen Materialien und Zelltherapie. Eine Studie von Heckmann et al. (2007) befasste sich mit einem Garn aus PLA (*polylactide acid*). Dieses wurde auf Zelladhäsion und Proliferation untersucht. Unter Behandlung mit MSC konnten fibroblastäre Zellen und die Anwesenheit von Matrixmolekülen wie Kollagen I und III, Fibronectin, MMP (Matrix-Metallo-Proteasen) bestätigt werden. Die Studie zeigte, dass eine homogene Zellbesiedlung mit Differenzierung und die Ausbildung der Zellen hin zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp möglich ist. Hinzu kam es zur Bildung einer ligamentähnlichen Extrazellulärmatrix.<sup>72</sup>

Im direkten Vergleich untersuchten Lu et al. (2005) verschiedener biodegradierbare Polymere wie PGA (*polyglycolic acid*), PLLA (*poly-L-lactid-acid*) und PLAGA (*poly-co-glycolic-acid*) mit einer Beschichtung aus Fibronectin im Hinblick auf Zellantwort, Degeneration und biomechanischen Eigenschaften. In Bezug auf diese Kriterien erzielten PLLA beschichtete Fasern die besten Ergebnisse.<sup>73</sup>

Als neueste Trägersubstanz in Kombination mit MSC hat sich Seide hervorgetan. Aktuelle in vivo Studien zeigen Potential im Hinblick auf Zellwanderung, Proliferation und Kollagenexpression wie auch auf biomechanische Eigenschaften.<sup>74</sup>

Weitere Studien beschäftigten sich wieder mit der Grundsubstanz, dem Kollagen. Sie berichteten, dass mit Fibroblasten besiedelte Kollagen-Scaffolds in vivo überleben, und das Potential besaßen, den Prozess des Remodelling positiv zu beeinflussen. Hier konnte eine verbesserte Kollagensynthese gezeigt werden. Ebenso wurde die Bildung eines Ligaments gefördert.<sup>64</sup>

Neueste Veröffentlichungen von Robayo et al. (2010) berichteten ebenfalls von in vivo Kolonisierung azellulärer Scaffolds mit ACL-Fibroblasten. Es konnten vaskularisierte Zonen, welche sich bis zur Mitte der Allografts ausbreiteten, gesehen werden. In vitro konnte die Expression von Prolyl-4-Hydroxylase, eines in Kollagenfibrillen enthaltenen Enzyms, nachgewiesen werden.<sup>65</sup>

Tremblay et al. (2010) benutzten Typ I Kollagen Scaffolds und übersäten sie mit lebenden Hautfibroblasten. In einer in vivo Studie mit Ziegen konnten nach

sechs Monaten ligamentisierte, vollständig vaskularisierte ACL-Scaffolds nachgewiesen werden. An den knöchernen Übergängen befanden sich organisierte Sharpey-Fasern sowie Knorpelzellen. Es reichte folglich nicht aus lediglich einen Träger zu implantieren, sondern es sollten zusätzlich noch Zellen und Stimulationsfaktoren hinzugegeben werden. Dies diene zur positiven Beeinflussung der Popularisierung, Adhäsion und Proliferation von Zellen.<sup>66</sup>

All diese Erkenntnisse über Ligamentisierung, Zellproliferation und Adhäsion erbrachten noch nicht den erhofften Durchbruch. Gründe dafür sind die dreidimensionale Komplexität des ACL, der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Regeneration und die hohen biomechanischen Kräfte im Kniegelenk.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kreuzbandkonstrukte aus Kollagen I entwickelt und biomechanisch getestet. Zudem wurden diese in vivo in einer Tierstudie getestet. Der Gebrauch solcher azellulärer Substanzen wurde auf dem Gebiet des Tissue Engineering in den letzten Jahren immer häufiger verwendet. Ein Vorteil ist die Zulassung als Medizinprodukt, da die Wirkungsweise nicht immunologisch, pharmakologisch oder metabolisch erfolgt. Laut Definition des Bundesministeriums für Gesundheit wird die Hauptwirkung rein physikalisch erzielt.<sup>89</sup> Im Gegensatz zu mit Zellen besiedelten Scaffolds wird keine Arzneimittelzulassung benötigt. Substanzen wie Gore-Tex®, oder Stryker-Dacron® haben keine, oder nur eine zeitliche beschränkte Zulassung von der FDA (US Food and Drug Administration) erhalten.<sup>90</sup>

Kollagen bietet als Hauptbestandteil des vorderen Kreuzbandes, der extrazellulären Matrix, sowie als Grundsubstanz der im Körper vorkommenden Sehnen und Bänder beste Voraussetzungen für den Einsatz als Trägermatrix und für den Ersatz eines rupturierten Kreuzbandes.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit beinhaltete die Entwicklung eines azellulären ACL-Konstrukts mit den biomechanischen Eigenschaften eines nativen Kreuzbandes. Auf dessen Grundlage können sich Zellen ansiedeln, ohne dass der Patient der Gefahr einer Instabilität ausgesetzt wäre. Für das ACL-Konstrukt bedeutete es, dass eine hohe Stabilität gegenüber Belastungen, eine geringe Immunantwort nach Implantation, Biokompatibilität und Bio-

degradierbarkeit diesbezüglich ebenso wichtige Eigenschaften waren, wie die Fähigkeit der Zellproliferation und des Remodelling.<sup>63</sup>

### **4.3 Isolierung von Kollagenfasern und Herstellung von Kollagenfäden**

In dieser Arbeit wurde aus Ratten stammendes Kollagen I verwendet. Ratten befinden sich nicht in der Nahrungskette des Menschen und die Gefahr von Allergien ist relativ gering. Es wird bereits im CareRes® Verfahren der Firma Arthro Kinetics® bei der Regeneration von Gelenkknorpel vor allem im Kniegelenk angewendet.<sup>91</sup>

Der Unterschied zur vorliegenden Arbeit war, dass die Kollagenfasern in ihrer makroskopischen Struktur erhalten und die Fäden schonend isoliert wurden. Die Methode der Kollagengewinnung ist von anderen Arbeitsgruppen bisher noch nicht beschrieben worden. Die Rattenschwänze wurden von der Firma Charles River® (Sulzfeld) geliefert. Sie unterschieden sich in Geschlecht, Größe, und Alter, und somit auch in Länge, Dicke und ihren biomechanischen Eigenschaften. Diese Unregelmäßigkeiten machten es anfangs unmöglich ein einheitliches Konstrukt zu fertigen. Erst mit dem Einführen verschiedener biomechanischer Tests wurden minderwertige Fasern aussortiert. Dies führte oft zu einem Ausschuss von über 80%. Die Ergebnisse zeigten, dass kurze, weibliche Fasern die höchste Maximalkraft in den Messungen erzielen konnten. Aus Kostengründen konnte jedoch keine Vorauswahl getroffen werden.

Im Verlauf wurde die Art der Kollagenisolation verändert. Anstatt die Fasern aus den Knorpelspannen zu reißen wurde ein schonendes Verfahren entwickelt, welches zudem eine bessere Einteilung der Fasern nach deren Länge erlaubte. Lange, direkt am Schwanzende abgelöste Fasern waren sehr dünn und sollten mehrfach verwendet werden. Näher am Anfang herausgelöste Fasern waren dicker, jedoch auch kürzer.

Nach diesen Optimierungen konnten höhere Maximalkräfte erzielt werden. Durch die mechanische Verbindung mit Knoten wurde die zusammenhängende Struktur der Kollagenfasern gewahrt. Ohne zelluläre, chemische oder physikalische Zusätze wurden die Fasern verbunden. Bei der manuellen

Verbindung bestand die Gefahr in der Schädigung der Fasern durch Austrocknung durch zu feste Knoten.

Um bereits beschädigte Fasern auszusortieren und nur Fasern mit hohen biomechanischen Eigenschaften zu verwenden, wurden die Fasern nach ihrer Isolation und manueller Verbindung biomechanischen Tests unterzogen. Hier wurde mit Gewichten die Grenzen der Belastbarkeit geknoteter Fasern getestet und spröde oder beschädigte Fasern verworfen. Bei einer Kraft über 6 N waren die Knoten zu stark beansprucht und die Gefahr der Verglasung oder Schädigung war gegeben. Eine Minderung der Maximalkraft durch die Sterilisation mit Ethanol konnte nicht gezeigt werden.

Die Knoten verursachten Überstände, welche nicht zu vermeiden waren. Diese Überstände waren freie Enden, welche später im Gelenkspalt zu Beeinträchtigung in der Ausheilung führen können. Folgen wie Entzündungsreaktionen oder auch Abstoßungsreaktionen im Gelenkspalt sind möglich. Dies können Gründe für Auflösungserscheinungen oder mangelnder Ligamentierung eines ACL-Konstrukts sein.

#### **4.4 Die verschiedenen ACL-Konstruktvarianten**

Im Verlauf der Arbeit wurden unterschiedliche Varianten eines Humankonstrukts entwickelt. Das letztlich implantierte Konstrukt ist das Resultat der Erfahrung im Umgang mit der Grundsubstanz, den Kollagenfasern, und den Auswertungen verschiedener biomechanischen Testreihen.

Konstruktvariante A lag mit einer Maximalkraft von 244 N ( $\pm 9$ ) für ein ACL-Konstrukt mit 8 mm Durchmesser unter dem Wert von 1000 N. Die mittlere Spannung von 21,9 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 15,1$ ) lag zwar im vorgegebenen Bereich, jedoch zeigte die Standardabweichung die Unregelmässigkeiten der Messergebnisse. Hauptgründe waren die unzureichenden biomechanischen Eigenschaften und der Zeitfaktor in der Fertigung. Durch die Schlauchstruktur konnte keine optimale Kraftübertragung stattfinden. Da sich die Spannung über die Fläche berechnete konnten oft keine verlässlichen Werte ermittelt werden. Darüber hinaus gab es Probleme in der Fertigung dieser Variante. Durch die Knoten konnte kein einheitliches Konstrukt gefertigt werden, da sich diese in den

Zwischenräumen verfangen. Die Ungleichmäßigkeit der verwendeten Fasern führte zu Schwachstellen, welche die Konstrukte schädigten. Bei der Weiterentwicklung wurde das Augenmerk auf den Querschnitt gelegt. Da auch die Arbeitszeit für die Konstruktion von Variante A sehr hoch war und diese nicht die Vorgaben erfüllen konnte wurde bei der Weiterentwicklung vermehrt auf die Maximalkraft und den Materialverbrauch geachtet.

Bei Variante B wurden erstmals Kraftwerte ermittelt, die sich im angestrebten Bereich befanden. Eine Maximalkraft im Mittel von 540 N ( $\pm 261$ ) wurde ermittelt, wobei ein maximaler Wert von 911 N gemessen wurde. Bei 60 gemessenen Konstrukten wurde eine mittlere Spannung von 24,8 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 11,4$ ) ermittelt. Im Vergleich zu Variante A fiel die geringere Abweichung auf. Probleme ergaben sich in der Befestigung des Konstrukts während den Messungen. Die losen Faserenden konnten nicht richtig verankert werden und lösten sich in Bereichen der Maximalkraft. Zusätzlich kam es bei den Messungen zu Beschädigungen der Fasern durch Komprimierung der Spannbacken. Der Materialverbrauch bei Variante B war immer noch sehr hoch und der Zeitaufwand für ein Konstrukt enorm. Für ein Konstrukt dieser Variante musste ein Faden von 120 m Länge geknotet werden. Zudem bestand die Gefahr, dass durch die Dichte der Fasern die Zellproliferation und Zelladhäsion im Transplantat beeinträchtigt wäre.

Bei Konstruktvariante C konnte ein gutes Verhältnis von Zeitaufwand, Materialverbrauch und Stabilität ermittelt werden. Die kreisförmige Struktur löste das Problem der Verankerung. Durch die Umdrehungen wurde eine konstante Fläche geschaffen und eine optimale Kraftübertragung war möglich. Die Simulation des Bohrkanals durch die Lochplatte sicherte einen konstanten Durchmesser von 4 bzw. 8 mm. Ein maximaler Wert von 1153 N wurde für ein 8 mm Konstrukt bei einem Mittel von 907,1 N ( $\pm 134,4$ ) gemessen. Dies ergab bei einem Durchmesser von 8 mm eine Spannung von 20,5 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 3,7$ ) bei 55 gemessenen Konstrukten. Die Messergebnisse näherten sich den Vorgaben bei nur noch geringen Abweichungen.

Im Vergleich zu unserer Studie erreichte die Arbeitsgruppe um Fan et al. (2009) mit einem Scaffold aus Seide und MSC eine Spannung von  $58,5 \pm 16,8$  N/mm<sup>2</sup>. Dieser

Wert war auf den stabileren Träger zurückzuführen.<sup>75</sup> Ausschließlich mit Kollagenfasern als Ausgangssubstanz konnte keine Arbeitsgruppe ähnliche Werte erzielen.

Aufgrund des unterschiedlichen Ausgangsmaterials war anfangs nicht möglich ein einheitliches Konstrukt zu entwickeln. Erst mit Variante C im Hinblick auf die Tierstudie ist dies gelungen. Bei einem Vergleich der Spannung aller drei ACL-Konstruktvarianten fiel allerdings auf, dass diese Abweichungen sich in allen Varianten befinden. Als Ursache war die Ausgangssubstanz aufzuführen. Auf den gesamten Entwicklungsprozess betrachtet reduzierten sich diese Differenzen jedoch deutlich. Der Lernprozess war durch die Erfahrungen während den Messungen begründet. Die angewandten Methoden haben zu einer deutlichen Verbesserung der Maximalkraft der ACL-Konstrukte geführt. Im weiteren Verlauf reduzierte sich die Standardabweichung einer Messreihe erheblich. Dies war Voraussetzung, um später ein einheitliches Konstrukt fertigen zu können.

#### **4.5 Ergebnisse der Tierstudie**

Die Operationen und der postoperative Verlauf gestaltete sich komplikationslos. Neu gebildete Weichteilstrukturen bildeten sich in der Area intercondylaris um das Konstrukt bis hin zum dorsalen Anteil der Patella. Sie zeigten allerdings nicht die erhoffte Stabilität. Dies könnten Teile einer Gewebereaktion sein, mit welcher die Tiere auf den implantierten Fremdkörper reagieren. Ähnliches ist auch bei humanen ACL-Rekonstruktionen unter dem Begriff *cyclops-syndrome* bekannt. Hierbei kommt es zu einer überschießenden Bindegewebsbildung vor der Fossa intercondylaris.<sup>76</sup> Die Ursachen sind noch ungeklärt, jedoch wird dies bei Transplantaten aus der Patellarsehne oder der Quadrizepssehne vermehrt beobachtet. Auch werden ein falsch gesetzter Bohrkanal oder ein fehlerhaftes Implantat dafür verantwortlich gemacht. Nach neuesten Studien ist dies bei bis zu 20% der Patienten der Fall und erfordert häufig eine arthroskopische Revision.<sup>77</sup>

Bei den implantierten ACL-Konstrukten konnten Kollagenfasern und einheitliche Faserzüge identifiziert werden, welche dem Verlauf des nativen ACL ähnelten.

Inwieweit es zur Immigration und Ansiedlung von Zellen gekommen ist, ist weiteren Versuchen zu entnehmen. Insbesondere die histologische Auswertung gilt es zu betrachten, welche Aufschluss über Zelladhäsion, Zellproliferation und Ligamentisierung geben wird. Das größte Problem bisher implantierter, biodegradierbarer Scaffolds war die geringe biomechanische Stabilität während des Prozesses des Remodelling.<sup>63</sup>

Es ist bekannt, dass lokale Faktoren eine wesentliche Rolle zur Wundheilung beisteuern. Tang et al. (2009) beschrieben die Expression und Auswirkung postoperativ auftretender Faktoren wie Matrix-Metallo-Proteasen, Kollagenasen oder Glycosidasen. Diese Enzyme sorgen für den Abbau verletzter Strukturen und sind Voraussetzung für eine gute Wundheilung. Es ist schwierig ein Scaffold vor dem Angriff intraartikulärer, proinflammatorischer Metaboliten und proteolytischen Enzymen zu schützen. Vor allem eine erhöhte Aktivität von Kollagenasen führt zu einer Schwächung oder sogar zu einem Abbau von Kollagen.<sup>78</sup> Hinzu könnten sie den Prozess des Remodelling verlangsamen.<sup>79</sup> Eine Studie von Murray et al (2007) zeigte jedoch die Beeinflussbarkeit dieser Enzyme mit Hilfe von biologischen Stimulationsfaktoren wie Collagen-Platelet-Rich-Plasma (PRP) Hydrogel.<sup>62</sup>

In der vorliegenden Studie wurde den Tieren während der Entnahme des nativen ACL iatrogene Verletzungen zugefügt. Aufgrund dessen scheint die im oberen Abschnitt aufgeführte Erklärung am sinnvollsten. Das Problem besteht in der Durchführbarkeit einer zweizeitigen Studie. Dies würde erst eine Entnahme des ACL und schließlich sechs Wochen später, nach Abnahme postoperativ auftretender proteolytischer Enzyme, die Implantation des Konstrukts bedeuten. Ein solches Design ist in einer Tierstudie nur schwer durchzuführen. Das Kniegelenk der Tiere müsste für sechs Wochen ruhig gestellt werden. Zudem besteht die Gefahr der Infektion.

#### **4.6 Ergebnisse der biomechanischen Messungen**

Die biomechanischen Messungen beider Gruppen der Tierstudie unterschieden sich erheblich von den Kontrollwerten des nativen ACL eines *Mini-Pig*. Zwischen der 6-Wochen- und der 6-Monatsgruppe wurden marginal signifikante

Unterschiede ermittelt ( $p=0,08$ ). Im Vergleich beider Gruppen zur Kontrolle konnten im student's t-Test hohe Signifikanzen ermittelt werden ( $p<0,01$ ). Die biomechanischen Auswertungen ergaben für die 6-Wochengruppe eine Maximalkraft von 31,8% gegenüber dem implantierten ACL-Konstrukt der Variante C. Die 6-Monatsgruppe erreichte eine Reißfestigkeit von 63,8%.

Die Ergebnisse der Spannung betrachtet erreichte das native ACL im Mittel 56,5 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 13,2$ ). Die Konstrukte der 6-Wochengruppe mit 6,4 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 2,5$ ), sowie die der 6-Monatsgruppe mit 12,9 N/mm<sup>2</sup> ( $\pm 8,4$ ) N erreichten im Vergleich geringere Werte.

Im Vergleich zu gängigen Operationsmethoden verhalten sich autologe Sehnentransplantate ähnlich. Durch Ekdahl et al. (2008) beschrieben reduziert sich die maximale Reißfestigkeit der Transplantate nach sieben Wochen um 75%.<sup>85</sup> Im Vergleich zu einem nativen ACL eines jungen Mannes mit einer Maximalkraft von über 2000 N oder der Maximalkraft der Kontrollwerte der Tierstudie ist dies ein erheblicher Verlust.<sup>57</sup> Geht man nach Müller et al. (2007) bei einer gedoppelten Hamstring-Plastik von einer Maximalkraft von 2300 N, bzw. bei einer 4-fachen Sehnenplastik von 4100 N aus, so reduziert sich die Maximalkraft dieser Transplantate auf bis zu 575 N, bzw. 1025 N.<sup>86</sup> Nach Scheffler et al. (2008) kann die Nekroserate während dieses Prozesses bis zu 30% des gesamten Transplantats betragen.<sup>84</sup> Als Hauptgrund wurde die fehlende Vaskularisation der Sehnentransplantate in den ersten sieben Wochen postoperativ aufgeführt. In dieser Phase sind die Transplantate zunächst avaskulär und es besteht die Gefahr einer Insuffizienz durch Überlastung und Überdehnung. Die Folge wäre eine irreversible Instabilität.<sup>59</sup>

Jung et al. (2009) zeigten, dass aufgrund der geometrischen Komplexität die Ergebnisse nicht eins zu eins übertragen werden können. Die räumliche Ausrichtung der Fasern unterscheidet sich nach einer Operation sehr von den Faserzügen eines nativen ACL bei einem natürlichen Bewegungsablauf im Kniegelenk. Daher können die biomechanischen Messwerte teils erhebliche Abweichungen aufzeigen.<sup>60</sup> Sie bieten dennoch gute Anhaltspunkte für die biomechanische Stabilität und lassen Vergleiche mit in vitro gemessenen Werten zu. Um eine genauere Aussage über die funktionelle Biomechanik

treffen zu können, müsste das ACL-Konstrukt im Kadaverknie an einem Robotersystem, wie von Woo et al. (2006) beschrieben, getestet werden.<sup>67</sup>

In den letzten Jahrzehnten wurde viel Wissen über Kreuzbandverletzungen erforscht und gesammelt. Hierbei standen vor allem die Biomechanik, die fehlende Regenerationsfähigkeit des ACL nach einer Ruptur, sowie auch der Ersatz mit Trägermaterialien in Tierstudien im Vordergrund. Zusammen mit zukunftssträchtigen Methoden wie Gentherapie, dem Einsatz von Wachstumsfaktoren, Zelltherapie und dem Einsatz biologischer Träger verspricht die Entwicklung eines Kreuzbandersatzes in Zukunft viel Hoffnung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Technologie des Tissue-Engineering bisher interessante und viel versprechende Ansätze für den Ersatz eines vorderen Kreuzbandes bietet. Doch muss man auch erkennen, dass viel Forschung nötig ist, um vorhandenes Potential auszuschöpfen. Besondere Herausforderungen sind das Erzielen einer ausreichenden Festigkeit von auf Kollagen basierenden Konstrukten. Auf diesem Gebiet befassten sich neueste Studien mit dem Vernetzen von Kollagen. Mit Crosslinks sollte die Stabilität von Kollagen erhöht werden. Diese Methode basierte auf einer glycosidischen Verbindung einzelner Kollagen-Helices und wurde bereits in Verbindung mit Kollagengels erprobt. Substanzen wie Genipin® oder HDMI® verstärkten diese Verbindung.<sup>92</sup>

Darüber hinaus sollten neue Substanzen in der Lage sein eine bandähnliche extrazelluläre Matrix zu bilden, auf dessen Grundlage sich ligamentäre Strukturen unter schlechten Vaskularisierungsbedingungen bilden können. Intensive Forschungen sind notwendig, da etablierte Operationsmethoden bereits vorhanden sind.<sup>71</sup> Besonderes Augenmerk sollte hierbei auch auf die Angreifbarkeit Kollagen basierender Konstrukte gelegt werden. Postoperative Entzündungsreaktionen und enzymatische Abläufe gilt es zu verhindern um den Träger zu erhalten und eine ausreichende Stabilität zu garantieren. Diese Vorgänge gilt es weiter zu erforschen um eine optimale Umgebung für den Einbau eines ACL-Konstrukts zu schaffen. Um diese Probleme zu lösen ist eine interdisziplinäre Zusammenarbeit von Wissenschaftlern verschiedenster Fachgebiete unter Austausch von Fachwissen unterschiedlicher Labore nötig.

## **5. Zusammenfassung**

Das ACL ist eine der am häufigsten verletzten Strukturen des menschlichen Körpers bei Sportunfällen und die Anzahl der Rekonstruktionen wird weiterhin zunehmen. Eine ACL-Ruptur bedeutet oft zusätzliche Verletzungen im Kniegelenk und eine große Einschränkung bei suboptimaler Versorgung. Es ist nicht nur von klinischer Relevanz, sondern auch von sozioökonomischen Interesse, nach Alternativen auf dem Gebiet der Kreuzbandchirurgie zu forschen. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften von Sehnen und Bändern erzielt. Vor allem im Bereich Tissue Engineering liegen große Hoffnungen, ein ACL-Konstrukt zu entwickeln, welches den natürlichen Eigenschaften eines nativen Kreuzbandes ähnelt. Dieses sollte in der Lage sein sich unter schwierigen Vaskularisierungsbedingungen im Kniegelenk zu einem stabilen Kreuzband umzuwandeln.

Im Hinblick darauf wurden in der vorliegenden Arbeit die biomechanischen Eigenschaften von Kollagen I untersucht. Die Fragestellung beschäftigte sich mit der Möglichkeit ein stabiles ACL-Konstrukt aus Kollagen I herzustellen. Weiterhin wurde das Verhalten dieses ACL-Konstrukts in einer Tierstudie untersucht.

Zunächst wurde Kollagen I aus Rattenschwänzen isoliert und dessen Eigenschaften charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass sich die Kollagenfasern in ihren biomechanischen Eigenschaften in Bezug auf Lieferchargen, Geschlecht, Alter und Größe unterscheiden. Die Ergebnisse zeigten, dass kurze, weibliche Fasern die besten Voraussetzungen für die Entwicklung eines ACL-Konstrukts besitzen.

Die Arbeit stellt die Entwicklungsschritte eines stabilen ACL-Konstrukts aus Kollagen I dar. Es konnte eine Reißkraft von 1153 N für einen Durchmesser von 8 mm erzielt werden. Die anfangs erzielte Maximalkraft von 253 N wurde durch Optimierung des Konstrukts übertroffen. Es wurden verschiedene biomechanische Untersuchungen angewandt und schließlich eine Variante entwickelt, welche eine stabile Verbindung der Fasern sicherstellte, ohne die natürliche Struktur des Kollagens zu beeinflussen. In der biomechanischen Auswertung der Tierstudie wurden marginal signifikante Unterschiede zwischen der 6-Wochengruppe und der 6-Monatsgruppe festgestellt ( $p=0,08$ ). Im Vergleich zur Kontrolle wurden in beiden Gruppen hohe Signifikanzen ermittelt ( $p<0,01$ ). Gründe hierfür waren unzureichende Ligamentisierungs- oder Remodellingprozesse. Die 6-Wochengruppe erreichte 31,8% der Maximalkraft des implantierten ACL-Konstrukts der Variante C, die 6-Monatsgruppe einen Anteil von 63,8%.

Bei der Präparation der Kadaverknie wurden ligamentäre Strukturen im anatomischen Verlauf des nativen ACL gesehen. In der 6-Monatsgruppe wurden bei einigen Tieren Knorpeldestruktionen erkannt.

Die gewonnenen Ergebnisse dienen als Grundlage für die Herstellung eines Kreuzbandkonstruktes. Das Ziel wird sein, ein in vitro hergestelltes Konstrukt aus Kollagen I vor dem Abbau zu schützen um es längerfristig im humanen Kniegelenk zu implantieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Wirth C.J., Kohn D. Erkrankungen und Verletzungen der Menisken und des Kapsel-Band-Apparates. Orthopädie und Orthopädische Chirurgie Georg Thieme Verlag Stuttgart. 2005:246.
2. Miyasaka K.C., Daniel, D.M., Stone, M.L., Hirshman, P., 1991. The incidence of knee ligament injuries in the general population. American Journal of Knee Surgery 4, 3–8.
3. Arendt E, Dick R. Knee injury patterns among men and women in collegiate basketball and soccer. NCAA data and review of literature. Am J Sports Med. 1995 Nov-Dec;23(6):694-701.

4. Von Porat A, Roos EM, Roos H. 2004. High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient relevant outcomes. *Br J Sports Med* 38:263
5. James A. Cooper HHL, Frank K. Ko, Joseph W. Freeman, Laurencina CT. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation . *Science Direct*. 2004.
6. Gottlob CA, Baker CL Jr, Pellissier JM, Colvin L: Cost effectiveness of anterior cruciate ligament reconstruction in young adults. *Clin Orthop Relat Res* 1999:272-282.
7. Beaty JH, (Ed): *Knee and leg: soft tissue trauma. Orthopaedic knowledge update Volume 6. American Academy of Orthopaedic Surgeons: Rosemont, IL; 1999:533*
8. Wilcke A. *Vordere Kreuzbandläsion*. 2004;1:37.
9. Arendt, E., Dick, R., 1995. Knee injury patterns among men and women in collegiate basketball and soccer. NCAA data and review of literature. *American Journal of Sports Medicine* 23 (6), 694–701.
10. Hewett TE. Predisposition to ACL injuries in female athletes versus male athletes. *Orthopedics*. 2008 Jan;31(1):26-8.
11. Chaudhari AM, Zelman EA, Flanigan DC, Kaeding CC, Nagaraja HN. Anterior cruciate ligament-injured subjects have smaller anterior cruciate ligaments than matched controls: a magnetic resonance imaging study. *Am J Sports Med*. 2009 Jul;37(7):1282-7.
12. Shelbourne KD, Davis TJ, Klootwyk TE. The relationship between intercondylar notch width of the femur and the incidence of anterior cruciate

- ligament tears. A prospective study. *Am J Sports Med.* 1998 May-Jun;26(3):402-8.
13. Uhorchak JM, Scoville CR, Williams GN, Arciero RA, St Pierre P, Taylor DC  
Risk factors associated with noncontact injury of the anterior cruciate ligament: a prospective four-year evaluation of 859 West Point cadets. *Am J Sports Med.* 2003 Nov-Dec;31(6):831-42.
  14. Friden T, Roberts D, Ageberg E, Walden M, Zatterstrom R. Review of knee proprioception and the relation to extremity function after an anterior cruciate ligament rupture. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2001 Oct;31(10):567-76.
  15. Aichroth PM, Patel DV, Zorrilla P. The natural history and treatment of rupture of the anterior cruciate ligament in children and adolescents. A prospective review. *J Bone Joint Surg Br.* 2002 Jan;84(1):38-41.
  16. Frank CB, Jackson DW. The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am.* 1997 Oct;79(10):1556-76.
  17. Fithian DC, Paxton EW, Stone ML, Luetzow WF, Csintalan RP, Phelan D, et al. Prospective trial of a treatment algorithm for the management of the anterior cruciate ligament-injured knee. *Am J Sports Med.* 2005 Mar;33(3):335-46.
  18. Pässler H. DA. Die Geschichte der Kreuzbandchirurgie. *ATOS NEWS.* 2008;11:50-61.
  19. Welsh WR. Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule. *Orthopedic Biology and Medicine.* 2006;3:135-42.
  20. Bonnét A. *Traité des maladies des articulations*: Verlag J. B. Baillière; 1945.
  21. Robson AWM. Ruptured Crucial Ligaments and their Repair by Operation. *Annals of Surgery* 1903;37:716-8.

22. Robert J. Disabilities of the Knee-Joint. BR Med Journal. 1916:169-72.
23. Feagin JA, Jr., Curl WW. Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study. Am J Sports Med. 1976 May-Jun;4(3):95-100.
24. Hesse E. Über den Ersatz der Kreuzbänder des Kniegelenks durch freie Fascientransplantation: Deutsche Gesellschaft für Chirurgie; 1914:188-189
25. Groves E.W.H. The crucial ligaments of the knee joint; their function, rupture and the operative treatment of the same. The British Journal of Surgery. 1920;7:505-15.
26. Wittek A. Kreuzbandersatz aus dem Lig. Patellae (nach zur Verth). Swiss Medical Weekly. 1935;65:103-4.
27. Brückner H. Eine neue Methode der Kreuzbandplastik. Chirurg. 1966; 37:413-4.
28. Paavolainen P, Makisalo S, Skutnabb K, Holmstrom T. Biologic anchorage of cruciate ligament prosthesis. Bone ingrowth and fixation of the Gore-Tex ligament in sheep. Acta Orthop Scand. 1993 Jun;64(3):323-8.
29. Jackson DW, Heinrich JT, Simon TM. Biologic and synthetic implants to replace the anterior cruciate ligament. Arthroscopy. 1994 Aug;10(4):442-52.
30. Paulos LE, Rosenberg TD, Grewe SR, Tearse DS, Beck CL. The GORE-TEX anterior cruciate ligament prosthesis. A long-term followup. Am J Sports Med. 1992 May-Jun;20(3):246-52.
31. Murray MM, Spindler KP, Ballard P, Welch TP, Zurakowski D, Nanney LB. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold. J Orthop Res. 2007 Aug;25(8):1007-17.

32. Murphy PG, Loitz BJ, Frank CB, Hart DA. Influence of exogenous growth factors on the expression of plasminogen activators by explants of normal and healing rabbit ligaments. *Biochem Cell Biol.* 1993 Nov-Dec;71(11-12):522-9.
33. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol.* 1989 Jul;109(1):429-40.
34. Bray RC, Rangayyan RM, Frank CB. Normal and healing ligament vascularity: a quantitative histological assessment in the adult rabbit medial collateral ligament. *J Anat.* 1996 Feb;188 ( Pt 1):87-95.
35. Kobayashi D, Kurosaka M, Yoshiya S, Mizuno K. Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in the canine anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1997;5(3):189-94.
36. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct(367 Suppl):S312-23.
37. Frank C, McDonald D, Bray D, Bray R, Rangayyan R, Chimich D, et al. Collagen fibril diameters in the healing adult rabbit medial collateral ligament. *Connect Tissue Res.* 1992;27(4):251-63.
38. Frank C, McDonald D, Wilson J, Eyre D, Shrive N. Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline crosslink density. *J Orthop Res.* 1995 Mar;13(2):157-65.
39. Lo IK, Marchuk LL, Hart DA, Frank CB. Comparison of mRNA levels for matrix molecules in normal and disrupted human anterior cruciate ligaments using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Orthop Res.* 1998 Jul;16(4):421-8.

40. Seiler JG, 3rd, Chu CR, Amiel D, Woo SL, Gelberman RH. The Marshall R. Urist Young Investigator Award. Autogenous flexor tendon grafts. Biologic mechanisms for incorporation. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Dec(345):239-47.
41. Cato T, Laurencin JWF. Ligaments tissue engineering: An evolutionary materials science approach *Science Direct.* 2005;26(2).
42. Bray RC, Leonard CA, Salo PT. Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J Orthop Res.* 2003 Nov;21(6):1118-23.
43. Woo SL, Vogrin TM, Abramowitch SD. Healing and repair of ligament injuries in the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000 Nov-Dec;8(6):364-72.
44. Murray M, Ballard P, Welch T, Zurakowski D, Nanney L. Enhanced Histologic Repair in a Central Wound in the Anterior Cruciate Ligament with a Collagen-Platelet-Rich Plasma Scaffold. *Journal of Orthopaedic Research.* 2006; 20367:1.
45. Berbig R, Rillmann P. [Timing of the surgery of rupture of the anterior cruciate ligament. Effects of acute or delayed surgery on arthrofibrosis rate and work disability]. *Unfallchirurg.* 2000 Sep;103(9):726-30.
46. Marcacci M, Zaffagnini S, Iacono F, Neri MP, Petitto A. Early versus late reconstruction for anterior cruciate ligament rupture. Results after five years of followup. *Am J Sports Med.* 1995 Nov-Dec;23(6):690-3.
47. Shelbourne KD, Wilckens JH, Mollabashy A, DeCarlo M. Arthrofibrosis in acute anterior cruciate ligament reconstruction. The effect of timing of reconstruction and rehabilitation. *Am J Sports Med.* 1991 Jul-Aug;19(4):332-6.

48. Karanikas K, Arampatzis A, Brüggemann GP. Influence on the muscle strength capability of the lower extremity ACL using patella tendon or semitendinosus grafts. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2006;57(4).
49. Lobenhoffer P. Knee ligament injuries. Anatomy, biomechanics, diagnosis, indications. *Chirurg*. 1999 Feb;70(2):219-30.
50. Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials*. 2005 Dec;26(36):7530-6.
51. Petersen W, Tillmann B. Anatomy and function of the anterior cruciate ligament. *Orthopade*. 2002 Aug;31(8):710-8.
52. Halata Z, Haus J. The ultrastructure of sensory nerve endings in human anterior cruciate ligament. *Anat Embryol (Berl)*. 1989;179(5):415-21.
53. Müller A, Fuchs S, Wurm M, Jürgens C. Vordere Kreuzbandersatzplastik. *Trauma und Berufskrankheit*. 2007;9(2):122-7.
54. Ge Z, Yang F, Goh JC, Ramakrishna S, Lee EH. Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jun 1;77(3):639-52.
55. Blankevoort L, Huijkes R. Validation of a three-dimensional model of the knee. *J Biomech*. 1996 Jul;29(7):955-61.
56. Woo SL, Chan SS, Yamaji T. Biomechanics of knee ligament healing, repair and reconstruction. *J Biomech*. 1997 May;30(5):431-9.
57. Ignatius A, Durselen L. Possibilities and limits in tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *Orthopade*. 2009 Nov;38(11):1080-6.

58. Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan R, Kaplan DL. Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:131-56.
59. Ignatius A, Durselen L. [Possibilities and limits in tissue engineering of the anterior cruciate ligament]. *Orthopade.* 2009 Nov;38(11):1080-6.
60. Jung HJ, Fisher MB, Woo SL. Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2009;1(1):9.
61. Sowa G, Sowa D, Koebke J. Alloplastic replacement of the anterior cruciate ligament. Comparative studies of ruptured Dacron, Trevira and Ligapro ligaments. *Unfallchirurgie.* 1991 Dec;17(6):316-22.
62. Murray MM, Spindler KP, Abreu E, Muller JA, Nedder A, Kelly M, et al. Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 2007 Jan;25(1):81-91.
63. Tischer T, Aryee S, Wexel G, Steinhauser E, Adamczyk C, Eichhorn S, et al. Tissue engineering of the anterior cruciate ligament-sodium dodecyl sulfate-acellularized and revitalized tendons are inferior to native tendons. *Tissue Eng Part A.* 2010 Mar;16(3):1031-40.
64. Bellincampi LD, Closkey RF, Prasad R, Zawadsky JP, Dunn MG. Viability of fibroblast-seeded ligament analogs after autogenous implantation. *J Orthop Res.* 1998 Jul;16(4):414-20.
65. Robayo LM, Moulin VJ, Tremblay P, Cloutier R, Lamontagne J, Larkin AM, et al. New ligament healing model based on tissue-engineered collagen scaffolds. *Wound Repair Regen.* 2010 Dec 10.

66. Tremblay P, Cloutier R, Lamontagne J, Belzil AM, Larkin AM, Chouinard L, et al. Potential of skin fibroblasts for application to anterior cruciate ligament tissue engineering. *Cell Transplant*. 2010 Nov 5.
67. Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech*. 2006;39(1):1-20.
68. Haddad-Weber M, Prager P, Kunz M, Seefried L, Jakob F, Murray MM, et al. BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells. *Cytotherapy*. 2010 Jul;12(4):505-13.
69. Steinert AF, Weber M, Kunz M, Palmer GD, Noth U, Evans CH, et al. In situ IGF-1 gene delivery to cells emerging from the injured anterior cruciate ligament. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(7):904-16.
70. Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan R, Kaplan DL. Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:131-56.
71. Ignatius A, Durselen L. Possibilities and limits in tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *Orthopade*. 2009 Nov;38(11):1080-6.
72. Heckmann L, Schlenker HJ, Fiedler J, Brenner R, Dauner M, Bergenthal G, et al. Human mesenchymal progenitor cell responses to a novel textured poly(L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Apr;81(1):82-90.
73. Lu HH, Cooper JA, Jr., Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials*. 2005 Aug;26(23):4805-16.

74. Fan H, Liu H, Toh SL, Goh JC. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(28):4967-77.
75. Sonnery-Cottet B, Lavoie F, Ogassawara R, Kasmaoui H, Scussiato RG, Kidder JF, et al. Clinical and operative characteristics of cyclops syndrome after double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2010 Nov;26(11):1483-8.
76. Ahn JH, Yoo JC, Yang HS, Kim JH, Wang JH. Second-look arthroscopic findings of 208 patients after ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2007 Mar;15(3):242-8.
77. Tang Z, Yang L, Wang Y, Xue R, Zhang J, Huang W, et al. Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture. *J Orthop Res*. 2009 Feb;27(2):243-8.
78. Tang Z, Yang L, Zhang J, Xue R, Wang Y, Chen PC, et al. Coordinated expression of MMPs and TIMPs in rat knee intra-articular tissues after ACL injury. *Connect Tissue Res*. 2009;50(5):315-22.
79. Boguszewski DV, Shearn JT, Wagner CT, Butler DL. Investigating the effects of anterior tibial translation on anterior knee force in the porcine model: Is the porcine knee ACL dependent? *J Orthop Res*. 2010 Dec 23.
80. Zantop T, Petersen W. Anatomical reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Arthroscopie* 2009;20 Number 2 (2007), 94-104.
81. Blankevoort L, Huiskes R, de Lange A. Recruitment of knee joint ligaments. *J Biomech Eng*. 1991 Feb;113(1):94-103.
82. Connor G, Ziegler SDP, Benjamin D, Westerhaus, Colin J, Anderson, Coen A, Wijdicks, Steinar Johansen, . Anterior Cruciate Ligament Reconstructions

Arthroscopically Pertinent Landmarks for Tunnel Positioning in Single-Bundle and Double-Bundle. *Am J Sports Med.* 2011;39:743.

83. <http://shop.labbe.de/techniken/naehen-weben-sticken/strickliesel.html>

84. Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A. Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008 Sep;16(9):834-42.

85. Ekdahl M, Wang JH, Ronga M, Fu FH. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008 Oct;16(10):935-47.

86. Müller A, Fuchs S, Wurm M, Jürgens C. Vordere Kreuzbandersatzplastik. *Trauma und Berufskrankheit.* 2007;9(2):122-7.

87. Chen J, Xu J, Wang A, Zheng M. Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices.* 2009 Jan;6(1):61-73.

88. Mascarenhas R, MacDonald PB. Anterior cruciate ligament reconstruction: a look at prosthetics--past, present and possible future. *Mcgill J Med.* 2008 Jan;11(1):29-37.

89. Bundesministerium für Gesundheit

<http://www.bmg.bund.de/gesundheitsystem/medizinprodukte/was-sind-medinprodukte.htm>

90. Silver FH, Tria AJ, Zawadsky JP, Dunn MG. Anterior cruciate ligament replacement: a review. *J Long Term Eff Med Implants.* 1991;1(2):135-54.

91. Arthro Kinetics, Heidelberg

[http://www.arthro-kinetics.com/de/die\\_produkte/arzt\\_informationen/cares\\_1s/produktinformationen\\_cares\\_1s](http://www.arthro-kinetics.com/de/die_produkte/arzt_informationen/cares_1s/produktinformationen_cares_1s)

92. Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, Chabal YJ, Miksan JR, Shreiber DI. Genipin-induced changes in collagen gels: correlation of mechanical properties to fluorescence. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Nov;87(2):308-20.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meinen persönlichen Dank an alle Menschen richten, die mich während der Dauer dieser Arbeit so tatkräftig unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Nöth für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die umfassend kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Großen Dank schulde ich Frau Dr. Meike Haddad-Weber, sowie ihrem Mann Dr. Daniel Haddad für die hilfreiche Unterstützung im Labor und die wertvollen Ratschläge beim Erstellen dieser Arbeit. Sie hatten stets ein offenes Ohr für auftauchende Probleme und gaben Anregungen für die weitere Arbeit.

Besonderen Dank gilt Dr. med. Lars Rackwitz für die Durchführung der Operationen und den Mitarbeitern des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin Würzburg, insbesondere Herrn Peter Heuler, für die Unterstützung während der Tierstudie.

An alle Mitarbeiter des Orthopädischen Zentrums für Muskuloskelettale Forschung, insbesondere Kirsten Langenbrink, einen herzlichen Dank.

Auch bedanken möchte ich mich bei Sören Pietruschka, der mich bei vielen biomechanischen Versuchen unterstützt hat.

Ein ausdrücklicher und herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich jederzeit unterstützt haben. Dies gilt auch für meinen Bruder und für meine Freunde, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.