

Veränderungen der zellulären und extrazellulären Matrix
innerhalb der Knochen-Material-Grenzfläche von
Biokomposit-Interferenzschrauben

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dahlke, Stefan
aus Wetzlar

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Experimentelle Unfallchirurgie
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter:
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß

Gutachter:
Prof. Dr. med. Bernd Ishaque

Tag der Disputation:
14. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Aufbau des Knochens.....	3
2.1.1	Makroskopie.....	3
2.1.2	Mikroskopie.....	5
2.2	Spezifische Zellen des Knochens.....	8
2.2.1	Osteozyten.....	8
2.2.2	Osteoblasten und Mineralisation.....	9
2.2.3	Osteoklasten.....	10
2.3	Knochenumbau und Frakturheilung.....	11
2.3.1	Knochenumbau.....	11
2.3.2	Frakturheilung.....	14
2.4	Anatomie des Kniegelenks.....	15
2.4.1	Knöchernen Strukturen.....	16
2.4.2	Kapsel-Bandapparat und Menisken.....	16
2.4.3	Kreuzbänder.....	18
2.5	Traumatische Verletzungen des vorderen Kreuzbandes.....	19
2.5.1	Diagnostik.....	21
2.5.2	OP-Indikation.....	22
2.6	Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes.....	23
2.6.1	Operationszeitpunkt.....	23
2.6.2	Transplantate.....	24
2.6.3	Operation.....	25
2.6.4	Fixierung.....	26
2.6.5	Postoperative Komplikationen.....	28
2.6.6	Nachbehandlung und Prognose.....	28
2.7	Interferenzschrauben.....	30
2.7.1	Werkstoffe.....	30
2.7.1.1	Bioresorbierbare Polymere.....	30
2.7.1.2	Biokeramiken.....	31
2.7.2	Biokompositmaterialien in Verwendung als Interferenzschraube.....	32
2.7.3	Transplantateinheilung im Knochentunnel.....	34
3	Zielsetzung.....	35
4	Material und Methoden.....	37
4.1	Versuchstiere.....	37
4.2	Studiendesign.....	37

4.3	Tierhaltung.....	39
4.4	Operationsablauf.....	39
4.4.1	OP-Vorbereitung und Anästhesie.....	39
4.4.2	Entnahme des autologen Sehnenmaterials	41
4.4.3	Vordere Kreuzbandrekonstruktion	42
4.4.4	OP-Ausleitung und Wundverschluss.....	43
4.5	Postoperative Versorgung.....	43
4.6	Euthanasie und Probenentnahme.....	44
4.7	Verarbeitung der Knochenproben	44
4.8	PMMA Einbettung mit Technovit® 9100	45
4.8.1	Entstabilisieren der Basislösung zur Fixierung	45
4.8.2	Herstellung der Gebrauchslösungen.....	46
4.8.3	Fixierung, Entwässerung und Infiltration.....	46
4.8.4	Polymerisation.....	47
4.9	Bildgebung mit dem Mikro-CT	48
4.10	Zurechtschneiden des Probematerials	48
4.11	Herstellung der Mikroskopier-Präparate	49
4.12	Färbungen	50
4.12.1	Movat-Pentachrom-Färbung.....	51
4.12.2	Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung	51
4.12.3	Alkalische Phosphatase (ALP) Färbung.....	52
4.12.4	α -Smooth-Muscle-Actin (ASMA) Färbung	52
4.12.5	Silbernitrat	53
4.13	Fotomikroskopie	54
4.14	Software.....	54
4.14.1	Bildbearbeitung	54
4.14.2	Statistik.....	54
5	Ergebnisse.....	56
5.1	Mikro-CT-Bilder	56
5.2	Movat-Pentachrom-Färbung.....	58
5.3	Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung	63
5.4	Alkalische Phosphatase (ALP) Färbung.....	71
5.5	α -Smooth-Muscle-Actin (ASMA) Färbung	75
5.6	Silbernitrat	81
6	Diskussion.....	85
6.1	Unzureichendes Degradationsverhalten der Schrauben mit deutlicher Heterogenität	87
6.2	Unzureichende Mineralisation im Schraubenkanal.....	90
6.3	Keine signifikante Änderung der Zahl von Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten	93
6.4	Weiterhin anhaltender Heilungsprozess nach 52 Wochen	95

6.5	Allgemeine Bewertung	96
7	Zusammenfassung	99
8	Summary	100
9	Anhang	101
10	Literaturverzeichnis	108
11	Abbildungsverzeichnis	114
12	Tabellenverzeichnis	115
13	Abkürzungsverzeichnis	116
	Ehrenwörtliche Erklärung	117
	Danksagung	118

1 Einleitung

Knien Gelenksschädigungen, insbesondere die Ruptur des vorderen Kreuzbandes, zählen zu den häufigsten Verletzungen des menschlichen Bewegungsapparates und werden zu einer stetig wachsenden, medizinischen Herausforderung. Zwar machen Leistungssportler oder Hobbyathleten einen hohen Anteil an der Patientenkohorte aus, angesichts der zunehmend aktiveren Lebens- und Freizeitgestaltung der Bevölkerung ist diese Verletzung aber auch im privaten und alltäglichen Bereich immer häufiger vertreten [62, 70]. Neben primären Präventionsversuchen, wie dem Stärken der Muskulatur, propriozeptiven Training, spezieller Techniken beim Sport oder Vermeiden falscher Bewegungen, hat abgesehen von konservativen Therapieversuchen vor allem die operative Versorgung, sowie deren Weiterentwicklung und Optimierung, einen hohen Stellenwert in der Behandlung von Kreuzbandverletzungen. Idealerweise wird dabei das rupturierte Kreuzband durch ein körpereigenes Sehnen-Transplantat ersetzt. Im Rahmen der Kreuzbandrekonstruktion liegt dabei der Fokus der Entwicklung stark auf der Verbesserung und Neuentwicklung der Fixierungsmethoden dieser transplantierten Sehnen.

Die Behandlungskosten einer Kreuzbandrekonstruktion belaufen sich in Deutschland im Schnitt auf 2000 bis 3500 Euro [27] und steigen nochmals durch die nachfolgenden Rehabilitationsmaßnahmen. Ebenfalls besteht das Risiko einer Resektionsoperation, die die Gesamtkosten weiter erhöhen kann. Aufgrund der hohen Inzidenz dieser Verletzung stellt sie so eine deutliche, ökonomische Belastung des Gesundheitswesens dar.

Eine der heutzutage gängigsten Methoden bei der Kreuzbandrekonstruktion ist die Nutzung von Interferenzschrauben, welche das Transplantat innerhalb des Knochens fixieren. Diese Interferenzschrauben bestehen entweder aus Metall (Titan, Edelstahl), resorbierbaren Polymeren (z. B. PLA, PLGA) oder Kompositwerkstoffen (z. B. PLA und Hydroxylapatit) [68]. Jeder dieser verwendeten Werkstoffe hat jedoch gewisse Vor- und Nachteile bei seiner Anwendung im Rahmen der Rekonstruktion und des folgenden Heilungsprozesses. Der Wechsel von metallischen Interferenzschrauben hin zu bioresorbierbaren Schrauben auf Basis von Polymilchsäure kann zwar eine zweite Operation z. B. zur Metallentfernung im Idealfall verhindern, trotzdem können Komplikationen wie Schraubenbrüche, bakterielle Entzündungen oder Fremdkörperreaktionen auftreten [18].

Schrauben allein aus Polymeren aufgebaut können durch ihre Zerfallsprodukte im schlimmsten Fall sogar zur Osteolyse führen [12]. Zur Lösung dieses Problems wurden deshalb Biokompositmaterialien entwickelt. Allerdings besteht aufgrund des überwiegenden Polymeranteils dieser Schrauben nur ein gering ausgeprägter Effekt für eine Knochenneubildung. Damit kann auch die Verwendung dieser Komposit-Schrauben mitunter erneute operative Eingriffe nötig machen, um beispielsweise Lockerungen oder Knochendefekte zu korrigieren. Die zentrale Anforderung an die verwendeten Materialien ist daher eine sicher gewährleistete Stabilität bei zugleich guter Bioverträglichkeit und Bioresorbierbarkeit. Da eine optimale Lösung noch nicht gefunden werden konnte, sind weitere Studien zum besseren Verständnis des Resorptions- und Heilungsverhaltens dieser Schrauben unerlässlich.

Untersuchungsgegenstand dieser Studie war eine gängige Interferenzschraube aus einem Gemisch bioresorbierbarer Polymere und Biokeramiken innerhalb eines Großtiermodells. Als Versuchsspezies wurde aus folgenden Gründen das Schaf gewählt: Frühere Tests an verschiedenen Tierspezies ergaben, dass die Biomechanik der Gelenke des Schweins dem Menschen zwar am ähnlichsten ist, aber auch Mensch und Schaf sehr gut vergleichbar sind [92]. Das Schaf als Modell hat sich bereits bei vielen Studien auf Grund der guten Verfügbarkeit und der unproblematischen Haltung bewährt, daher bestehen eine Vielzahl an Daten aus Vorgängerstudien. Ferner haben kinematische Studien nachgewiesen, dass das Gangbild von Mensch und Schaf sich stark ähneln [76]. Wesentlich wichtiger ist aber, dass die Remodellingprozesse beider Spezies zellulär und vom zeitlichen Ablauf sehr gut vergleichbar sind [64].

Ziel der hier vorgestellten experimentellen Studie war es herauszufinden, ob die untersuchte Biokompositschraube die technisch geforderten Eigenschaften hinsichtlich der Einheilung und des Abbauverhaltens erfüllt und mit ihrem Verhalten im Organismus den steigenden Ansprüchen der heutigen Medizin gewachsen ist, oder ob diese Schrauben trotz optimaler Abstimmung der verwendeten Komponenten hinter den oben genannten Anforderungen an solch ein Medizinprodukt zurückbleiben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Aufbau des Knochens

2.1.1 Makroskopie

Das knöcherne, menschliche Skelett bildet den passiven Anteil des Bewegungsapparates. Die einzelnen Knochen sind mittels bindegewebiger Strukturen als Gelenke miteinander verbunden und sind Ansatz- und Ursprungspunkte der Muskulatur. Der Bewegungsumfang und die Freiheitsgrade der Bewegung richten sich jeweils nach Art des Gelenks und seiner Fixierung. Neben der Stütz- und Bewegungsfunktion erfüllen die Knochen des Skelettes auch eine Schutzfunktion, sodass leicht verletzliche Organe von eventuellen Traumata verschont bleiben oder diese abgeschwächt werden. Beispiele dafür sind einerseits der knöcherne Thorax, welcher zum Beispiel Herz und Lunge vor schwerwiegenderen Verletzungen schützen kann, oder auch die Schädelkalotte als Protektion für das Gehirn [4, 63]. Das knöcherne Skelett erfüllt aber nicht nur physikalische Aufgaben, sondern trägt auch einen hohen Anteil an der Homöostase des Körpers. Aufgrund der chemischen Zusammensetzung bilden die Knochen des Skelettes den größten Kalziumspeicher im Körper und sind so Teil der stetig ablaufenden Regulationsprozesse des Kalziumhaushaltes. Auch an der Hämatopoese sind die Knochen beteiligt. Findet diese während der embryonalen und fetalen Entwicklung noch in der Leber statt, so verlagert sie sich dann nach der Geburt in die Markhöhlen [4, 50, 63].

Grundsätzlich wird Knochengewebe anhand seiner Organisationsstruktur in Geflechtknochen und Lamellenknochen aufgeteilt. Geflechtknochen entsteht vor allem in der Embryonalentwicklung direkt aus Kollagenfibrillen; er wird deswegen auch als primärer Knochen bezeichnet. Auch im Rahmen von Heilungsprozessen wird primär Geflechtknochen gebildet. Im späteren Verlauf der Entwicklung wird Geflechtknochen dann zum finalen Lamellenknochen reorganisiert; der Hauptauslöser für diesen Umbau ist das Auftreten von mechanischer Belastung auf den Knochen. Fast alle Knochen des erwachsenen Skelettes sind als Lamellenknochen angelegt; dieser zeichnet sich durch eine besondere Organisation der extrazellulären Matrix aus und wird in zwei Strukturen unterteilt.

Die *Substantia compacta* ist dicht und ohne Zwischenräume organisiert. Sie bildet mit bis zu 10 mm Dicke das Grundgerüst des Knochens und gibt seine eigentliche Form vor. Der Kompakta außen aufgelagert befindet sich das Periost.

Der zweite Anteil stellt sich als spongiös vernetzte Knochenbälkchen dar (*Substantia spongiosa*). Ihre Wachstumsrichtung wird durch die einwirkende Belastung bestimmt. Durch diese trajektionelle Organisation wird der Knochen biegefest und kann so den einwirkenden Druck- oder Zugkräften standhalten. Die Spongiosa und die ihr innen angrenzenden Hohlräume bilden die Markhöhle des Knochens, sie ist von Endost ausgekleidet [4, 50, 63].

Je nach Literatur [4, 20, 24, 97] finden sich unterschiedliche Angaben für die Anzahl an Knochen des menschlichen Skeletts. Unumstritten bleibt aber, dass diese sich trotz analogem Grundaufbau stark in Größe, Form und Funktion unterscheiden. Sie werden anhand ihrer äußeren Form unterteilt in:

- 1) lange Knochen (*Ossa longa*), zu denen die Röhrenknochen der unteren und oberen Extremitäten gehören,
- 2) kurze Knochen (*Ossa brevia*), wie Hand- und Fußwurzelknochen,
- 3) platte Knochen (*Ossa plana*), wozu das Schulterblatt und die Schädelkalotte gehören,
- 4) luftgefüllte Knochen (*Ossa pneumatica*), deren Hohlräume mit Schleimhäuten ausgekleidet sind, wie die Nasennebenhöhlen und
- 5) irreguläre Knochen (*Ossa irregularia*). In diese Gruppe fallen unter anderem die Wirbelkörper und Sesambeine wie beispielsweise die Kniescheibe [4].

Die Röhrenknochen der Extremitäten, dazu zählen ebenfalls kurze Knochen wie z. B. die Mittelhandknochen, folgen ebenfalls einem strukturierten Aufbau (Abb. 1). Der Schaft (Diaphyse) ist, wie der Name impliziert, röhrenförmig angelegt. An seinen distalen und proximalen Enden finden sich jeweils die mit Knorpel bedeckten Epiphysen, diese bilden die Gelenkflächen. Die meist etwas verbreiterte Metaphyse markiert den Übergangsbereich dieser beiden Anteile. Während des Längenwachstums des Knochens befindet sich hier die beim erwachsenen Skelett verknöcherte Epiphysenfuge. Epiphyse und Metaphyse sind von einer recht geringen *Substantia compacta* bedeckt.

Da an diesen Stellen jedoch die größte, direkte Krafteinwirkung erfolgt, findet sich hier ein dichtes Netzwerk an trajektionell ausgerichteter Spongiosa, um die auftretende Belastung auf die Diaphyse abzuleiten. Diese weist eine relative dicke Kortikalis auf und kann aufgrund ihrer Form die einwirkenden Kräfte gut kompensieren. Durch die Kortikalis wird der Markraum abgegrenzt (*Cavum medullare*). Hier und in der Spongiosa liegt das Knochenmark. Mit zunehmendem Alter verringert sich jedoch der blutbildende, rote Anteil und es bildet sich gelbes, fettreiches Knochenmark. Die Durchblutung erfolgt von außen durch die *Arteriae nutriticiae*, die durch entsprechende *Foramina* bis in den Markraum ziehen. Das trajektionelle Bauprinzip des Knochens sorgt für eine hohe Stabilität bei einem relativ geringen Substanzbedarf, dadurch wird das Gewicht geringgehalten, was wiederum in einer steigenden Beweglichkeit resultiert. Ebenfalls werden Nährstoffbedarf und Energieverbrauch des Gewebes reduziert [4, 50, 63].

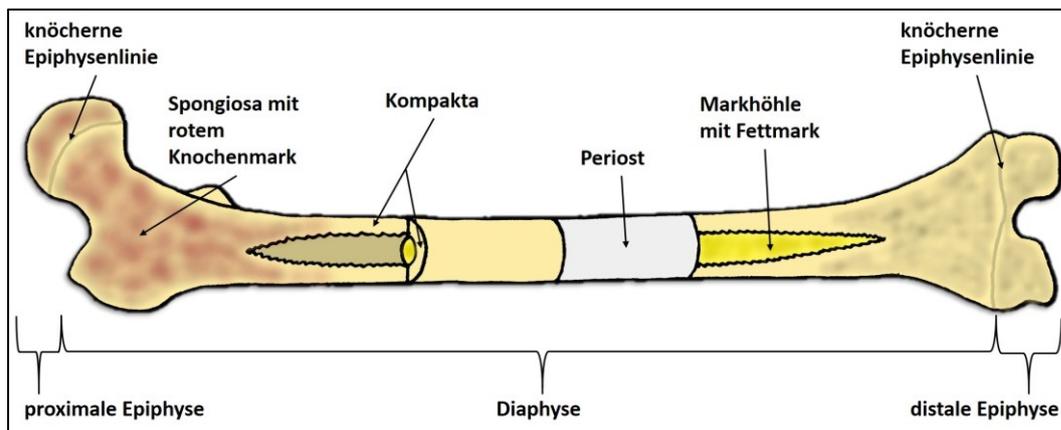


Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau des Röhrenknochens (Schema); Frontaler Längsschnitt durch den proximalen und distalen Anteil eines menschlichen *Femur*. Der mittlere Diaphysenbereich mit Periost ist erhalten. Nach Schünke et al. [63].

2.1.2 Mikroskopie

Knochengewebe setzt sich zusammen aus der Extrazellulärmatrix (EZM) und den spezifischen Knochenzellen. Chemisch besteht es zu 45 % aus anorganischen Mineralien, zu 30 % aus organischem Material und zu 25 % aus Wasser [50]. Die EZM ist die formbestimmende Grundsubstanz des Knochens. Ihr Hauptbestandteil sind längliche, hexagonale Hydroxylapatitkristalle aus Kalzium- und Phosphat-Ionen ($\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$), die sich im Zuge der Mineralisation longitudinal an ein Gerüst aus Kollagenfibrillen (hauptsächlich Kollagen Typ I) anlagern. Ihre Wachstumsrichtung wird dabei maßgeblich von der Verlaufsrichtung der Kollagenfibrillen vorgegeben.

Einen wesentlich geringeren Anteil der EZM machen Proteoglykane, Glykoproteine und andere Ionen (z. B. Magnesium, Fluorid, Carbonat) aus. Die hohe Stabilität des Knochens ist letztlich das Produkt einer Kombination aus den druckstabilen Hydroxylapatitkristallen und zugstabilen Kollagenfibrillen der EZM sowie ihre Organisation in Kortikalis und Spongiosa [4, 50, 87].

Bis auf wenige Ausnahmen ist der Lamellenknochen die vorherrschende Organisationsform der EZM im erwachsenen Skelett (Abb. 2). Die kleinsten Baueinheiten sind die namensgebenden Lamellen. Sie sind ca. 3–7 µm dick und die Kollagenfibrillen innerhalb einer solchen Lamelle sind gleichförmig ausgerichtet. 5–20 dieser Lamellen bilden schließlich das annähernd zylindrische Osteon von ca. 100–400 µm Durchmesser [50]. Im Osteon liegen die Lamellen, ausgehend von einem zentralen Knochenkanal (Havers-Kanal), konzentrisch angeordnet. Die Ausrichtung der Kollagenfibrillen verläuft dabei schräg in Schraubentouren und wechselt von Lamelle zu Lamelle die Richtung. Innerhalb der longitudinal laufenden Havers-Kanäle liegt jeweils ein arterielles Gefäß (Havers-Gefäß). Über weitere, transversal verlaufende Gefäßausläufer sind die Havers-Kanäle untereinander verbunden. Diese Querverbindungen innerhalb des Knochens werden auch als Volkmann-Kanäle (*Canales perforantes*) bezeichnet. Zwischen den einzelnen Lamellen liegen die, während der Mineralisation eingemauerten, Osteozyten. Ihnen ist es möglich lamellenübergreifend zu kommunizieren. Verbindungen von Osteozyten zwischen verschiedenen Osteonen sind aufgrund einer die Osteone umgebenden Zementlinie jedoch nur begrenzt vorhanden. Zwischen den rundlich–ovalen Osteonen werden die Zwischenräume durch sogenannte Schaltlamellen aufgefüllt. Sie sind Überreste alter Osteone und im Zuge des stetigen Knochenumbaus entstanden. Beim Aufbau neuer Osteone wurden sie unvollständig resorbiert. Die so zusammengesetzte *Substantia compacta* aus Osteonen und Schaltlamellen wird jeweils noch von inneren und äußeren Generallamellen umgeben, welche die komplette Zirkumferenz des Knochens umfassen [4, 50, 87].

Die Havers-Kanäle und die Spongiosatrabekel werden von Endost, bestehend aus einer dünnen Schicht nicht-mineralisierter Kollagenfasern und einer kontinuierlich angeordneten Zelllage ruhender Osteoblasten (lining cells; Saumzellen), ausgekleidet. Weiterhin finden sich im Endost auch mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Ausgehend von diesen Zellen werden Reparations- und Umbauvorgänge im Knochen eingeleitet.

Der äußeren Generallamelle aufliegend findet sich das gut innervierte und vaskularisierte, zweischichtige Periost. Das *Stratum osteogenicum* hat direkten Kontakt zur Knochenoberfläche und beinhaltet die gleichen Zellen wie auch das Endost. Sie sind an dieser Stelle für die Umfangszunahme des Knochens zuständig. Das *Stratum osteogenicum* wird vom bindegewebigen *Stratum fibrosum* überdeckt. Seine Ausläufer aus Kollagenfasern (Sharpey-Fasern) strahlen durch das *Stratum osteogenicum* hindurch in die äußere Generallamelle ein und befestigen so das Periost am Knochen [4, 50, 87].

Auch die Trabekel des spongiösen Knochens sind aus Lamellen aufgebaut. Hier liegen sie allerdings nicht als Osteone vor, sondern sind flächig angeordnet und verlaufen parallel zu deren Oberfläche. Des Weiteren werden die Trabekel nicht durch eigene Gefäße versorgt. Die Alimentation der Knochenzellen findet durch Diffusion aus den Gefäßen des Knochenmarks statt [50, 87].

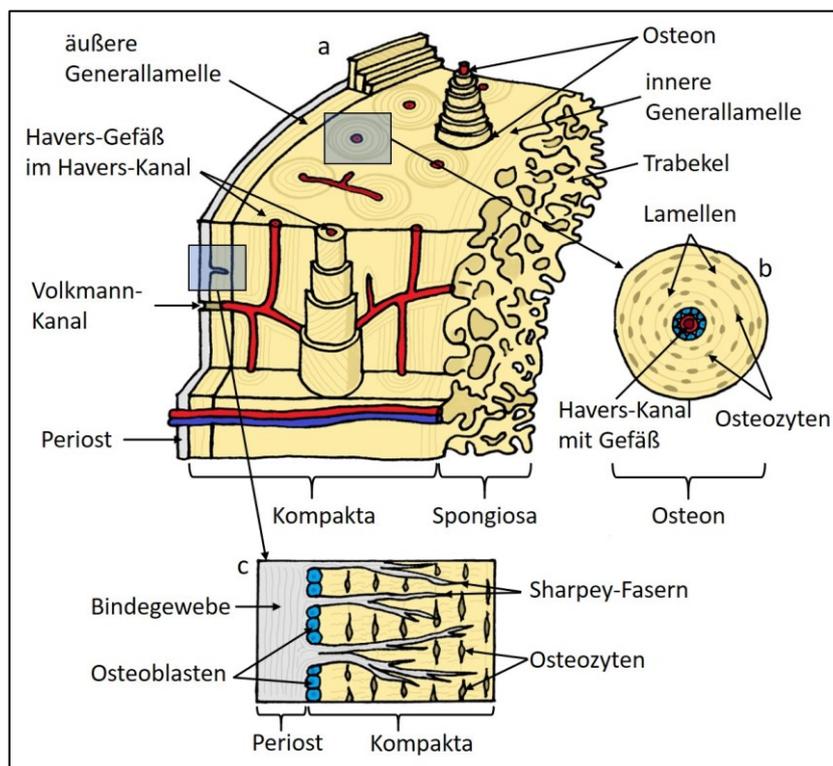


Abbildung 2: Mikroskopischer Aufbau des Knochens; (a): Vergrößerter Ausschnitt der Kompakta mit Osteonen, Haverskanälen, Volkmannkanälen, Schalt- und Generallamellen. (b): Das Osteon wird als Feinausschnitt aus (a) und im vergrößerten Querschnitt dargestellt. (c): In Abschnitt c ist die Verankerung des Periosts im Knochen gezeigt. Nach Schünke et al. [63].

Der vor allem in der fetalen Entwicklung und bei Frakturheilung gebildete Geflechtknochen kann im ausgewachsenen Skelett nur an wenigen Stellen nachgewiesen werden. So findet er sich z. B. noch in den Schädelnähten oder im Labyrinth der *Pars petrosa* des *Os temporale*. Er ist bei einem höheren Wassergehalt weniger mineralisiert als Lamellenknochen und enthält relativ viele Knochenzellen. Durch ihre Organisation in Bündeln und deren zufällige Anordnung entsteht aus den Kollagenfibrillen des Geflechtknochens ein unorganisiertes Netz als Grundgerüst für die Mineralisation. Erst im weiteren Verlauf des Knochenumbaus wird dieser primäre Knochen durch organisierten Lamellenknochen ersetzt [4, 50, 87].

2.2 Spezifische Zellen des Knochens

2.2.1 Osteozyten

Osteozyten liegen in linsenförmigen Lakunen zwischen den einzelnen Knochenlamellen. Ausgehend von diesen Lakunen verlaufen jeweils senkrecht und parallel zu den Lamellen kleine Knochenkanälchen, die die Knochenmatrix als regelrechtes Netz durchziehen und die Lakunen miteinander verbinden. In diesen Kanalikuli liegen die dendritischen Zellfortsätze der Osteozyten. Die Lakunen und die Kanalikuli werden von den Zellbestandteilen der Osteozyten nicht komplett ausgefüllt, sondern es bleibt ein perizellulärer Spalt bestehen, der nur interstitielle Flüssigkeit und Kollagen enthält. So ist es möglich, die Ernährung der eingeschlossenen Osteozyten, ausgehend vom Havers-Gefäß, durch Diffusion zu gewährleisten. Die Vernetzung der Zellen und ihrer Dendriten findet mittels Gap-junctions statt. Diese ubiquitären Zellverbindungen finden sich unter anderem zwischen den einzelnen Osteozyten, sowie zwischen den Osteozyten und den Saumzellen des Endosts. Osteozyten fungieren im Knochen als Mechanorezeptoren und über ihre interzellulären Verbindungen können sie so Informationen über Beanspruchung und Belastungsgrad des Knochengewebes an die aktiven Zellreihen vermitteln. Des Weiteren wirken sie als trophische Zentren, denn dort wo im spongiösen Knochen Osteozyten absterben, werden Osteoklasten aktiviert, um den Knochenumbau einzuleiten [50, 87].

2.2.2 Osteoblasten und Mineralisation

Die Osteoblasten entwickeln sich unter dem Einfluss von BMP-2 (bone morphogenetic protein) aus sogenannten Osteoprogenitorzellen, welche wiederum als prädeterminierte Abkömmlinge aus einer mesenchymalen Stammzellreihe hervorgegangen sind. Aus diesem Vorrat an Osteoprogenitorzellen können so zeitlebens neue Osteoblasten gebildet werden. Ihre Hauptfunktion ist die Synthese von Kollagen als Grundgerüst des Knochens und die Mineralisation der EZM. Daneben steht ihre Rolle in der Regulation des Knochenabbaus und -umbaus. Durch Kommunikation mit den Osteoklasten sind sie auch entscheidend an diesen Prozessen beteiligt. Osteoblasten sind an den freien Grenzflächen entweder im Endost des Knochens oder an der Außenseite als Teil des Periosts zu finden. Bei aktivem Wachstum sitzen die kubisch bis prismatisch geformten, ER-reichen (ER = endoplasmatisches Retikulum) Zellen dort als epithelartige Schicht auf der mineralisierten Knochenmatrix. Die Osteoblasten und die bereits mineralisierten Matrix trennt ein schmaler, von den Zellen produzierter Osteoidsaum aus Kollagenfibrillen. Dieser dient als Grundgerüst für den Mineralisationsprozess. Während dieses Vorgangs werden unter anderem Osteoblasten in der synthetisierten EZM eingeschlossen und bleiben als Osteozyten zurück. Nach Abschluss der Osteogenese gehen die meisten Osteoblasten durch Apoptose (programmierter Zelltod) zu Grunde. Ein Teil der Osteozyten der äußersten Lamelle bleibt jedoch erhalten. Diese kehren in die Ruhephase als Saumzellen des Endosts oder Periosts zurück (Abb. 3) [50, 87].

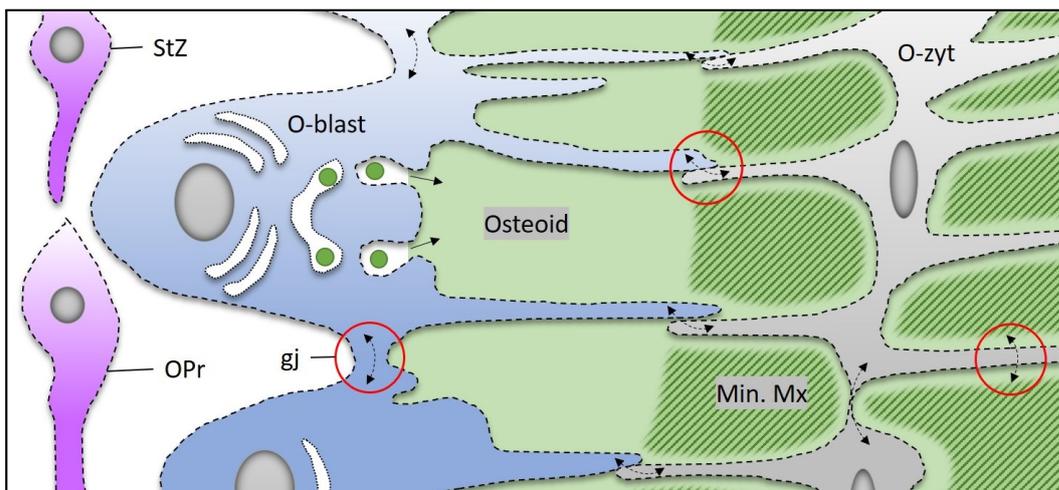


Abbildung 3: Osteoblasten und Osteoid (Schema); Osteoblasten sezernieren Bestandteile des Osteoids (hellgrün). Sie sind durch Gap junctions verbunden (gj, rote Kreise). O-zyt = eingemauerte Osteozyten mit nicht-mineralisiertem Matrixsaum; min. Mx (dunkelgrün) = mineralisierte Matrix, OPr = Osteoprogenitorzellen; StZ = mesenchymale Stammzellen. Nach Lüllmann-Rauch [50].

Grundlage der Mineralisation ist die Entstehung von Hydroxylapatitkristallen aus Kalzium- und Phosphat-Ionen. Für ihre Entstehung werden hohe Ionenkonzentrationen oberhalb der Löslichkeitsgrenze, sowie Kristallisationskerne zum Start der Reaktion benötigt. Die Mineralisation beginnt innerhalb abgeschnürter Matrixvesikel am basalen Pol der Osteoblasten, die Aufnahme der benötigten Substrate erfolgt am apikalen Pol. In der Lipidmembran der Vesikel verankerte, alkalische Phosphatasen spalten anorganische Phosphate und Pyrophosphat, welches die Mineralisation hemmen würde, in die benötigten Phosphat-Ionen und bedingen so eine starke Konzentrationserhöhung innerhalb der Vesikel. Im Vesikel entstehen nun mittels kalziumbindender Moleküle die ersten Kristalle. Durch das anhaltende Wachstum wird die Vesikelmembran letztlich zerstört und die Kristalle gelangen in den extrazellulären Raum. Dort wachsen die Kristalle weiter und lagern sich dem Gerüst aus Kollagenfibrillen an [50, 87].

2.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten entstehen durch Fusion mehrerer, einkerniger Vorläuferzellen (Abb. 4). Die reifen Zellen sind ca. 50–100 µm groß und können bis zu zehn Zellkerne enthalten. Ihre Aufgabe ist der Abbau der mineralisierten Knochenmatrix innerhalb von Resorptionslakunen (Howship-Lakunen), dort liegen sie dem Knochen direkt an. Bei Aktivierung der Osteoklasten entsteht an den Resorptionsstellen eine Versiegelungszone. Mit Hilfe von Integrinen und Aktinfilamenten haftet die Zelle fest an der Matrixoberfläche und schafft so einen abgeschlossenen Raum. Die vom Endosomen-Lysosomen-Apparat stammende Plasmamembran an der Vorderseite des Osteoklasten weist innerhalb dieser Resorptionszone eine starke Oberflächenvergrößerung durch Faltung auf (ruffled border). Dort finden sich auch vermehrt H^+ -ATPasen, die als Enzyme Protonen in die abgeschlossene Resorptionszone transportieren und somit den pH-Wert bis auf 4,5 absenken. Diese Säuresekretion ist notwendig, um die in der mineralisierten EZM enthaltenen Kalzium-Phosphat-Verbindungen aufzulösen. Der Abbau der organischen Matrixbestandteile erfolgt hingegen mittels lysosomaler Enzyme (z. B. Cathepsin K). Die dabei entstehenden Matrixfragmente werden letztlich durch Endozytose (Aufnahme durch Einstülpung der Zellmembran) resorbiert. Nach dem Prinzip der Transzytose durchwandern sie den Osteozyten, der die Substrate auf seiner glatten Rückseite wieder abgibt.

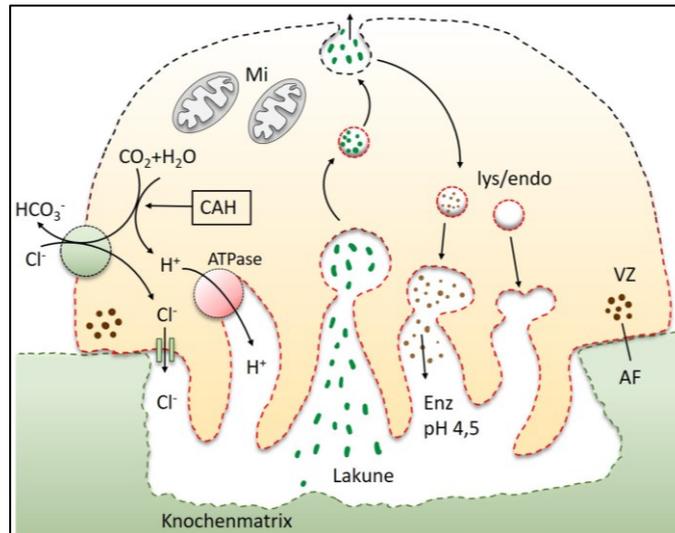


Abbildung 4: Funktion eines Osteoklasten (Schema); Bereitstellung der Protonen durch die Carboanhydrase (CAH) und aktiver Transport dieser Protonen durch die H^+ -ATPase (roter Punkt) in die Resorptionslücke. Sekretion lysosomaler (lys) Enzyme, der Faltenbesatz wird in Rot dargestellt, da die Membran von den Endosomen (endo) stammt. Matrixfragmente werden mittels Endozytose und Transzytose abtransportiert (hellgrün). VZ = Versiegelungszone; AF = Aktinfilamente; Mi = Mitochondrien. Nach Lüllmann-Rauch [50].

Die Zellkörper der Osteoklasten sind reich an Lysosomen und enthalten aufgrund des hohen Energiebedarfes durch die Protonenpumpen zusätzlich viele Mitochondrien, die ATP (Adenosintriphosphat) als Energieträger generieren. Aktive Osteoklasten können in den Ruhezustand zurückkehren. Viele der Zellen gehen jedoch nach ungefähr zwei Wochen in die Apoptose über und werden ersetzt. Aktivierung und Regulation der Osteoklastenaktivität werden durch die Osteoblasten maßgeblich mitgesteuert [50, 87].

2.3 Knochenumbau und Frakturheilung

2.3.1 Knochenumbau

Die zellulären Prozesse, die den Wechsel von Geflechtknochen hin zum adulten Lamellenknochen bedingen, finden sich nicht nur während des Wachstums oder der Heilungsphasen im Knochen. Auch das Skelett des Erwachsenen ist von einem kontinuierlichen Umbau der Knochenmatrix (Bone Remodelling) geprägt. Jährlich werden so im menschlichen Körper ca. 28 % der Spongiosa und 4 % der Kompakta umgesetzt [50]. Der Zweck dieses Remodellings ist vielfältig.

Zum einen kann frühzeitig einer Materialschädigung vorgebeugt werden oder es werden bereits entstandene Mikrofrakturen repariert. Der Umbau ermöglicht aber auch die Anpassung des Knochenaufbaus je nach Beanspruchung: An Orten hoher mechanischer Belastung im Knochen wird verstärkt Knochenmatrix gebildet; dort wo wenig Kraft auf den Knochen wirkt, wird sie vermehrt abgebaut. Zusätzlich ist der Umbau des Knochens Teil der körperlichen Homöostase. Bei Mangelzuständen im Ionenhaushalt kann durch gezielten Abbau von Knochengewebe Kalzium freigesetzt werden um das Ionengleichgewicht wiederherzustellen [50, 87]. Im Körper hat Kalzium wichtige Funktionen, wie beispielsweise als Signalstoff und für die Aufrechterhaltung des Zellmembranpotentials, dies ist unter anderem essentiell für die Funktion von Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur oder auch Nervenzellen [87].

Am Umbau des Knochens sind Osteoblasten und Osteoklasten gleichermaßen beteiligt, zusammen bilden sie eine Art Bautrupp (BMU = bone multicellular unit). In dieser BMU werden die Zellen während des andauernden Umbauprozesses fortlaufend erneuert (Abb. 5 a-e). Unter Überschreitung der alten Osteon-Grenzen bilden die Osteoklasten einen Bohrkanal mit Durchmesser des neuen Osteons (b). In diesen Kanal wachsen neben Bindegewebe auch Nervenfasern und Gefäße ein. Der so gebildete Kanal wird von mehreren Osteoblastenkolonnen wieder aufgefüllt. Die erste Reihe an Osteoblasten bildet die äußerste Lamelle des Osteons (c), sie wird von der nachfolgenden Osteoblastenkolonne eingemauert und die Osteoblasten differenzieren sich zu Osteozyten (d). Nach diesem Prinzip wird das Osteon von außen nach innen aufgefüllt. Die Osteoblasten, die die innerste und damit jüngste Lamelle bilden, gehen wieder als Saumzellen in das Endost über (e). Die von den Osteoblasten synthetisierte Matrix ist dabei noch nicht vollständig mineralisiert. Die gebildeten Kristalle wachsen auch nach Abschluss des Umbaus noch weiter, um eine vollständige Stabilität zu erlangen. In der Spongiosa bilden sich keine Bohrkanäle, sondern die Lamellen werden flächig ersetzt. Dazu werden die von den Osteoklasten erzeugten, oberflächlichen Howship-Lakunen durch die Osteoblasten wieder aufgefüllt [50, 87].

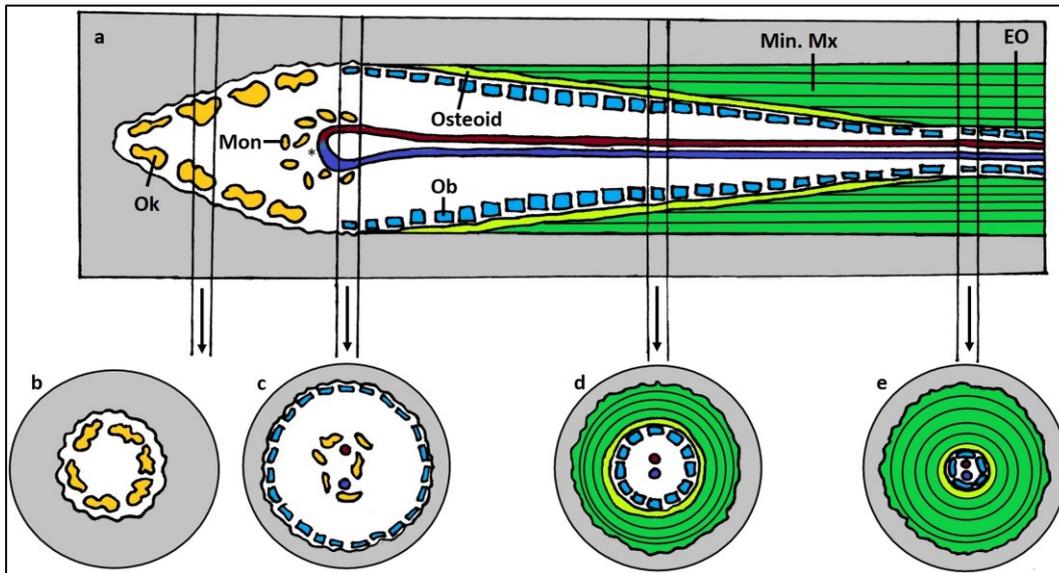


Abbildung 5: Knochenumbau in der Kompakta (Schema); Die Osteoklasten (Ok) bohren einen Knochentunnel, dieser wird durch die Osteoblasten (Ob) mit neuen Lamellen gefüllt. Die jüngste Zellreihe wird wieder zu Zellen des Endosts (EO). Hinter den Osteoklasten wachsen Blutgefäße (rot und blau) mit ihrem Migrationsfortsatz (*) ein. Mon = monoklonale Osteoklastenvorläufer; min. Mx (dunkelgrün) = mineralisierte Matrix Osteoid = hellgrün; a = Längsschnitt; b-e = Querschnitte in Höhe der Pfeile. In Anlehnung an Lüllmann-Rauch [50].

An der Koordination dieses Auf- und Abbaus tragen die Osteoblasten einen großen Anteil und haben Einfluss auf die Population der aktiven Osteoklasten (Abb. 6). Osteoblasten sezernieren hierzu das Molekül MSCF (macrophage colony-stimulating factor), welches die Proliferation der osteoklastischen Vorläuferzellen stimuliert. Ein spezifischer Rezeptor auf deren Zelloberfläche (RANK = receptor activator of Nuclear Factor- κ B) verhindert die Apoptose und reguliert die Fusion sowie die Differenzierung der Vorläuferzellen. Der entsprechende Ligand (RANK-L = RANK-Ligand) sitzt als Protein in der Plasmamembran der Osteoblasten. Die Osteoblasten besitzen aber auch inhibierende Wirkung auf die Osteoklastenpopulation, denn durch das von den Osteoblasten sezernierte Protein OPG (Osteoprotegrin) wird das zelleigene RANK-L blockiert. Das RANK-L/OPG-System wird zusätzlich durch im Körper freigesetzte Hormone auf unterschiedliche Art beeinflusst; zu diesen Hormonen gehören unter anderem Parathormon (PTH), Vitamin-D (Calcitriol), die Hormone der Nebennierenrinde oder auch Sexualhormone wie Estrogen. Letztgenanntes bedingt eine Hemmung von RANK-L und eine Steigerung der OPG-Synthese, was zu einem verminderten Knochenabbau führt [51].

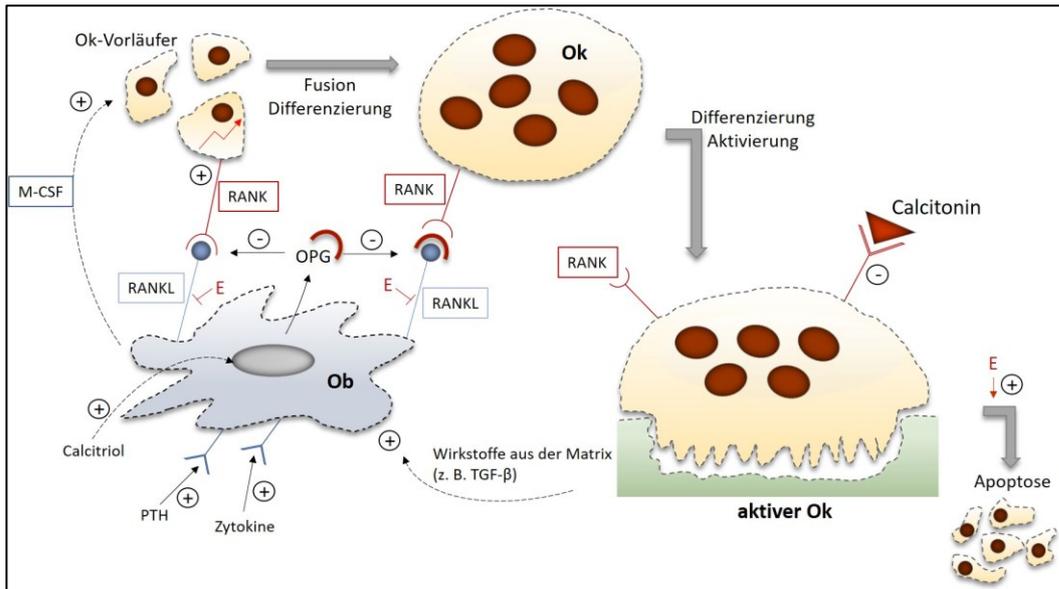


Abbildung 6: Koordination der Osteoblasten und Osteoklasten (Schema); M-CSF und OPG (roter Halbkreis) werden durch die Osteoblasten (Ob) synthetisiert und sezerniert, RANKL sitzt als membranständiges Molekül auf deren Oberfläche. RANK ist der entsprechende Rezeptor auf der Oberfläche der Osteoklasten (Ok). Calcitonin hat eine direkte Wirkung auf die Osteoklasten. (+) bzw. (-) = Stimulation bzw. Hemmung; E = Estrogene; PTH = Parathormon. Nach Lüllmann-Rauch [51].

Parathormon wird bei Absinken des Kalziumspiegels im Blut aus der Nebenschilddrüse freigesetzt. Durch Stimulation der Osteoblasten und damit des RANK-L Systems, kommt es zur Aktivierung der Osteoklasten. Der so induzierte Knochenabbau dient zur schnellen Bereitstellung von Kalziumionen. Der Antagonist des Parathormons ist Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse. Es wirkt jedoch nicht an den Osteoblasten, sondern hemmt direkt die Aktivität der Osteoklasten [51].

2.3.2 Frakturheilung

Hält der Knochen einer einwirkenden mechanischen Belastung nicht stand, kann die Reparatur dieser traumatisch verursachten Schäden in die sogenannte primäre und die sekundäre, oder auch natürliche Frakturheilung unterschieden werden [50, 69].

Die *sekundäre Frakturheilung* erfolgt unter Bildung einer Knochennarbe, dem Kallus. Anfangs formiert sich an der Bruchstelle ein Blutgerinnsel, welches anschließend in Granulationsgewebe übergeht und einen Bindegewebskallus bildet. Innerhalb einiger Wochen bildet sich so die erste provisorische Verbindung der beiden Bruchstücke aus. Abgestorbene Knochenmatrix innerhalb der Fraktur wird durch aktivierte Osteoklasten resorbiert.

Im weiteren Verlauf der Heilung wird der provisorische Bindegewebskallus nach dem Prinzip der enchondralen Ossifikation durch einen tragfähigen Kallus aus Geflechtknochen ersetzt. Über den Zeitraum von mehreren Monaten kann bei primär gegebener Stabilität die narbenlose Abheilung des Bruches stattfinden, indem der provisorisch gebildete Geflechtknochen durch den stabileren Lamellenknochen ersetzt wird [50, 69].

Unter der *primären Frakturheilung* versteht man hingegen die Heilung eines Knochenbruches ohne vorrangegangene Bildung eines Kallus. Um dies zu erreichen, ist eine Osteosynthese mit optimaler Adaptation der Knochenfragmente mit einem Frakturspalt < 1 mm nötig. Ist durch die Operation ausreichend Stabilität gegeben, kann sich an der Frakturlinie direkt Lamellenknochen ausbilden. Die neu gebildeten Knochenlamellen verlaufen zunächst parallel zum Frakturspalt, im Zuge des normalen *bone remodeling* werden sie später abgebaut und durch longitudinal verlaufende Osteone ersetzt [50, 69].

2.4 Anatomie des Kniegelenks

Das Kniegelenk (*Articulatio genus*) ist das größte Gelenk im menschlichen Körper, anatomisch wird das Kniegelenk als Drehscharniergelenk oder auch bikondyläres Gelenk, also einer Mischung aus Rad- und Scharniergelenk, beschrieben. Aufgrund der Kombination verschiedener Gelenkarten wird so die Bewegung in zwei Freiheitsgraden ermöglicht - diese werden in ihrem Bewegungsumfang nach der Neutral-Null-Methode (NNM) eingeteilt. Extension und Flexion sind dabei die Hauptbewegungsrichtungen. Die Extension kann normalerweise nicht über die Neutralstellung hinaus ausgeführt werden, eine mögliche Überstreckung von $5-10^\circ$ wird vor allem Kindern und Frauen zugeschrieben. Die Flexion ist bis zu einem Umfang von ca. 150° möglich (NNM = $5-0-150$) [4, 63]. Bei einer Beugung des Kniegelenks von 90° wird der Bewegungsumfang durch Innen- und Außenrotation erweitert, die Innenrotation beträgt maximal 10° , die Außenrotation $30-40^\circ$. Bei maximaler Extension werden Innen- und Außenrotation durch Anspannung der extra- und intraartikulären Ligamente inhibiert. [4, 63]

2.4.1 Knöcherne Strukturen

Die knöchernen Hauptstrukturen des Kniegelenkes sind der distale Anteil des *Femur* sowie der proximale Anteil der *Tibia*. Der femorale Anteil wird weiterhin unterteilt in den lateralen und medialen Kondylus. Sie sind konvex geformt und fungieren mit ihrer aufgelagerten, hyalinen Knorpelschicht als Gleitfläche im Gelenk. Da die Rundung der Kondylen nicht kreis- sondern spiralförmig ist, verändern sich bei Beugung des Knies Auflagepunkt und Kongruenz mit dem Tibiaplateau. Zwischen den Kondylen bildet sich die *Fossa interkondylaris* auf der dorsalen Unterseite des *Femur* aus. Sie dient als Ursprung der intraartikulär gelegenen Kreuzbänder. Oberhalb der Kondylen befinden sich jeweils lateral und medial die *Processus supracondylaris* als Ansatzpunkte für Muskeln und Bandapparat, sowie frontal eine weitere Knorpelschicht als Gleitlager für die *Patella*. Den tibialen Anteil des Kniegelenks bildet vor allem das Tibiaplateau. Ein knöcherner Vorsprung in der Mitte des Plateaus, die *Eminentia intercondylaris*, teilt die Gelenkfläche in ein laterales und mediales Kompartiment, sie ist der Insertionspunkt der Kreuzbänder und der Menisken. Der mediale Part ist leicht konkav geformt, der laterale Anteil zeigt sich jedoch eher plan mit abfallenden Rändern. Die beiden Kompartimente bilden das Gleitlager für die femoralen Kondylen, die leichte Konvexität des lateralen Tibiaplateaus verringert nochmals die Kongruenz der Gelenkfläche. Unterhalb des Tibiaplateaus an der Vorderseite des Schienbeins liegt die *Tuberositas tibiae*, hier befindet sich der Ansatzpunkt der Patellarsehne [4, 63].

Zusätzlich ist an der Bildung des Kniegelenks die *Patella* beteiligt, welche als knöchernes Hypomochlion in der Sehne des *M. quadriceps femoris* verankert ist. Auf ihrer Innenseite ist die Patella von hyalinem Knorpel bedeckt und bildet durch einen Knochenfirst zwei Facetten aus. Sie gleitet so geführt in der ebenfalls knorpelbedeckten *Facies patellaris femoris* an der Vorderseite des *Femur* und ermöglicht die nahezu reibungsfreie Bewegung der Sehne zwischen den beiden Femurkondylen. Das Femoropatellargelenk wird anatomisch als Schlittengelenk (*Articulatio delabens*) eingeordnet [4, 63].

2.4.2 Kapsel-Bandapparat und Menisken

Die äußeren, ligamentären Strukturen des Knies lassen sich nach ihrer Lage grob in ventrale, dorsale und kollaterale Bänder einteilen (Abb. 7).

Die ventralen Anteile bestehen aus der Sehne des *M. quadriceps femoris*, dem *Lig. patellae* und dem medialen und lateralen *Retinaculum patellae*. Alle ventralen Bänder sind zur Verstärkung der Stabilität in die Gelenkkapsel integriert. Als Sehnenanteile der Streckmuskulatur besteht ihre Funktion maßgeblich in der Extension des Kniegelenkes. Die dorsale Gruppe wird vom *Lig. popliteum obliquum* und dem *Lig. popliteum arcuatum* gebildet. Sie verstärken dort die Gelenkkapsel und verhindern zusammen mit den Kreuzbändern eine Überstreckung des Knies [4, 63].

Medial und lateral wird das Kniegelenk jeweils von einem Kollateralband stabilisiert. Das innengelegene *Lig. collaterale tibiale* ist großflächig mit der Gelenkkapsel verwachsen und besteht aus zwei Anteilen, die gemeinsam am hinteren, medialen Femurkondylus entspringen. Durch ihren breiten Ansatz an der *Tibia* bildet es eine etwa dreieckige Struktur. Bei gestrecktem Knie begrenzt es Innen- sowie Außenrotation und verhindert ein mediales Aufklappen, durch den verschobenen Ansatzpunkt hinter die Drehachse des Kniegelenkes lässt die Spannung bei gebeugtem Knie nach. Das *Lig. collaterale fibulare* liegt extrakapsulär und zeigt sich im Querschnitt eher rund bis oval. Wie auch das mediale Seitenband begrenzt es Innen- und Außenrotation und ein seitliches Aufklappen, in diesem Fall die Varisierung des Knies, in Streckstellung [4, 63].

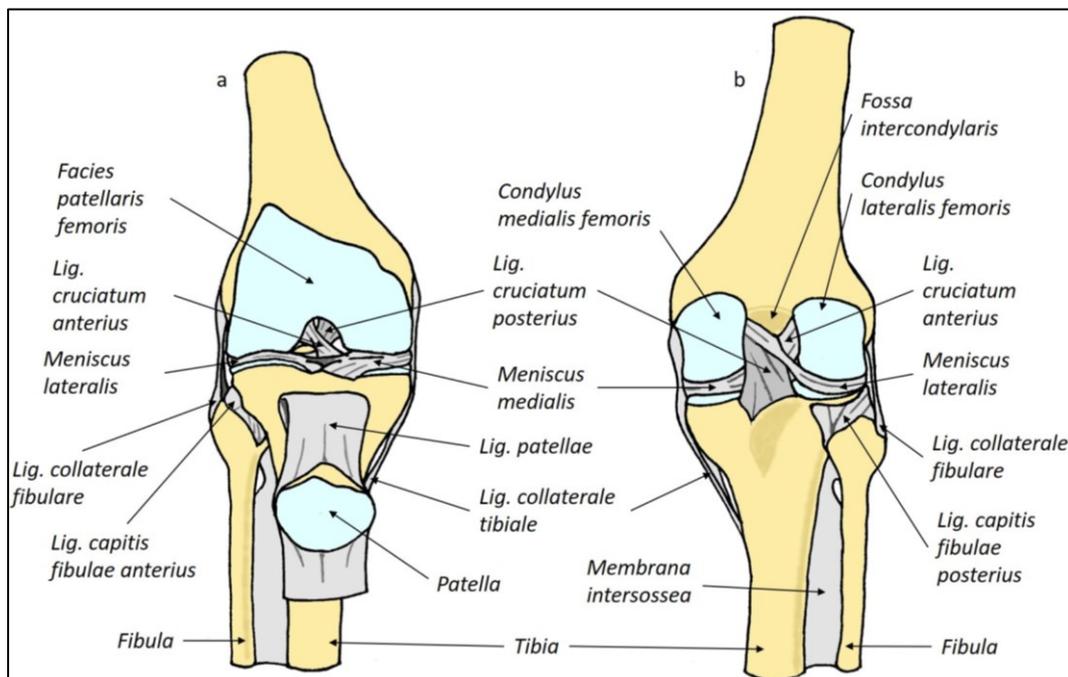


Abbildung 7: Knochen und Bänder eines rechten Kniegelenkes; a = Frontalansicht (*Lig. patellae* mit *Patella* nach unten weggeklappt); b = Ansicht von posterior. Nach Schünke et al. [63].

Die Menisken bestehen aus Faserknorpel und dienen vor allem dem Ausgleich der, trotz dickem Gelenkknorpel eigentlich zu kleinen, Kontaktfläche zwischen Femurkondylen und Tibiaplateau. Der Ausgleich der Inkongruenz lässt sich durch den Querschnitt erklären, dort zeigen die Menisken eine keilförmige Geometrie, die Spitze des Keils zeigt dabei nach innen. So können auftretenden Druckbelastungen besser verteilt werden. Die Menisken liegen beweglich am äußeren Rand des Tibiaplateaus und sind C-förmig konfiguriert, der laterale Meniskus bildet fast schon ein O, die Meniskusschenkel sind in der Mitte an der *Eminentia intercondylaris* fixiert. Bei Beugung und Rotation gleitet der Meniskus mit nach dorsal auf dem Tibiaplateau. Beide Menisken sind an der Gelenkkapsel verankert, die Verwachsung des medialen Meniskus mit der Kapsel ist jedoch wesentlich breitflächiger und stabiler als die des lateralen Meniskus. Deshalb ist seine Beweglichkeit auf dem Tibiaplateau eingeschränkt und die Belastung bei Beugung und Außenrotation höher. Aufgrund der großen Druckbelastung sind die Menisken nicht mit einer Synovialschicht überzogen. Außerdem besteht eine Versorgung durch Gefäße nur an der Basis im äußeren Drittel des Meniskus. Die mittig gelegenen Meniskusanteile werden über die Synovialflüssigkeit ernährt [4, 63].

2.4.3 Kreuzbänder

Im Gegensatz zu den äußeren Ligamenten, welche zwar mit der Gelenkkapsel verbunden sind, ihr aber alle nur von außen anliegen, werden die Kreuzbänder zu den intrakapsulären Bändern gezählt (Abb. 7). Intrakapsulär werden sie aus dem Grund genannt, weil sie zwischen der *Membrana fibrosa* und der *Membrana synovialis* liegen und somit noch nicht als intraartikulär gelten. Man unterscheidet das *Lig. cruciatum posterior* und das *Lig. cruciatum anterioir* [4, 63].

Das hintere Kreuzband entspringt an der Innenseite des medialen Femurkondylus und verläuft von kranial, ventral, medial nach kaudal, dorsal, lateral. Hier liegt der Ansatz im Bereich der *Area intercondylaris posterior* der *Tibia*. Ventral davon verläuft das vordere Kreuzband (im Folgenden auch VKB abgekürzt), es beginnt am lateralen Femurkondylus und zieht entgegengesetzt der Richtung des hinteren Kreuzbandes von kranial, dorsal, lateral nach kaudal, ventral, medial um dort an der *Area intercondylaris anterior* zu inserieren [4, 63]. Seine durchschnittliche Länge liegt zwischen 31 mm – 36 mm, durch eine fächerförmige Aufteilung am knöchernen Ansatz wird die Stabilität zusätzlich erhöht [79].

Anhand dieser anatomischen Eigenschaften lassen sich die Funktion und Bedeutung der Kreuzbänder erklären. Im gestreckten Zustand sind beide Bänder voll gespannt und tragen zusätzlich zu den äußeren Bändern zur Stabilität des Kniegelenkes bei. In Innenrotationsstellung verdrehen sich die ohnehin schon gekreuzten Ligamente weiter ineinander, einerseits wird so die Bewegungsfreiheit eingeschränkt, zum anderen erhöht sich die Stabilität. Wird der Unterschenkel nach außen rotiert, löst sich die Überkreuzung der Bänder und sie stehen leicht parallel. So erklärt sich zwar der größere Bewegungsumfang der Außenrotation gegenüber der Innenrotation, jedoch sind die Kreuzbänder in dieser Stellung auch anfälliger für traumatische Verletzungen [4, 63].

Eine weitere Besonderheit der intrakapsulären Ligamente besteht in ihrer Faserarchitektur. So lässt sich das vordere Kreuzband in 3 Hauptfaserbündel unterteilen. Sie werden nach ihrer Lage als anteromediales, posterolaterales und intermediäres Bündel beschrieben [68, 79]. Dieser Aufbau bedingt, dass gewisse Anteile der Kreuzbänder immer angespannt sind, unabhängig davon in welcher Stellung sich das Knie befindet. Diese Eigenschaft sorgt auch in gebeugter Stellung des Knies für Stabilität. Wenn die äußeren Ligamente während der Beugung ihre Spannung verlieren, verbleiben die Kreuzbänder als einzige ligamentäre Sicherung [4]. Vorrangig verhindern sie dann eine ungewollte Bewegung in der Sagittalebene, hinzu kommt eine sekundäre Stabilisationsfunktion während der Rotation im Kniegelenk [79].

Das vordere Kreuzband schützt speziell gegen anteriore Translationsbewegungen in Relation zum *Femur* [68], dabei ist die Spannung des Ligaments zwischen 15°-30° am höchsten [33].

2.5 Traumatische Verletzungen des vorderen Kreuzbandes

Mit insgesamt 35.000 Fällen/Jahr sind Kreuzbandrupturen die häufigsten ligamentären Verletzungen des Kniegelenks und machen gut ein Fünftel aller Knieverletzungen aus. Der Altersgipfel für diese Verletzungen liegt zwischen 15 und 30 Jahren [68, 79]. Nach Kopf, Hand und Sprunggelenk ist das Knie die vierthäufigste Verletzungslokalisation überhaupt (13,6 %) mit zunehmender Tendenz. Auswertungen von Versicherungsdaten aus dem Jahr 2016 ergaben Inzidenzen für Kniebandverletzungen von 283,8/100.000 für Männer und 152,0/100.000 für Frauen ebenfalls mit steigender Tendenz [62].

Ein nationales Register für Kreuzbandverletzungen, welches für solch eine Datenerhebung hilfreich wäre, besteht in Deutschland derzeit nicht. Aus den Versicherungsdaten geht des Weiteren hervor, dass die Inzidenz von Knieverletzungen in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat. Im Allgemeinen seien Männer dabei häufiger betroffen als Frauen [62]. Eine Ausnahme hiervon bilden Sportlerinnen, sie weisen eine höhere Verletzungsinzidenz auf als männliche Sportler [62, 79].

Kreuzbandverletzungen werden meist durch indirekte Traumata verursacht. Besonders häufig treten sie dabei im Rahmen von Sportverletzungen auf. In 50-80 % der Fälle sind es sogenannte Nicht-Kontaktunfälle ohne die Beteiligung Dritter [2, 22, 68]. Durch falsche Bewegung oder Belastung des Kniegelenks kommt es dabei zu einer deutlichen Erhöhung und eventuellen Richtungsänderung der auf das Kreuzband einwirkenden Kräfte, welches diesen letztlich nicht mehr standhalten kann (Abb. 8). Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten kommt es auch häufig zu Kombinationsverletzungen, bei denen nicht nur das Kreuzband, sondern z. B. auch die Menisken, Kollateralbänder oder der Gelenkknorpel geschädigt werden [79].

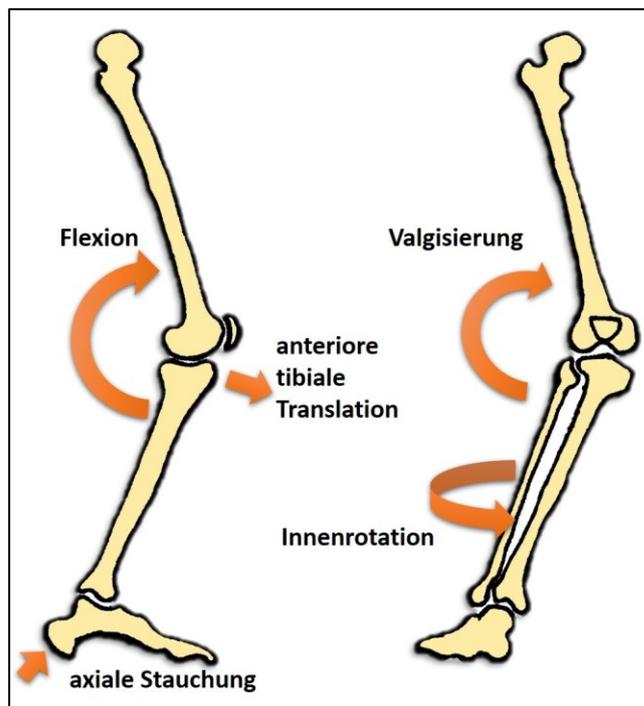


Abbildung 8: Unfallmechanismen der VKB-Ruptur; Multidirektionale Belastungen, die zu einer Ruptur des vorderen Kreuzbandes führen können. Nach Siebold et al. [68].

Typische Unfallmechanismen, die zu einer vorderen Kreuzbandruptur führen können, sind plötzliche Abbremsbewegungen und Richtungswechsel, sowie die schräge Landung auf dem Rückfuß bei nahezu vollständig gestrecktem Knie [34]. Die größte Verletzungsgefahr besteht jedoch in Flexionsstellung bei gleichzeitig auftretendem Valgusstress und Innenrotation oder Außenrotation (Abb. 8) [67, 79]. Die dabei auftretenden Verletzungen reichen von Rissen in der Mitte des Kreuzbandes über Ausrisse an den Insertionstellen bis hin zu Avulsionsfrakturen [68].

2.5.1 Diagnostik

Vor der eigentlichen Diagnostik stehen die Anamnese und körperliche Untersuchung. Dabei sollte zunächst der genaue Unfallmechanismus eruiert werden. Die Betroffenen selbst beschreiben oft ein Gefühl des Schnappens oder Reißens im Knie. Liegt das Trauma schon länger zurück, kann auch ein subjektives Instabilitätsgefühl bei den Betroffenen hinzukommen. Auch bei augenscheinlich eindeutiger Anamnese darf keinesfalls auf eine gründliche Inspektion und Untersuchung verzichtet werden. Einerseits können Begleitverletzungen eine VKB-Ruptur maskieren, sodass diese unentdeckt bleiben würde. Andererseits können übersehene Begleitverletzungen, auch bei richtiger Diagnose der VKB-Ruptur das Endergebnis der Behandlung verschlechtern [79].

Als klinische Tests zur diagnostischen Überprüfung der VKB-Stabilität kommen vorrangig der Lachman-Test und der Pivot-Shift-Test zum Einsatz [26, 68]. Für den Lachman-Test wird das Kniegelenk in 20° Beugstellung gebracht und bei fixiertem *Femur* an der *Tibia* Richtung ventral gezogen. Ist das vordere Kreuzband intakt, wird die Bewegung nach ventral durch einen festen Anschlag gehemmt. Die Nachlässigkeit kann dabei in drei Grade aufgeteilt werden. Eine anteriore Bewegung von 1-5 mm entspricht Grad I, 6-10 mm Grad II und jegliche anteriore Translation >10 mm Grad III. Der Anschlag am Ende der Bewegung wird in hart, weich und fehlend unterteilt [49, 69]. Eine Bewegungsfreiheit von >5 mm mit einem harten Anschlag gibt Hinweis auf eine Teilruptur des Bandes. Fehlt der Anschlag komplett und ist eine Ventralbewegung >10 mm möglich, deutet dies auf eine komplette VKB-Ruptur hin [16, 79]. Beim Pivot-Shift-Test wird der Unterschenkel des Patienten bei gestrecktem Bein innenrotiert und mit der freien Hand Valgusstress auf das Kniegelenk ausgeübt. Unter dieser Belastung wird das Bein anschließend im Kniegelenk gebeugt.

Zu Beginn der Kniebeugung subluxiert die *Tibia* deutlich sichtbar nach ventral, bei einer Flexion zwischen 20° und 40° erfolgt schließlich durch den *Tractus iliotibialis* eine spontane, sicht- und fühlbare dorsale Reposition der *Tibia* in ihre Ausgangslage [69]. Beide aufgeführten Tests besitzen eine relativ hohe Sensitivität (81,8 %) und eine noch höhere Spezifität (Lachman-Test: 96,8 %, Pivot-Shift-Test: 98,4 %). Weitere Funktionsprüfungen des VKB, wie z. B. der vordere Schubladentest bleiben hinter diesen Ergebnissen zurück [41].

Wird eine Bewegungseinschränkung durch ein begleitendes Hämarthros verursacht, kann diese durch eine Punktion verbessert werden, zusätzlich wirkt die Punktion aufgrund sinkenden Drucks schmerzlindernd und kann auch diagnostisch genutzt werden. So können z. B. Fettaggen innerhalb des Punkts ein Hinweis auf eine knöcherne Begleitverletzung sein. Allerdings besteht dabei auch immer das Risiko einer punktionsbedingten Infektion des Kniegelenks, die eine zeitnahe VKB-Rekonstruktion behindern würde [79].

Als bildgebende Verfahren der Diagnostik kommen Röntgen und Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz. Die Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen dienen vorrangig zum Ausschluss begleitender Frakturen oder einem knöchernen Bandausriss und zur Beurteilung des Gelenkspaltes. Eine VKB-Ruptur kann dadurch nicht unmittelbar diagnostiziert werden [68]. Sind knöcherne Strukturen mitbetroffen, können zur weiteren Planung eine Untersuchung mittels Computertomographie (CT) und eine eventuelle 3D-Rekonstruktion sinnvoll sein. Goldstandard für die Diagnose ist jedoch das MRT (Sensitivität 80-95 %, Spezifität 85-100 %), um den Zustand von Knorpel, Bändern und Menisken zu beurteilen. Eine VKB-Ruptur ist bei diesem Verfahren durch eine Kontinuitätsunterbrechung oder eine leere Notch (Notch = *Fossa intercondylaris*) zu erkennen [79].

2.5.2 OP-Indikation

Generell kann die vordere Kreuzbandruptur auch konservativ behandelt werden. Ob eine Operation unbedingt erfolgen muss, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Für eine konservative Behandlung sprechen im Allgemeinen eine isolierte VKB-Läsion, ein höheres Lebensalter sowie geringe Sportambitionen nach abgeschlossener Behandlung.

Bei komplexen Kombinationsverletzungen mit objektiv festgestellter Instabilität des Gelenkes wird meist ein operatives Vorgehen empfohlen [46], um die Entstehung sekundärer Meniskus- oder Knorpelschäden, die zu posttraumatischer Arthrose führen können, zu verhindern. Aber auch die oftmals primär auftretenden Begleitverletzungen stehen im Verdacht Ursache solcher posttraumatischer, arthrotischer Veränderungen zu sein [79]. Letztlich darf natürlich der Patientenwunsch nicht außer Acht gelassen werden und die OP-Indikation stellt sich oftmals nach dem individuellen Aktivitätsniveau des Patienten.

Erfüllt die Verletzung alle Kriterien für ein konservatives Vorgehen (keine Begleitverletzungen, objektive Stabilität, subjektive Beschwerdefreiheit [79]), kann damit direkt nach dem Traumaereignis begonnen werden. Sie beinhaltet hauptsächlich eine umfassende physiotherapeutische Betreuung des Patienten mit aktivem und passivem Bewegungstraining, Koordinations- und Propriozeptionsübungen, sowie Muskelaufbau. Zusätzlich können andere unterstützende Verfahren wie z. B. Kryotherapie angewandt werden. Der Gebrauch von immobilisierender Gipsverbänden oder Orthesen wird hingegen nicht mehr empfohlen [46]. Im weiteren Verlauf sollten klinische Stabilitätsprüfungen, eventuell in Verbindung mit einem MRT erfolgen [74]. Trotz optimalem Behandlungsverlauf kann auch nach konservativer Therapie eine operative Rekonstruktion erforderlich werden.

2.6 Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes

Ziel der operativen Kreuzbandrekonstruktion ist vorrangig eine übungsstabile Versorgung des Kniegelenks mit der Möglichkeit zur frühfunktionellen Bewegungstherapie für den Patienten [46].

2.6.1 Operationszeitpunkt

Eine allgemein gültige präzise Aussage über den bestmöglichen Operationszeitpunkt kann aktuell nicht getroffen werden und wird kontrovers diskutiert [46, 68]. Es wird davon ausgegangen, dass vorzugsweise in den ersten 6 Monaten nach Verletzung operiert werden sollte [68]. Es finden sich die verschiedensten Angaben für einen geeigneten Zeitraum, diese differieren ungefähr zwischen 1 bis 6 Wochen [29, 55].

Meist wird der Operationszeitpunkt deshalb nach individuellen Gesichtspunkten festgelegt, dabei sollte die akute Verletzungsphase überstanden sein und präoperativ ein weitestgehend frei bewegliches Kniegelenk ohne größeren Erguss vorliegen [66, 79]. Findet eine OP in den ersten Wochen nach dem Trauma statt, haben der Bewegungsumfang (Range of Motion = ROM) des Knies, Ergussbildung und das Rehabilitationsprogramm einen größeren Einfluss auf das Ergebnis als der reine Zeitpunkt der Operation [68].

2.6.2 Transplantate

Die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes erfolgt durch intraartikuläre Operationstechniken vorzugsweise mittels autologer Sehnen als Kreuzbandersatz. Hierbei kommen vor allem zwei Verfahren zum Einsatz: Entweder werden BTB-Transplantate (BTB = Bone-Tendon-Bone) genutzt oder es wird eine STS-Plastik (STS = Semitendinosussehne) vorgenommen. Alle Transplantate sind weniger elastisch als das ursprüngliche Kreuzband [57, 79].

Das BTB-Transplantat wird aus dem mittleren Drittel der Patellarsehne gewonnen. Dabei wird nicht nur autologes Sehnenmaterial entnommen, sondern das Transplantat enthält zusätzlich an seinen Enden Knochenstücke von *Patella* und *Tibia*. Dies ermöglicht eine belastungsstabile Verankerung des Transplantates z. B. mittels Interferenzschrauben, oder aber auch das fremdmaterialfreie Pressfit-Verfahren mit Einheilungszeiten vergleichbar zur normalen Frakturheilung [94]. Die normale Verbindung von Sehne und Knochen bleibt dabei erhalten. Die Sehne ist mittels einer Schicht aus normalem Faserknorpel und mineralisiertem Faserknorpel im Knochen verankert [31]. Dieses Rekonstruktionsverfahren zeichnet sich durch eine sehr hohe Primärstabilität aus [79].

Die Alternative zum BTB-Verfahren ist die STS-Plastik nach Cho [21], die heutzutage in verschiedenen Modifikationen durchgeführt wird [79]. Hierfür werden die autologen Transplantate aus der Semitendinosussehne entnommen. Vorteile gegenüber der BTB-Technik sind der intakt belassene Streckapparat und die unversehrte *Tuberositas tibiae*. Nachteilig hingegen ist die Schwächung von Beugekraft und Innenrotation [77]. Des Weiteren kann die Transplantatgewinnung durch verschiedene, anatomische Anlagevarianten der Sehne erschwert sein und eine direkte Einheilung von Knochen in Knochen ist dann ebenfalls nicht möglich [79].

2.6.3 Operation

Heutzutage werden verschiedene OP-Verfahren und Techniken zur VKB-Rekonstruktion eingesetzt (Einzelbündeltechnik, Doppelbündeltechnik, etc.). Sie unterscheiden sich in bestimmten Details, laufen aber grundsätzlich nach ähnlichem Prinzip ab. Für die Operation wird eine anatomisch möglichst genaue und mechanisch stabile Implantation des Transplantats angestrebt. Der Bandersatz darf dazu nicht mit anderen knöchernen oder ligamentären Strukturen in Konflikt stehen [46]. Unabhängig von der Art des Transplantats erfolgt zunächst die Anlage jeweils eines Bohrkanals im *Femur* und in der *Tibia*. Verschiedene anatomische Landmarken helfen bei der korrekten Platzierung [68]. Sie sollten zentral in den natürlichen Ansatzzonen des vorderen Kreuzbandes gelegen sein [40, 68, 93]. In diesen Bohrkanälen werden später die Transplantatenden fixiert. Eine fehlerhafte Anlage dieser Kanäle ist in 70-80 % Ursache von gescheiterten Rekonstruktionsversuchen [88].

Der femorale Tunnel scheint dabei eine wichtigere Rolle zu spielen als der tibiale [79]. Eine zu weit anteriore Anlage des femoralen Bohrkanals führt zu einem lockeren Transplantat in Streckstellung und somit zur Instabilität im Kniegelenk. Während der Beugung ist die Belastung des Transplantates wiederum unphysiologisch hoch, dies kann zu einer endgradigen Bewegungseinschränkung und im schlimmsten Fall zur Re-Ruptur des Ersatzkruzbandes führen [47, 68, 79]. Die korrekte Lage der Bohrkanäle sollte deshalb mittels arthroskopischer Kontrolle gesichert und durch eine postoperative Röntgenaufnahme dokumentiert werden. Zusätzlich können spezielle Führungsinstrumente oder computerunterstützte Navigationsverfahren dabei helfen, Fehler bei der Anlage zu vermeiden [79].

Zuerst erfolgt die Fixierung im femoralen Kanal. Anschließend wird das Transplantat unter Spannung, bei ca. 20° flektiertem Knie, im tibialen Bohrtunnel verankert. Nach erfolgter Befestigung des Transplantats sollte eine arthroskopische Kontrolle des Gelenks erfolgen, um einen komplikationslosen Transplantatverlauf sicherzustellen und um z. B. eine intraartikuläre Schraubenlage auszuschließen [79].

2.6.4 Fixierung

Die Befestigung der Transplantate im Bohrkanal wird als größter Einflussfaktor auf deren mechanischen Eigenschaften und auf die direkte postoperative Phase angesehen [68]. Variablen, die die postoperative Belastbarkeit bestimmen, sind die Auswahl des Transplantates und deren Passgenauigkeit im Bohrkanal, das Design des Fixierungsmaterials und die Knochendichte des Patienten. Unabhängig von der Auswahl des Transplantats können zwei Methoden zur Fixierung innerhalb der Knochentunnel unterschieden werden: Entweder erfolgt die Fixierung innerhalb des Tunnels z. B. mittels Interferenzschrauben oder Crosspins, oder die Transplantate werden mit Hilfe extraartikulärer Systeme befestigt. Für BTB-Transplantate besteht auch noch die Möglichkeit der hilfsmittelfreien Befestigung durch das „Press-Fit-Verfahren“, dabei erfolgt die Fixierung nur durch das Verkeilen der Knochenstücke an den Sehnen im Bohrkanal. Die Art der Fixation ist dabei nicht spezifisch auf ein operatives Verfahren festgelegt [68].

Interferenzschrauben werden sowohl bei BTB- als auch bei STS-Plastiken am häufigsten verwendet und werden zurzeit als Goldstandard betrachtet (Abb. 9). Die Stärke der Fixierung ist unter anderem abhängig von der Schraubenlänge, ihrer Geometrie und der Richtung in der sie platziert wird. Abweichungen vom eigentlichen Bohrkanal können dabei die Fixierungsstärke drastisch verringern. Auch hier ist die Knochendichte eine wichtige Variable, die die spätere Festigkeit beeinflusst [68]. Interferenzschrauben aus Metall waren lange Zeit das Standardmaterial für VKB-Rekonstruktionen. Sie garantieren eine gute initiale Fixierungsstärke und frühe Knochenintegration [15, 39, 54, 68]. Bedenken bestehen aber bezüglich einer potentiellen Verletzungsgefahr der Transplantate durch das Material [54, 95], ebenfalls stören diese Schrauben eine postoperative MRT Evaluation oder eine potentielle Revisions-Operation. Aufgrund der Nachteile solcher Schrauben wurden bioresorbierbare Interferenzschrauben entwickelt, die man in langsam- oder schnell-zerfallend unterscheiden kann. Sie bestehen meist aus Polyglykolsäure (PGA = Polyhydroxyessigsäure; polyglycolic acid), Stereoisomeren der Polymilchsäure (PLA = polylactic acid), oder aus Copolymeren aus PGA/PLA. Eine Weiterentwicklung aus diesen Materialien sind die Biokomposit-Schrauben. Sie bestehen aus einer Kombination einem der vorher genannten Stoffe zusammen mit osteokonduktiven Materialien (z. B. β -TCP, Hydroxylapatit) [68].

Aufgrund dieser osteokonduktiven Biokeramiken, die eine zügige Knochenneuf ormation verursachen, zerfallen Biokomposit-Schrauben schneller als reine bioresorbierbare Schrauben [6, 9, 68]. Zu den bedeutendsten Problemen, die beim Gebrauch von bioresorbierbaren Interferenzschrauben diskutiert werden, gehören das intra- oder postoperative Brechen der Schraube [30, 68], Entzündungsreaktionen aufgrund der Akkumulation von Säurepartikeln der zerfallenden Schraube [1, 68], artikuläre Schraubenmigration [65, 68] oder auch die potentielle Aufweitung der Bohrkanäle [23, 68, 73].

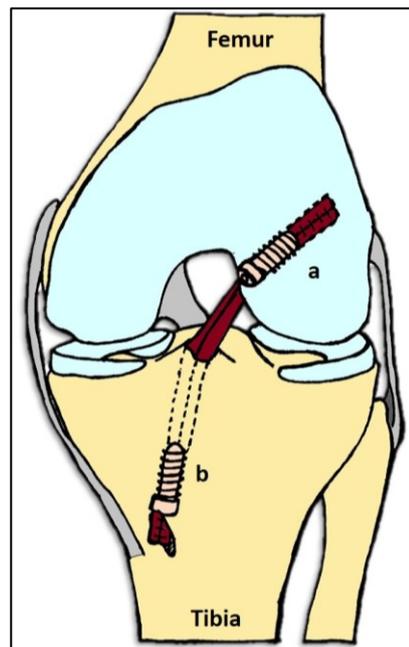


Abbildung 9: VKB-Rekonstruktion mit STS-Transplantat (Zeichnung); Darstellung der Fixierung eines VKB-Transplantates (rot) mittels Interferenzschrauben im femoralen (a) und tibialen (b) Bohrkanal.

Andere direkte Fixierungsmethoden zum Befestigen der Sehnen transplantate innerhalb der Bohrkanäle sind die Verwendung von Cross-Pins, Klammern oder lateralen Kompressionsschrauben. Eine andere Möglichkeit der Befestigung, die vor allem bei STS-Plastiken zum Tragen kommt, sind Aufhängungssysteme (wie z. B. der EndoButton), die in vielfältigen Ausführungen zu Verfügung stehen. Sie können entweder kortikal oder in der Spongiosa verankert werden. Manche Systeme verbinden auch beide Verankerungsmöglichkeiten miteinander [68]. Obwohl im Allgemeinen für femorale und tibiale Fixierung die gleichen Methoden und Systeme zur Verfügung stehen, wird die tibiale Verankerung des Transplantats als herausfordernder angesehen.

Aufgrund der geringeren Knochenmaterialdichte ist der tibiale Anteil des Rekonstruktions-Komplexes das schwächste Bindeglied [68].

2.6.5 Postoperative Komplikationen

Eine seltene aber auch eine der gefürchtetsten Komplikationen ist die postoperative Infektion. Sie tritt ungefähr in 0,5-1,8 % der Fälle bei VKB-Rekonstruktionen auf. Die am häufigsten vorkommenden Erreger stammen aus der Familie der Staphylokokken, aber auch Streptokokken und Enterobakter-Spezies können auftreten [68]. Besteht der Verdacht einer Infektion, muss mit einer intravenösen Antibiotikatherapie begonnen werden; zuvor sollten allerdings bakterielle Kulturen gesichert werden [56].

Eine weitere Komplikation ist die Arthrofibrose. Aufgrund intraartikulärer Narbenformationen kann es zu Bewegungseinschränkungen des Kniegelenks kommen [38, 68]. Ihre genaue Ätiologie ist noch nicht ganz verstanden, allerdings werden als Ursache nachlässige OP-Durchführung und mangelhafte Rehabilitationsmaßnahmen vermutet [28, 68]. Bildet sich fibröses Narbengewebe isoliert im interkondylären Bereich, kann dies die Extension beeinträchtigen. Solch eine Läsion bezeichnet man als „Cyclops Syndrome“ [38, 68]. Auch hier ist die genaue Pathophysiologie noch nicht bekannt. Solange eine Cyclops-Läsion asymptomatisch bleibt, muss sie nicht zwingend behandelt werden, andernfalls kann sie arthroskopisch entfernt werden [68].

Des Weiteren werden postoperative Aufweitungen des Knochentunnels, vor allem an der gelenknahen Austrittsstelle des Transplantats, beschrieben. Sie können z. B. durch Transplantatfehlplatzierungen entstehen [19]. Ebenfalls wird diskutiert, ob sie bei bestimmten Fixierungsmethoden eher auftreten können [68] oder abhängig von der Transplantatwahl sind [79]. Ein möglicher Einfluss auf die postoperative Stabilität des Knies wird vermutet, die klinische Bedeutung dieser Aufweitungen bleibt aber umstritten [61].

2.6.6 Nachbehandlung und Prognose

Die Nachbehandlung der VKB-Rekonstruktion erfolgt frühfunktionell und besteht aus intensiver Physiotherapie, Koordinationstraining und Krafttraining. Die übliche Behandlungsdauer liegt zwischen 8-12 Wochen [46].

In der Frühphase der Rehabilitation, das heißt in den ersten 6 Wochen, sind die Schmerzreduktion, antiinflammatorische Maßnahmen, die Wiederherstellung der freien Kniegelenksbeweglichkeit und neuromuskuläre Kontrolle besonders wichtig [68, 89]. Vor allem aktive und passive Übungen zur Bewegungsfreiheit mit Augenmerk auf die volle Extension sind wichtig, um Schmerzen zu lindern und patellofemorale Veränderungen zu verhindern [11, 68, 89]. In der intermediären Phase zwischen der 6. und 12. Woche wird zusätzlich die Muskulatur der unteren Extremität weiter aufgebaut. Ziel in dieser Phase ist es, alltägliche Aufgaben lösen zu können, ohne die Einheilung des Transplantats negativ zu beeinflussen [68]. In der Spätphase der Rehabilitation soll die dynamische Gelenkstabilität zurückerlangt werden, um auch herausfordernden Sportaktivitäten wieder nachgehen zu können. Die dynamische Gelenkstabilität wird dabei definiert als die Fähigkeit des Knies auch bei plötzlichen Veränderungen der Belastung stabil zu bleiben [68, 90].

Insgesamt besteht das Rehabilitationsziel darin, die vollständige Streckung des Knies und die Kniebeugung von 100°-110° sicherzustellen. Zusätzlich soll durch physiotherapeutische Maßnahmen die muskuläre Stabilität des Kniegelenkes wiederhergestellt werden. Kniebelastende Sportarten oder Tätigkeiten sollten frühestens nach 6 Monaten wieder aufgenommen werden. Nach einem konservativen Behandlungsansatz ist die spätere körperliche Leistungsfähigkeit eingeschränkt und liegt auf einem insgesamt niedrigen Leistungsniveau, bei operativem Verfahren und guter Patienten-Compliance können hohe Leistungsniveaus erreicht werden [46].

Als unausweichliche Langzeitfolge der VKB-Ruptur wird die Osteoarthritis angesehen, mit einer Prävalenz von 50-80 % innerhalb von 10 Jahren nach dem Trauma [48, 71]. Eine Rekonstruktion des Kreuzbandes soll diese Entwicklung verhindern oder wenigstens verzögern. Ob dies wirklich stimmt wird noch kontrovers diskutiert. Auswertungen verschiedenster Studien haben ergeben, dass das Auftreten der Osteoarthritis eng mit Verletzungen und Operationen des Meniskus verknüpft ist. So war die Wahrscheinlichkeit, nach einer VKB-Rekonstruktion eine Osteoarthritis zu entwickeln, bei den Patienten, die zusätzlich einer Meniskektomie unterzogen wurden, um das bis zu 3,5-fache höher. Die eigentliche Prävalenz der Osteoarthritis nach VKB-Rekonstruktion ist vermutlich geringer als eigentlich angenommen. Allerdings bilden Verletzungen des Meniskus aufgrund von Instabilität bei Kreuzbandrupturen und Meniskektomien einen deutlichen Risikofaktor ab [68].

2.7 Interferenzschrauben

Interferenzschrauben sind chirurgische Implantate zur Fixierung von Bändern oder Sehnen im Knochen. Sie werden vor allem im Rahmen von Rekonstruktionsoperationen verwendet. Das Wort „Interferenzschraube“ lässt sich von der englischen Begrifflichkeit „interference fit“ ableiten, was übersetzt „Presspassung“ heißt. Es bedeutet, dass die verwendeten Schrauben größer sind als die für die vorgesehenen Bohrkanäle, dadurch wird das Transplantat im Bohrkanal von der Schraube an den Knochen gepresst [91]. Diese Tatsache erklärt die initial hohe Festigkeit und die frühe Knocheneinheilung des Transplantats. Das häufigste Einsatzgebiet ist die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbands nach dessen Ruptur [68]. Sie ermöglichen eine anatomisch recht genaue Rekonstruktion an den ursprünglichen Ansatzpunkten des vorderen Kreuzbandes. Durch das Verhindern von Bewegung des Transplantats innerhalb des Knochenkanals wird die Einheilung der Sehne in den Knochen gefördert [85, 86].

2.7.1 Werkstoffe

Für die Herstellung bioresorbierbarer Interferenzschrauben stehen heutzutage viele verschiedene Werkstoffe zur Verfügung. Diese werden nicht nur isoliert eingesetzt, sondern auch in Kombination miteinander. Durch das Kombinieren verschiedener Materialien in unterschiedlichen Verhältnissen, können die physikalischen Eigenschaften, wie z.B. Zerfallszeiten der Schrauben, beeinflusst werden. Durch den Zusatz weiterer Werkstoffe, wie z. B. Biokeramiken, kann auch die Knochenneubildung beeinflusst und die Zerfallszeit zusätzlich variiert werden. In Verbindung mit Biokeramiken werden bioresorbierbare Schrauben auch als sogenannte Biokomposit-Schrauben bezeichnet.

2.7.1.1 Bioresorbierbare Polymere

Die am häufigsten eingesetzten Stoffe sind bioresorbierbare Polymere aus der Familie der Polyester, wie sie auch für chirurgisches Nahtmaterial verwendet werden. Sie werden im Körper durch enzymatische oder nicht-enzymatische Hydrolyse der Esterbindungen abgebaut [37]. Die Bioresorbierbarkeit hängt dabei nicht nur vom Material selbst ab, sondern auch von den Umgebungsbedingungen, in die es eingebracht wird.

Aufgrund der guten mechanischen Eigenschaften werden für orthopädische Zwecke vor allem die Polyglykolsäure (PGA) und Polylaktid (PLA) verwendet. Der Einsatz von PGA wird allerdings durch dessen niedrige Löslichkeit und schnellen Abbau mit Freisetzung von Säurepartikeln eingeschränkt, darum wird es gerne in Kombination als Co-Polymer verwendet [83]. PLA wurde schon in der 1960er Jahren als nicht-toxisches und nicht-gewebereaktives Material entdeckt, welches langsam im Körper abgebaut wird, ohne sich dabei in vitalen Organen anzureichern. Beim Abbau entsteht Milchsäure, die dem Kohlehydratstoffwechsel des Körpers zugeführt wird [43]. Der hydrolytische Abbau von PLA verläuft insgesamt langsamer als bei PGA. PLA existiert in zwei optischen Formen, D-Laktid (PDLA) und L-Laktid (PLLA), die sich sowohl in ihren mechanischen Eigenschaften wie auch in ihrer Abbaugeschwindigkeit unterscheiden. Die physikalischen Eigenschaften und Bioresorbierbarkeit von PLA können durch Bildung eines Co-Polymers wie z. B. PLGA (PLA + PGA) oder durch unterschiedliche Verhältnisse aus den Stereoisomeren (PDLA:PLLA) beeinflusst werden. [83].

2.7.1.2 Biokeramiken

Als Biokeramiken zur Herstellung von Biokomposit-Schrauben werden überwiegend Hydroxylapatit (HA) und Trikalziumphosphat (TCP) genutzt. Kalziumphosphathaltige Biokeramiken gelten als bioaktiv und osteokonduktiv. Bioaktivität bedeutet in diesem Kontext, dass die Substanzen beim Zerfall Kalzium- und Phosphat-Ionen freisetzen. Als Osteokonduktivität bezeichnet man die Eigenschaft, dem sich neubildenden Knochen als Gerüst zur Führung entlang ihrer Oberfläche zu dienen. Als HA wird im Allgemeinen das Calcium-Hydroxylapatit mit der Summenformel $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ bezeichnet, im Körper ist es eine wichtige Grundsubstanz der Mineralisation des Knochens. Synthetisch hergestelltes HA stellt eine kostengünstige Alternative zu Auto- und Allografts aus Knochen dar und wird als Material zur Knochenreparatur und -regeneration verwendet. TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ist eine der am häufigsten genutzten, bioresorbierbaren Kalzium-Phosphat-Verbindungen im Rahmen von Implantatmaterialien. Es kommt in vier verschiedenen Formen vor, die sich zum Teil in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden und alle als Biomaterial verwendet werden. Am weitesten verbreitet ist der Gebrauch von β -TCP. Es kann sich *in vivo* nicht spontan durch Hydrolyse auflösen, sondern ist auf die Anwesenheit aktiver Zellen angewiesen.

Ein TCP-Implantat wird schrittweise abgebaut und durch nachwachsenden Knochen ersetzt. HA-basierte Keramiken weisen im Vergleich zu TCP hingegen eine eher schlechtere Abbaubarkeit auf [42].

Um die Resorptionsrate dieser Biokeramiken besser kontrollieren zu können, kommt eine Kombination aus HA und TCP zum Einsatz, das sogenannte biphasische Kalziumphosphat (BCP). Je nach Verhältnis der beiden Grundsubstanzen lässt sich die Bioaktivität des BCP verändern. Das Konzept dahinter ist ein optimaler Ausgleich zwischen dem stabileren HA und dem löslicheren TCP. Auch BCP ist bioabbaubar und bildet durch seine Struktur das Grundgerüst für eine Knochenneubildung. Der Hauptvorteil dieses Gemisches liegt in der direkten und starken Verbindung zum Knochen, in den es eingebracht wird. Anwendung findet es unter anderem auch in der Zahnmedizin, sowie in der Orthopädie im Rahmen von zervikalen Arthrodesen oder bei Valgisierungs-Operationen [42].

Durch die Verbindung von den obengenannten Polymeren mit diesen Biokeramiken entstehen sogenannte Komposit-Stoffe. Durch den Gebrauch verschiedener Anteile und unterschiedlicher Stoffe lassen sich deren mechanische Eigenschaften auf vielfache Art modifizieren. Zusätzlich stellen die enthaltenen Biokeramiken eine Kalzium- und Phosphatquelle dar, die bei der Remineralisierung helfen kann [42]. Ein weiterer positiver Effekt besteht in der Neutralisierung der aus den Polymeren freigesetzten Säurepartikel durch die Kalzium-Phosphat-Ionen. Durch dieses Puffersystem soll der pH-Wert stabil gehalten werden und überschießende Entzündungsreaktionen ausbleiben. Durch eine schnelle Knochenintegration soll eine Aufweitung der Bohrkanäle verhindert werden [6].

2.7.2 Biokompositmaterialien in Verwendung als Interferenzschraube

Aufgrund der Vielfältigkeit der Werkstoffe und ihrer unzähligen Kombinationen lässt sich die Studienlage zum Thema der Biokompositmaterialien nur schwer erfassen. Im Allgemeinen vergleichen die Studien entweder generell bioresorbierbare Schrauben mit alternativen Fixierungsmodellen, oder widmen sich der Untersuchung von unterschiedlichen Eigenschaften von bioresorbierbaren Schrauben ohne HA oder TCP *versus* Biokomposit-Schrauben und deren jeweiligen Verhalten im Knochen. Es wurden vor allem Daten erhoben, wie gut und wie schnell die Resorption verläuft und wie gut die jeweilige Schraube durch neuen Knochen ersetzt wird [6, 8–10, 44].

So zeigte sich z. B., dass PLLA-Schrauben teilweise bis zu 5 Jahren benötigen, bis sie vollständig im Knochen abgebaut waren und sie wurden dabei unzureichend bis gar nicht von neuem Knochen ersetzt. Durch die Verwendung einer Schraube aus PLLA zusammen mit TCP konnte die Resorptionszeit signifikant gesenkt und eine wesentlich deutlichere Knochenintegration nachgewiesen werden. Eine Modifikation dieser Schraube, bei der eine Mischung aus PLLA und PGA zusammen mit TCP verwendet wurde, erzielte bezüglich dieser Parameter nochmals bessere Ergebnisse [6, 9]. Die Verwendung von TCP als osteokonduktives Material erwies sich als sinnvoll [10]. In klinischen Studien zeigten sich weder bei den sich langsam auflösenden noch bei den sich rascher zersetzenden Schrauben gehäuft lytische Veränderungen oder Zystenbildung im Knochen [8]. Postoperativ ergaben sich keine statistischen Differenzen bezüglich des Bewegungsumfanges des Aktivitätslevels des Patienten, oder der Kniefunktionalität im Vergleich von bioresorbierbaren Schrauben und Metallschrauben [39]. Gegenüber herkömmlicher Interferenzschrauben aus Metall erwiesen sich bioresorbierbare Schrauben als vorteilhaft, so verringerte sich das Risiko der Transplantatlazeration, die Störung von bildgebenden Verfahren oder Probleme bei der Revisionschirurgie. Durch kannülierte Schrauben konnte auch das Risiko einer Fehlplatzierung der Schraube gesenkt werden, da sie über einen Führungsdraht eingebracht werden können [8]. Die initiale Fixationsstärke ist dabei mit der von Metallschrauben vergleichbar [39]. Unter geometrischen Gesichtspunkten zeigte sich, dass vor allem die Länge und der Durchmesser entscheidende Maßstäbe für ein problemfreies Einheilen der Transplantate bei gleichzeitig hoher primärer Stabilität sind [32].

Diskussionswürdig bleibt aber vor allem, ob der Auflöseprozess der Schrauben nicht doch ein Problem darstellt. Läuft dieser Prozess zu zügig ab, kann es zu einer hohen Konzentration an sauren Molekülen innerhalb des Gewebes kommen. Diese Verschiebung des pH-Wertes kann lokale, chronische Entzündungen fördern, eine adäquate Knochenintegration verringern und so den Heilungsprozess behindern [44]. Der Einsatz kalziumphosphathaltiger Biokeramiken soll dieses saure Milieu zwar abpuffern, ob die in den Polymeren eingesetzten Anteile von bis zu 30 % diese Aufgabe jedoch ausreichend erfüllen ist nicht hinreichend bewiesen.

2.7.3 Transplantateinheilung im Knochentunnel

Ein enger Kontakt zwischen dem Transplantat und dem Knochen, wie er durch eine Interferenzschraube erreicht werden kann, ist wichtig für die korrekte Einheilung. Die Einheilungszeit der Knochenenden von BTB-Transplantaten im Bohrkanal beträgt ungefähr 12 Wochen, die primäre Verankerung der Sehne im Knochenkeil bleibt dabei erhalten. Ebenfalls bilden sich nach 12 Wochen die ersten Sharpey-Fasern aus, die die Sehne im Knochenkanal verankern [31]. Nach 16-20 Wochen ist das komplette Einwachsen der Sehne abgeschlossen [96]. Bei STS-Plastiken zeigen sich nach 4 Wochen erste, kaum organisierte kollagene Fasern zwischen Knochen und Sehne. Nach 12 Wochen lassen sich auch hier die ersten Sharpey-Fasern nachweisen, ausgereift sind diese allerdings erst nach ca. 26 Wochen [31, 96]. Einheilung und Remodelling des Knochens laufen im spongiösen femoralen Knochen schneller ab als im tibibialen Anteil und werden von mechanischem Stress beeinflusst [96].

Ein großer Schwachpunkt über alle Heilungsstadien hinweg ist allerdings weniger die Art der Fixierung, sondern der Insertionspunkt des Transplantats [85]. Sobald am Insertionspunkt eine adäquate Heilung erfolgt ist, ist der im Knochenkanal gelegene Anteil des Transplantats vor Stresseinwirkungen geschützt. Daraus resultieren eine ungestörte Knochenneubildung und eine bessere Resorption eventuell eingebrachter Materialien [86]. Das Auftreten von Aufweitungen der Bohrkanäle bei Verwendung von Interferenzschrauben wird kontrovers beschrieben. In manchen Studien wurden Tunnelaufweitungen beobachtet [25], in anderen wiederum verneint [8, 86]. Ob es ursächlich an der Fixierungsmethode, an dem Material der Schrauben oder an ihren geometrischen Eigenschaften liegt ist nicht endgültig geklärt [8, 39].

3 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war die Analyse des Heilungsprozesses nach operativer Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mittels einer bereits marktetablierten Biokomposit-Interferenzschraube im Schafmodell zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Beobachtungszeitpunkte erfassten einen Zeitraum von 6 bzw. 52 Wochen nach der operativen Versorgung mit einem VKB-Transplantat. Anschließend erfolgte eine histologische Erfassung zellulärer und extrazellulärer Umbauprozesse des Knochens während der Heilung im Grenzbereich zum eingebrachten Fremdmaterial. Untersucht wurden Zellzahlen, Gewebedifferenzierung und Angiogenese. Zusätzlich wurde das Resorptionsverhalten der Schrauben innerhalb dieser Zeiträume beobachtet. Folgende Aspekte sollten im Verlauf dieser Studie überprüft werden:

1. In welchem Umfang wird die verwendete Schraube im beobachteten Zeitraum resorbiert?
2. Unterscheiden sich die ablaufenden Gewebeprozesse zwischen den beiden Zeitpunkten?
3. Kann eine Einheilung nach 52 Wochen unter Verwendung von Biokeramiken beobachtet werden?

Eine weitere Motivation zur Durchführung dieser Analyse ergab sich aus der veröffentlichten Studie des Herstellers (Arthrex) der hier verwendeten Biokomposit-Interferenzschraube, die ebenfalls an einem Schafmodell erfolgte. Für die Testung der Biomechanik in der Herstellerstudie wurde lediglich eine Probenzahl von $n = 6$ verwendet, für die weiteren klinischen und histologischen Auswertungen wurde keine genaue Stichprobenanzahl angegeben [3].

Des Weiteren wurde die Degradation der Schraube vorwiegend durch die Verwendung von CT-Aufnahmen bewertet. Eine histologische Auswertung der Proben erfolgte wenig umfangreich ausschließlich unter Verwendung von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen. Eine weitere histologische Differenzierung des Gewebes sowie eine Untersuchung der Zellzahlen erfolgten nicht [3]. Dieser Umstand schränkt die Beurteilung der ablaufenden Gewebe- und Heilungsprozesse und die Aussagekraft der Herstellerstudie insgesamt stark ein.

Daraus resultiert der Bedarf für eine ausführlichere Studie mit größerer Probenzahl und erweiterter Methodik.

Mit der im Folgenden beschriebenen Analyse soll außerdem eine Datenbasis geschaffen werden, um Vergleiche mit neu designten Schrauben oder anderen Werkstoffen zu ermöglichen. Diese sind die Grundlage, um Verbesserungen in der operativen Kreuzbandrekonstruktion gegenüber bisher etablierten Methoden zu erzielen.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Für diese Implantat-Studie wurde das Schaf als Tiermodell gewählt. Kleintiere wie Ratte oder Kaninchen waren auf Grund der geringen Körpergröße nicht gut geeignet, da hier ein zusätzliches Verfahren für die Herstellung von kleineren Implantaten erforderlich gewesen wäre. Im Schafmodell hingegen konnte die marktetablierte Schraube der Firma Arthrex unverändert eingesetzt werden.

Die für diese Studie genutzten 13 Merino-Landschafe mit einem Alter von zwischen 5 und 6 Jahren stammten aus der Region Wiesbaden und wurden randomisiert ausgewählt. Alle Eingriffe, Behandlungen und Versuche an den Tieren wurden unter tierärztlicher Aufsicht in der zentralen Forschungseinrichtung der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main unternommen. Der Tierversuchsantrag (Aktenzeichen: V54 – 19c 20/15 – FU/1032, Gen.-Nr. FU/1032) wurde am 25.09.2014 durch das Regierungspräsidium Darmstadt (Wilhelminenstraße 1–3, Wilhelminenhaus, 64283 Darmstadt, Deutschland) gemäß §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

4.2 Studiendesign

Die gesamte Versuchsdauer wurde auf ein Jahr festgesetzt und dauerte von September 2014 bis Oktober 2015. Die Operationen wurden nach folgendem zeitlichen Modell durchgeführt: Zum Zeitpunkt 1 (0 Wochen = 0W) wurde bei allen Tieren das rechte Knie operiert und mit der entsprechenden vorderen Kreuzbandplastik unter Verwendung der Biokomposit-Interferenzschrauben versehen (siehe Kap. 4.4.2, S. 41). Die zweite Operation zum Zeitpunkt 2 (46 Wochen = 46W) wurde sechs Wochen vor der Euthanasie durchgeführt; dabei wurde bei allen Versuchstieren die linke Seite mit den Sehnenimplantaten und Biokomposit-Schrauben versorgt. Die Euthanasie erfolgte dann zum Zeitpunkt 3 nach insgesamt 52 Wochen (52W). Eine Unterscheidung der Gesamtpopulation in speziellen Untergruppen erfolgte nicht.

Die Einteilung der späteren Versuchsreihen definierte sich durch den zeitlichen Verbleib der Schrauben und des Sehnenimplantats im Organismus. Da die Implantate des rechten Knies zu Beginn der Studie eingebracht wurde und die des linken Knies sechs Wochen vor der Euthanasie, ergaben sich, wie in Abbildung 10 dargestellt, für die späteren Untersuchungen die Heilungszeiträume von 52W (Zeitpunkt 1-3) und 6W (Zeitpunkt 2-3).

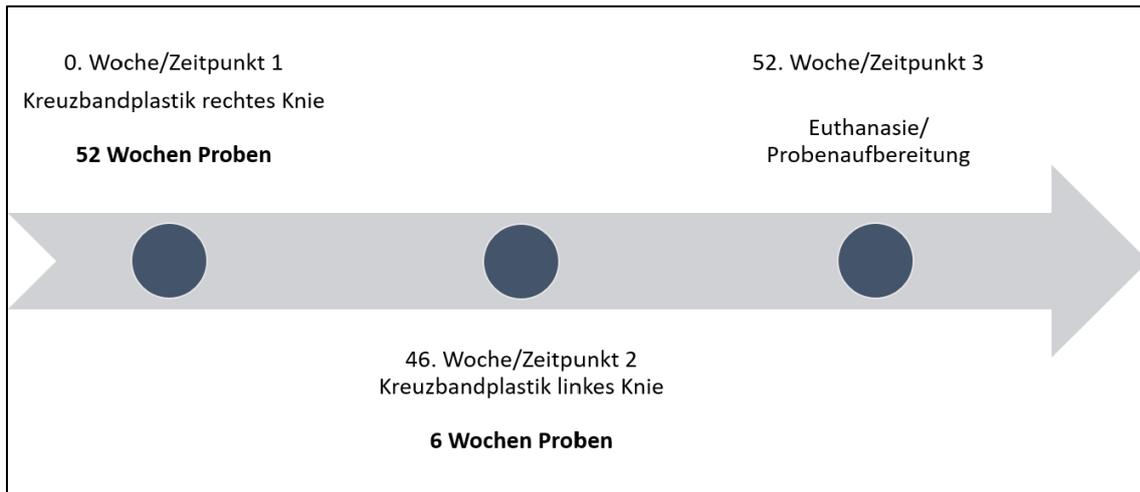


Abbildung 10: Studiendesign; Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Operationen und der Euthanasie

Insgesamt ergaben sich 26 Operationsproben, die zu gleichen Anteilen auf beide Zeiträume verteilt waren. Davon wurden acht 6W-Proben und sieben 52W-Proben für biomechanischen Untersuchungen verwendet. Die übrigen Proben wurden für die nachfolgenden histologischen Versuche genutzt. Da jede Probe nochmals in *Tibia* und *Femur* unterteilt wurde, ergaben sich für die Studie folgende Fallzahlen: 6W = 10 und 52W = 12.

Als Fixierungssystem wurde bei allen Versuchstieren dieser Analyse eine BioComposite® Interferenzschraube der Firma Arthrex verwendet (Arthrex Inc, Naples, FL, USA). Sie setzte sich aus 70 % PLDLA und 30 % BCP zusammen. Für die PLDLA-Komponente wurde ein Mischverhältnis von 70 % PLLA und 30 % PDLA verwendet, die BCP-Komponente bestand aus 60 % HA und 40 % TCP.

4.3 Tierhaltung

Im Verlauf der gesamten Versuchsdauer erfolgte eine allseits artgerechte Tierhaltung nach vorgegebenen Standards. Alle Tiere wurden von erfahrenem veterinärmedizinischem und -pflegerischem Personal betreut. Die Narkosen und Operationen sowie die postoperative Nachsorge und Euthanasie wurden ebenfalls unter veterinärmedizinischer Kontrolle und Anwesenheit durchgeführt.

Im unmittelbaren Vorfeld der Operationen wurden die Tiere in den Stallungen der zentralen Forschungseinrichtung in Frankfurt am Main untergebracht. Dort wurden sie in Kleingruppen gehalten und mit Futter, Wasser und Tageslicht ausreichend versorgt. Die Übergangszeiten bis zur nächsten Operation bzw. bis zur Euthanasie verbrachten die Versuchstiere jeweils unter Aufsicht des Schäferbetriebes.

Alle Versuchstiere sind zu den 2 Operationszeitpunkten und der Euthanasie tierärztlich untersucht und gewogen worden. Die Schafe wurden gewichtsadaptiert mit 0,2 mg/kg Febantel (Rintal 2,5 % ad us. vet., Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) zur prophylaktischen Entwurmung behandelt.

4.4 Operationsablauf

Zu den beiden Zeitpunkten 0W und 46W wurden die Operationen jeweils in einem Zeitraum von ca. 2-3 Wochen durchgeführt, dabei wurden 2-5 Schafe pro Tag operiert. Die Operationen zur Kreuzbandrekonstruktion sowie die Euthanasie und Probenentnahme erfolgten jeweils in der Forschungseinrichtung in Frankfurt am Main Mitarbeitende der Arbeitsgruppe PD Thaqif El Khassawna (Experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen).

4.4.1 OP-Vorbereitung und Anästhesie

Die zu operierenden Versuchstiere wurden zwölf Stunden vor dem geplanten Eingriff in den Einzelställen des Forschungsinstituts voneinander isoliert. Dabei wurden die Tiere, bis auf ausreichend Trinkwasser, nüchtern belassen. Im Vorfeld der Anästhesie bekamen die Schafe folgende Prämedikation intramuskulär in einen Hinterlauf verabreicht:

- 10 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 100 mg/ml, Bela-Pharm GmbH & Co.KG, Vechta, Deutschland)
- 0,01 ml/kg Xylazin (Rompun® 2 %, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)
- 0,3 mg/kg Midazolam (Midazolam Rotexmedica 5 mg/ml, Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland)
- 0,01 mg/kg Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg/ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Bei Versagen der betäubenden Wirkung wurden die Medikamente in halber Dosierung erneut verabreicht. Die Schafe wurden im sedierten Zustand gewogen und im Bereich des Operationsgebiets geschoren, um postoperative Komplikationen zu minimieren. Das Operationsgebiet wurde mit einer Enthaarungscreme (Pilca Enthaarungscreme, DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co.KG) von letzten Wollresten gereinigt. Für die Operationen zu den Zeitpunkten 0W und 46W wurde jeweils ein intravenöser Zugang zur *Vena cephalica* des Vorderlaufs geschaffen. Dazu wurde eine sterile Venenverweilkanüle (Vasofix® 17G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet.

Für die operativen Eingriffe zum Einbringen der Kreuzbandplastiken wurde die total-intravenöse Anästhesie als Narkoseform gewählt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 2 mg/kg Propofol (Propofol 2 %, 20 mg/1 ml, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) zur Hypnose und 2 µg/kg Fentanyl (Fentanyl-Hameln 50 µg/kg, hameln pharmaceuticals GmbH, Hameln, Deutschland) zur Analgesie. Nach erfolgreicher Einleitung wurden die Schafe intubiert. Die Beatmung erfolgte maschinell (Hamilton C2®, Hamilton Medical AG, Bonaduz, Schweiz). Während der laufenden Operation wurde die Narkose mittels Propofol-Dauerperfusor mit 20 ml/h fortgeführt. Die Laufrate wurde zu Beginn der Operation auf 50 ml/h erhöht.

Präoperativ erhielten alle Versuchstiere eine prophylaktische Antibiotikatherapie mit 0,1 mg/kg Penicillin (Veracin® RS, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) und eine subkutane Injektion von 0,01 mg/kg Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic® Ampullen 0,3 mg, RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) zur Analgesie.

Die Versuchstiere wurden mitsamt einer Tragehilfe auf dem Operationstisch gelagert. Dies gewährleistete nach Abschluss der Operation das unmittelbare Verbringen der Tiere in ihre Stallboxen. Die Lagerung auf dem OP-Tisch erfolgte auf der nicht zu operierenden Seite, die Vorder- und Hinterläufe der Tiere wurden zusätzlich fixiert.

Nach ausreichender und wiederholter Desinfektion des Operationsgebiets erfolgte die sterile Abdeckung.

4.4.2 Entnahme des autologen Sehnenmaterials

Aufgrund anatomischer Unterschiede zwischen Schaf und Mensch konnte die Semitendinosussehne nicht als Transplantat verwendet werden. Im Gegensatz zur länglichen, dünnen Sehne des Menschen findet sich beim Schaf eine breite und kurze Semitendinosussehne. Deshalb wurde bei den Versuchstieren, wie auch schon in anderen Studien, auf die Sehne des *Musculus flexor digitorum superficialis* als Kreuzbandersatz ausgewichen [35]. Sie verläuft parallel zur Achillessehne (*Tendo calcaneus*). Über einen 5 cm großen Hautschnitt wurde das Sehnenfach eröffnet und ein ungefähr 7 cm langes Teilstück der Sehne entnommen (Abb. 11 a). Eine spannungsfreie Rekonstruktion der Sehne war nicht möglich. Die Sehnenenden wurden deshalb nicht wieder adaptiert. Eine gravierende Beeinträchtigung der Versuchstiere ergab sich durch diese Behandlung nicht. Haut, Unterhautgewebe und Sehnenfach wurden mittels Naht fachgerecht verschlossen (Vicryl-Plus 3-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland). Für den späteren Einzug des Transplantates in den Knochenkanal wurde es an den Enden mit resorbierbaren Fäden präpariert (Abb. 11 b). Zum Schutz vor Austrocknung und Verunreinigung wurde das präparierte Sehnenmaterial bis zur Implantation in steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagert.

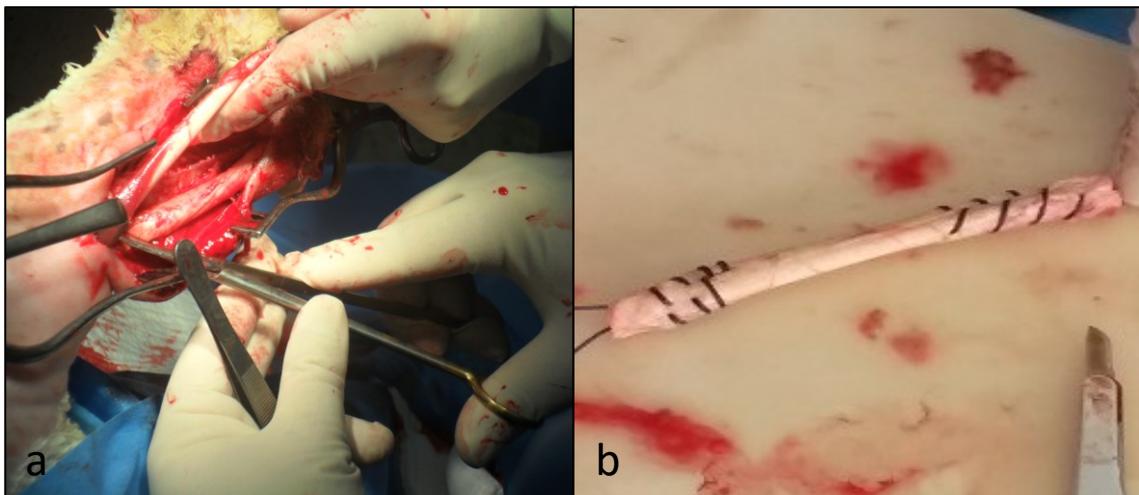


Abbildung 11: Sehnenentnahme und Aufbereitung; a = Eröffnetes Sehnenfach und Vorbereitung der Sehnenentnahme des *Musculus flexor digitorum superficialis*, b = Präparation der Sehne mit einer Baseball-Naht mittels resorbierbarem Nahtmaterial.

4.4.3 Vordere Kreuzbandrekonstruktion

Der Eingriff am Knie wurde über einen 10 cm langen Hautschnitt lateral der *Patella* begonnen. Blutstillung im Subkutangewebe erfolgte mittels bipolarer Elektrokauterisation. Die Gelenkkapsel wurde durch eine Inzision des *Ligamentum femopatellaris* eröffnet. Durch Luxation der *Patella* nach medial und einer Flexion des Knies auf 90° wurde der Eingriffsbereich vergrößert. Es folgte die Resektion des vorderen Kreuzbandes bis zu den Insertionspunkten an *Tibia* und *Femur*. Dort wurden unter Zuhilfenahme eines Zielgerätes Kirschnerdrähte entlang der Achse des entfernten Kreuzbandes in *Femur* und *Tibia* eingebracht. Die Nutzung des Zielgerätes garantierte die anatomisch korrekte Drahtführung innerhalb des Knochens. Zur Anlage der Knochentunnel, in denen die Transplantate fixiert werden sollten, wurden die Kirschnerdrähte überbohrt. Die finalen Bohrkanäle besaßen einen Durchmesser von 8,5 mm. Die präparierten Transplantate wurden mit Hilfe der Halterungsfäden in die Bohrungen eingebracht. Zur Fixierung der Sehnen wurde eine Biokomposit-Interferenzschraube der Firma Arthrex verwendet (BioComposite® Interferenzschraube, Arthrex Inc, Naples, FL, USA). Diese wurde mit dem für die vorgesehenen Schraubendreher in die Bohrkanäle eingebracht (Abb. 12).

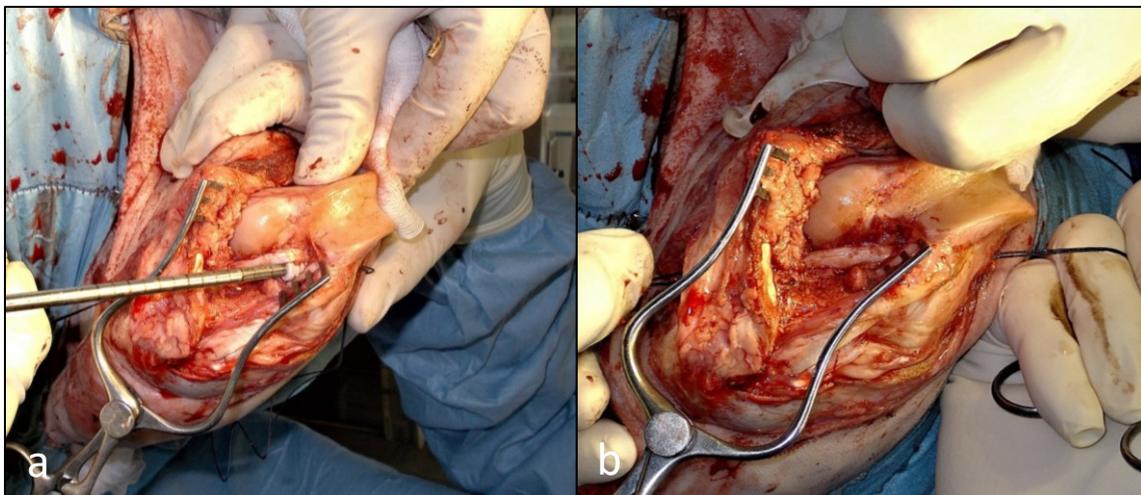


Abbildung 12: Kreuzbandrekonstruktion; a = Einbringen der Biokomposit-Schraube in den femoralen Bohrkanal, b = Sicht auf das eingebrachte Sehnenransplantat.

Am *Femur* geschah dies über die gelenkseitige Öffnung des Knochentunnels, an der *Tibia* über die Öffnung an der Streckseite. Mit Hilfe der Halterungsfäden wurde das Transplantat während dieses Operationsschrittes unter Spannung gehalten.

Dieses Vorgehen sollte ein Verkanten des Sehnenmaterials mit der Schraube und dem Knochen verhindern, zusätzlich konnte so die spätere Stabilität optimiert werden.

Auf diese Weise wurde die femorale Schraube zuerst implantiert. Für das Einbringen der tibial gelegenen Schraube wurde das Knie in Beugstellung gehalten. Vor dem Abtrennen der Halterungsfäden wurde der feste und optimale Sitz der Schraube und des Transplantates geprüft. Hierzu wurde mittels Overholt-Klemme Zugkraft auf den Kreuzbandersatz ausgeübt, um einen eventuellen Korrekturbedarf festzustellen.

4.4.4 OP-Ausleitung und Wundverschluss

Der Wundverschluss erfolgte nach Reposition der Kniescheibe und unter Verwendung selbstauflösendem Nahtmaterials durch eine fortlaufende Naht des Kapsel-Band-Apparates (Vicryl-Plus 2-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland). Haut und Unterhautfettgewebe wurden ebenfalls mittels resorbierbarer Nähte (Vicryl-Plus 3-0, Firma s.o.) durch Einzelknopfnähte verschlossen. Dieses Vorgehen ersparte den Versuchstieren eine weitere Sedierung im Rahmen einer Klammer- bzw. Nahtmaterialentfernung. Die Entnahmestelle des autologen Sehnenmaterials wurde auf identische Weise verschlossen. Die Nahtstellen wurden nach Entfernung der sterilen Abdeckungen mit Wundsprühverband versorgt (Opsite Spray, Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland). Der Propofol-Dauerperfusor wurde ca. zwanzig Minuten vor Operationsende auf 25 ml/h reduziert und nach Abschluss der Subkutannähte beendet. Die Verfrachtung der Versuchstiere in ihre Einzelboxen erfolgte nach dem Einsatz einer suffizienten Spontanatmung.

4.5 Postoperative Versorgung

Bis zum fünften postoperativen Tag wurden die Versuchstiere weiter antibiotisch behandelt und bekamen dafür an jeden zweiten Tag eine intramuskuläre Penicillininjektion (Veracin[®] RS, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland). Zur postoperativen Analgesie wurde einmal pro Tag 0,5 mg/kg Meloxicam (Metacam[®] 20 mg/ml ad us. vet., Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) intramuskulär injiziert.

Anfangs wurde die Therapie zweimal täglich mit 0,01 mg/kg Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic® Ampullen 0,3 mg RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim, Deutschland) subkutan ergänzt. Das Opiumderivat wurde im weiteren Verlauf unter veterinärmedizinischer Aufsicht langsam reduziert. Über einen weiteren Zeitraum von zwei Wochen wurde eine tägliche Wundkontrolle bei den Schafen durchgeführt und deren Allgemeinzustand beurteilt. Nach Freigabe durch die Veterinärmedizin verbrachten die Versuchstiere die Zeit zwischen den Operationen unter Aufsicht des Schäferbetriebes.

4.6 Euthanasie und Probenentnahme

Zur Euthanasie und Probenentnahme erhielten alle Tiere wie schon bei den vorangegangenen Operationen eine total-intravenöse Anästhesie. Dazu wurde in diesem Fall jedoch ein zentraler Venenkatheter (Ein-Lumen-ZVK, 14G, ARROW GmbH, Erding, Deutschland) in der *Vena jugularis* angelegt. Über diesen Zugang wurde dann eine letale Dosis Pentobarbital-Natrium (Anestesal®, Pfizer, Mexiko-Stadt, Mexiko) in Höhe von 50 mg/kg gegeben.

Sobald der Tod des Tieres eingetreten war und durch einen Veterinärmediziner bestätigt wurde, konnten die Proben entnommen werden. Dazu wurde das *Femur* ein Stück proximal und die *Tibia* etwas distal des Gelenkes durchtrennt und das Kniegelenk im Ganzen entfernt.

4.7 Verarbeitung der Knochenproben

Die so gewonnenen Knochenproben von *Femur* und *Tibia* wurden direkt nach der Entnahme grob von Muskel- und Bindegewebe befreit. Dabei wurden auch die ligamentären Verbindungsstrukturen des Gelenkes entfernt. Für jedes Versuchstier erhielt man so vier Präparate, jeweils ein linkes und ein rechtes Teilstück von *Femur* und *Tibia*. Danach erfolgte der erste grobe Zuschnitt, um die Proben für die Fixierung und Einbettung vorzubereiten, ohne dabei das Schraubenmaterial zu beschädigen. Als Einbettungsmaterial wurde Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet (siehe Kap. 4.8, S. 45). Nach erfolgreicher Einbettung folgten das Erstellen der Schnittpräparate und die histologischen Analysemethoden.

4.8 PMMA Einbettung mit Technovit® 9100

Technovit® 9100 ist ein Einbettungssystem auf Basis von PMMA. Mit Hilfe dieses Systems kann der Arbeitsschritt der Entkalkung ausgelassen und Knochengewebe in kalzifiziertem Zustand verarbeitet werden (Tab. 1). Auf diese Weise wird das Analysieren der Knochenmineralisation und zellulärer Vorgänge z. B. an Grenzflächen von Implantaten möglich.

Die Fixierung und Einbettung der Präparate wurde durch die labortechnische Assistenz im Institut für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität durchgeführt.

Tabelle 1: Komponenten der PMMA-Einbettung; (64715444, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland)

Komponenten	Produkt
Basislösung (stabilisiert):	Technovit® 9100 Basislösung stabilisiert
Härter 1	Technovit® 9100 Härter 1
Härter 2	Technovit® 9100 Härter 2
PMMA-Pulver	Technovit® 9100 PMMA-Pulver
Polymerisationsregler	Technovit® 9100 Regler

4.8.1 Entstabilisieren der Basislösung zur Fixierung

Die eigentliche Stabilisierung schützt die Basislösung gegen Spontanpolymerisation. Die entstabilisierte Lösung wurde genutzt, um eine bessere Durchdringung des Gewebes und Einbettungseigenschaften des PMMA zur Verbesserung der histologischen Ergebnisse bei Hartschnitten zu erreichen. Die Entstabilisierung der Basislösung erfolgte mittels einer mit 50 g Aluminiumoxid gefüllten Chromatographiesäule.

4.8.2 Herstellung der Gebrauchslösungen

Die verwendeten Lösungen für Infiltration und Einbettung wurden nach den in Tabelle 2 angegebenen Verhältnissen angefertigt.

Tabelle 2: Mischungsverhältnis der Gebrauchslösungen

Lösung	Chemikalien
Präinfiltration I	Basislösung (125 ml, stabilisiert) + Xylol (125 ml)
Präinfiltration II	Basislösung (250 ml, stabilisiert) + 0,5 % Härter 1 (1,25 g)
Präinfiltration III	Basislösung (250 ml, entstabilisiert) + 0,5 % Härter 1 (1,25 g)
Infiltration	Basislösung (250 ml, entstabilisiert) + PMMA (20 g) + Härter 1 (1 g)
Stammlösung A	Basislösung (500 ml, entstabilisiert) + PMMA (80 g) + Härter 1 (3 g)
Stammlösung B	Basislösung (44 ml, entstabilisiert) + Härter 2 (17,6 ml) + Regler (2 ml)
Polymerisationslösung	9 Teile Stammlösung A + 1 Teil Stammlösung B, kurz vor Gebrauch mischen

4.8.3 Fixierung, Entwässerung und Infiltration

Zur Fixierung der Gewebeproben wurde die Formaldehydtechnik nach Lillie angewandt (Tab. 3-5). Dazu wurden die Proben über 2-3 Tage bei 4 °C in der Fixierlösung (4 % Paraformaldehydlösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 bis 7,4) gelagert. Über mehrere Tage hinweg folgten anschließend die Schritte der Entwässerung sowie der Prä- und Infiltration. Um die Infiltrationslösungen möglichst tief in die Präparate einzubringen wurden diese mehrmals täglich für zehn Minuten einem Vakuum von -200 mbar im Exsikkator ausgesetzt.

Tabelle 3: Protokoll der PMMA-Einbettung I; Entwässerung

Entwässerung		
Lösungsmittel	Temperatur	Dauer
Ethanol 70 %	RT, bewegen	2 d
Ethanol 70 %	RT, bewegen	2 d
Ethanol 80 %	RT, bewegen	3 d
Ethanol 96 %	RT, bewegen	3 d
Ethanol 100 %	RT, bewegen	4 d
Ethanol 100 %	RT, bewegen	3 d
Ethanol 100 %	RT, bewegen	4 d
Ethanol 100 %	RT, bewegen	3 d
Ethanol 100 %	RT, bewegen	4 d
Xylol	RT, bewegen	12 h
Xylol	RT, bewegen	12 h

Tabelle 4: Protokoll der PMMA-Einbettung II; Präinfiltration

Präinfiltration		
	Temperatur	Dauer
Präinfiltration I	RT, bewegen	5 d
Präinfiltration II	RT, bewegen	5 d
Präinfiltration III	2-8 °C	5 d

Tabelle 5: Protokoll der PMMA-Einbettung III; Infiltration

Infiltration		
	Temperatur	Dauer
Infiltration I	2-8 °C	5-6 d
Infiltration II	2-8 °C	5-6 d
Infiltration III	2-8 °C	5-6 d

4.8.4 Polymerisation

Die Herstellung des Polymerisationsgemisches erfolgte kurz vor Gebrauch mit den Stammlösungen A und B nach dem in Tabelle 2 angegebenen Verhältnis von 9:1. Aufgrund der Größenabweichung der einzubettenden Proben von den üblicherweise erstellten Knochenpräparaten wurden konische Messbecher aus Plastik als Form für die Einbettung verwendet.

Die fertig eingebetteten Proben erhielten so eine Kegelstumpfgeometrie. Die Formen mit den eingelegten Proben wurden langsam bis zum Rand mit Polymerisationsgemisch gefüllt und in den vorgekühlten Exsikkator gestellt. Um wie auch beim Schritt der Fixierung das Medium tief in das Präparat einzubringen und Lufteinschlüsse zu vermeiden, wurde mit dem Exsikkator für mehrere Minuten ein Vakuum von -200 mbar erzeugt. Anschließend wurden die Formen wieder mit Polymerisationsgemisch aufgefüllt und mit Parafilm luftdicht verschlossen. Die so eingebetteten Proben wurden zum Abschließen der Polymerisierung für zwei Tage bei -4 °C eingelagert. Nach langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur konnten die Präparate weiterbearbeitet werden.

4.9 Bildgebung mit dem Mikro-CT

Bevor die fixierten Präparate weiterbearbeitet werden konnten, erfolgte eine Bildgebung jeder eingebetteten Knochenprobe durch das Mikro-CT (Quantum GX microCT Imaging System, PerkinElmer Health Sciences, Waltham, MA, USA).

Die CT-Bilder wurden anschließend verwendet, um 3D-Modelle zu generieren und damit den genauen Verlauf der Schraube und des Bohrkanals innerhalb des Knochens darzustellen. Diese Informationen dienten als Schablone für das Einzeichnen der Schnittführung auf den PMMA-Blöcken. Ebenfalls konnte vor dem Zurechtsägen der Zustand der Schraube orientierend beurteilt werden (siehe Kap. 5, S. 56).

4.10 Zurechtschneiden des Probematerials

Zum groben Zurechtschneiden der in PMMA eingebetteten Knochenproben wurde das EXAKT Trennschleifsystem 310 CL (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet, so sollte überschüssiges Einbettungs- und Knochenmaterial entfernt werden. Unter Zuhilfenahme der zuvor erstellten 3D-Modelle wurde die Schnittführung auf die Proben übertragen, um zu verhindern, dass beim Zuschneiden der Proben mit dem Exakt-Trennschleifsystem die Schraube und das angrenzende Gewebe geschädigt werden, denn diese Bereiche waren für die weiteren Versuchsreihen relevant.

Da die Proben bedingt durch den Einbettungsprozess eine recht ungünstige Kegelstumpfgeometrie aufwiesen und die Übertragung der Schablonen auf die PMMA-Blöcke manuell durchgeführt wurde, konnte dies allerdings in wenigen Fällen nicht komplett verhindert werden. Die Herstellung der Präparate wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt. Die final zu bearbeitenden Proben waren nach dem Zurechtschneiden ca. 1,5 cm x 1,5 cm x 3 cm groß.

4.11 Herstellung der Mikroskopier-Präparate

Damit aus den zuvor zurechtgesägten Proben histologisch verwertbare Präparate erstellt werden konnten, wurden sie am Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) weiterverarbeitet. Zuerst musste so viel Knochen- und Einbettungsmaterial abgetragen werden, dass die eingebrachte Schraube sichtbar wurde und sich in ihrem größten Durchmesser zeigte. Aus diesem Bereich der Probe sollten die Schnitte zur weiteren Untersuchung gewonnen werden.

Da es sich um nicht-entkalkte Proben handelte, die mit PMMA fixiert wurden, musste im Gegensatz zu Paraffinpräparaten eine andere Technik angewandt werden. Hierzu wurde eine selbstklebende Folie (Cryofilm 2C, Kawamotos Section-Lab Co. Ltd, Hiroshima, Japan) auf der im Mikrotom eingespannten Probe aufgebracht. Dieser Schritt war nötig, um den Erhalt der Knochenstruktur und des eingebrachten Fremdmaterials bei dieser Art von Präparaten zu garantieren.

Bei am Mikrotom eingestellter Schichtdicke von 6 μm konnte nun das endgültige Mikroskopier-Präparat erstellt werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Folie beim Schneideprozess mittels Pinzette von der Klinge des Mikrotoms weggezogen wurde, um ein Aufschieben des Präparats oder eine Zerstörung der Folie zu verhindern. Die auf der Folie fixierten Schnitte wurden dann auf einem zuvor beschrifteten Glasobjektträger befestigt.

Von einer der Proben aus der 6W-Gruppe konnten aufgrund der Materialbeschaffenheit keine zufriedenstellenden Präparate für die histologische Bearbeitung angefertigt werden. Die Gesamtprobenanzahl verringerte sich so um eins auf $n = 21$. Von allen anderen Schrauben wurden mindestens 10 Schnitte für die weiteren histologischen Analysen erstellt.

4.12 Färbungen

Im Rahmen der Studie wurden fünf verschiedene Färbemethoden angewandt, um bestimmte Gewebsanteile oder Zellen sicht- und abgrenzbar zu machen. Neben konventionellen histochemischen Methoden wurden dafür auch enzym- und immunhistochemische Verfahren genutzt, um diese Strukturen anhand ihrer spezifischen Enzyme oder Antigeneigenschaften zu identifizieren. Bei der Enzymhistochemie wird dem nachzuweisenden Enzym ein farbloses, lösliches Substrat angeboten, das durch die Enzymaktivität zu einem unlöslichen Farbstoff umgewandelt wird und so das Enzym im Präparat markiert. Dieser Vorgang ist abhängig von spezifischen Umgebungsbedingungen wie z. B. pH-Wert oder Ionenkonzentration [50]. Die Immunhistochemie hingegen basiert auf der Affinität spezifischer Antikörper zu einer gewebsspezifischen Antigenstruktur (Epitop). Der nachzuweisende Stoff bildet das Antigen, die Antikörper können entweder mono- oder polyklonal sein [50]. Diese primären Antigen-Antikörper-Komplexe können dann durch verschiedene Detektionssysteme im Präparat farblich dargestellt werden. Hierzu wird meist ein sekundärer Antikörper genutzt, der spezifisch an den F_c-Teil des ersten Antikörpers bindet. An diesen zweiten Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches wiederum ein Substrat zu einem Farbstoff umwandelt (Abb. 13). Durch dieses duale Detektionssystem können schon geringe Mengen des Antigens zu einer deutlichen Farbreaktion führen.

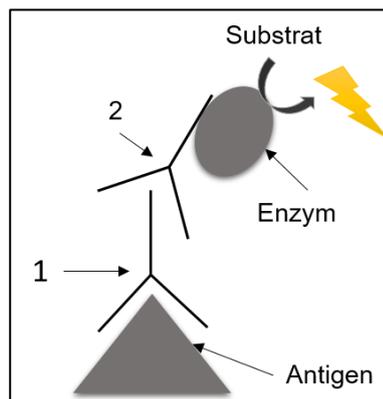


Abbildung 13: Prinzip einer immunhistochemischen Färbungen; Der 1. Antikörper (1) bindet an das zu detektierende Antigen. Der zweite Antikörper (2) bindet den ersten und ist mit einem Enzym gekoppelt, welches das Substrat in einer Farbreaktion umwandelt.

4.12.1 Movat-Pentachrom-Färbung

Diese chemische Färbemethode wird zur Darstellung verschiedener Gewebeelemente in einem histologischen Präparat verwendet und ist gut geeignet für Studien zur chondralen Ossifikation und Frakturheilung. Hierzu werden 5 verschiedene Farbstoffe kombiniert: Alcainblau, Eisenhämatoxylin nach Weigert, Brilliant-Crocein, Säurefuchsin und Safran du Gâtinais.

Das saure Alcainblau bindet elektrostatisch an die z. B. im Knorpelgewebe vorhandenen Glykosaminoglykane und Mucine. Durch Zugabe von alkalischem Ethanol wird es dann in ein wasserunlösliches, blau-grünes Pigment umgewandelt. Die Affinität des Eisenhämatoxylins zu den Zellkernen beruht auf ihrer negativen Ladung und wird zu deren Anfärbung genutzt. Durch Oxidation entsteht aus dem Hämatoxylin Hämatein, zusammen mit den Eisen-Ionen entsteht durch Chelatbildung ein blau-schwarzer Farbstoffkomplex. Brilliant-Crocein und Säurefuchsin werden genutzt, um die acidophilen Elemente, wie zum Beispiel das Zytoplasma anzufärben, welches sich am Ende rötlich darstellt. Safran du Gâtinais wird zur der Färbung des mineralisierten Knochens (dunkelgelb) und des kollagenen Bindegewebes (hellgelb) verwendet [81].

Färbelösungen und -protokoll siehe Anhang (Kap. 9.3, S. 104).

4.12.2 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung

Die TRAP-Färbung basiert auf enzymhistochemischen Prinzipien und wird dazu verwendet aktiv knochenresorbierende Osteoklasten, welche saure Phosphatase exprimieren, darzustellen. Es handelt sich dabei um eine tartratresistente Isoform dieses Enzyms. Dadurch kann eine gewisse Selektivität in der Anfärbung erreicht werden, da viele andere saure Phosphatasen in Gegenwart von Tartrat in ihrer katalytischen Funktion gehemmt werden.

Als Substrat für die saure Phosphatase wurde bei dieser Methode Naphthol-AS-TR-Phosphat genutzt. Zusammen mit dem verwendeten Echtrotsalz zeigten sich die TRAP-positiven Zellen im späteren Präparat leuchtend rot [45]. Zur Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet.

Färbelösungen und -protokoll siehe Anhang (Kap. 9.5, S. 106).

4.12.3 Alkalische Phosphatase (ALP) Färbung

Alkalische Phosphatasen katalysieren die Dephosphorylierung verschiedenster Moleküle wie z. B. Proteine oder Nukleotide. Wie der Name andeutet, läuft diese Reaktion am besten bei alkalischen pH-Werten ab. Die im Menschen gebildete ALP findet sich in der Dünndarmschleimhaut, der Plazenta, sowie Nieren-, Knochen- und Leberzellen. Die drei letztgenannten werden unter dem Oberbegriff der Gewebe-unspezifischen ALP zusammengefasst.

Die ALP des Knochens wird vor allem während der Ossifikation von den Osteoblasten exprimiert und ist in deren Plasmamembran lokalisiert. Das Enzym spielt eine wichtige Rolle in der Mineralisation der Knochengrundsubstanz. Fehlt es, so ist eine Hypomineralisation des Knochengewebes zu beobachten [50].

Wie auch die TRAP-Färbung gehört der Nachweis der ALP zur Enzymhistochemie. Als chromogenes Substrat wird der ALP bei diesem Färbeprozess BCIP (Brom-Chlor-Indolylphosphat) in Verbindung mit NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) angeboten. Diese Substanzen werden von dem Enzym zu einem dunkelblau-violetten Farbstoff umgesetzt [45]. Die Gegenfärbung wurde mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat durchgeführt.

Färbelösungen und -protokoll siehe Anhang (Kap. 9.1, S. 101).

4.12.4 α -Smooth-Muscle-Actin (ASMA) Färbung

Hierbei handelt es sich um eine immunhistochemische Färbemethode mit deren Hilfe glatte Muskelzellen sichtbar gemacht werden sollten. ASMA steht dabei für „ α -Smooth-Muscle-Actin“, also ein Antikörper, der sich spezifisch gegen Epitope auf glatten Muskelzellen richtet und somit in der Lage ist sie selektiv zu markieren. Mit Hilfe der Antikörper konnte so die glatte Muskulatur der sich ausbildenden Blutgefäße innerhalb des Knochengewebes dargestellt werden.

Als primärer Marker wurde ein unmodifizierter, monoklonaler Maus-Antikörper (Code M0851, Clone 1A4, Dako, Santa Clara, CA, USA) genutzt. Als Detektionssystem für den gebundenen primären Antikörper wurde das Vectastain ABC-AP Kit zusammen mit Vector Red Substrat (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet.

Das Substrat erzeugt in Anwesenheit von alkalischen Phosphatasen, die bei diesem Detektionssystem an den sekundären Antikörper gebunden sind, ein rotes Reaktionsprodukt. Aufgrund dieser Eigenschaft mussten vorher die endogenen Peroxidasen und alkalische Phosphatasen in den Präparaten inaktiviert werden, diese hätten sonst ebenfalls mit dem Substrat des Detektionssystems reagiert und so die späteren Ergebnisse verfälscht. Hierzu wurde BLOXAL Blocking Solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet. Zur Gegenfärbung kam Vector Hematoxylin Nuclear Counterstain zum Einsatz (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Im endgültigen Präparat, welches durch die Gegenfärbung insgesamt bläulich erschien, konnten die Blutgefäße so als deutlich rotgefärbte Strukturen abgegrenzt werden. Je nach Größe, Form und Anzahl konnten so z. B. Rückschlüsse auf die Gefäßproliferation gezogen werden.

Färbelösungen und -protokoll siehe Anhang (Kap. 9.2, S. 101).

4.12.5 Silbernitrat

Mit dieser Färbung ist es möglich Kalziumionen indirekt sichtbar zu machen, dadurch kann unter anderem die Entstehung von Hydroxylapatit z. B. in Osteozyten nachgewiesen werden. Die in der Silbernitratlösung enthaltenen Silberionen reagieren in Anwesenheit von Ameisensäure mit den Karbonat- und Phosphat-Ionen und verdrängen so die Kalziumionen. Die Silberionen werden anschließend zu metallischem, schwarzbraunem elementarem Silber reduziert. In diesem Fall wurde dazu Natriumthiosulfat genutzt. Da Licht ebenfalls zu einer Reduktion des Silbers führt und somit das Ergebnis nicht mehr objektivierbar gewesen wäre, wurde dieser Reaktionsschritt in einer Dunkelkammer durchgeführt.

Im angefärbten Präparat zeigte sich der Knochen am Ende bräunlich, die Osteozyten in ihren Knochenlakunen wurden durch das Silber schwarz dargestellt, zusätzlich wurde das kanalikuläre Netzwerk als fadenförmige Ausläufer angedeutet zwischen den Zellen sichtbar.

Färbelösungen und -protokoll siehe Anhang (Kap. 9.4, S. 105).

4.13 Fotomikroskopie

Für alle Aufnahmen zu dieser experimentellen Studie wurde das Fotomikroskop Leica DM5500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland), sowie die Digitalkamera Leica DCF 7000 T (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) unter Zuhilfenahme der Software Leica Application Suite X, 1.9.13747 (LAS X, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

Die jeweilige Aufnahmemethode unterscheidet sich im Hinblick auf die jeweils angewandte Färbung. Für die ASMA- und die Movat-Pentachrom-Färbung wurden Übersichtsbilder der gesamten Schraube mit dem umliegenden Gewebe in 5-facher Vergrößerung angefertigt. Die ALP- und TRAP-Präparate wurden jeweils in 20-facher Vergrößerung durchmustert und die auszuwertenden Stellen fotografiert. Bei der Silbernitratfärbung wurde eine 10-fache Vergrößerung auf die Präparate angewandt. Von besonderem Interesse waren die Gewebsanteile, welche der Schraube direkt angelegen haben und in das Gewinde hineinreichen.

4.14 Software

4.14.1 Bildbearbeitung

Zur Auswertung und Bearbeitung der am Mikroskop erstellten Aufnahmen wurde vorrangig das Programm ImageJ (Version: 2.0.0-rc-15/ 1.49m, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) zusammen mit den entsprechenden Plugins verwendet (siehe Kap. 5, S. 56).

Zusätzlich wurde zum Erstellen einzelner Abbildungen das Programm Adobe Photoshop CS 2 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA) herangezogen.

4.14.2 Statistik

Zur Dokumentation der erhobenen Daten, sowie der Berechnung der endgültigen Variablen, wurde das Programm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) angewandt.

Ausgehend von diesen Daten erfolgte die statistische Auswertung mit der Software SPSS (IBM SPSS Statistics 21, IBM, Armonk, NY, USA). Die verglichenen Parameter werden in den jeweiligen Unterpunkten in Kapitel 5 (S. 56) genauer beschrieben. Grundsätzlich ließ sich durch Erstellen einer deskriptiven Statistik zeigen, dass die Werte in so gut wie allen Fällen keiner Normalverteilung folgten. Davon abweichende Ausnahmen werden ebenfalls in Kapitel 5 beschrieben. Daraufhin erfolgte die weitere statistische Berechnung mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test, hierbei wurde das Signifikanzniveau auf $p = 0,05$ festgesetzt. Zur graphischen Darstellung wurden Balkendiagramme erstellt, welche die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern abbildeten (Fehlerbalken = ± 1 Standardfehler).

5 Ergebnisse

5.1 Mikro-CT-Bilder

Das Erstellen der Mikro-CT-Bilder, des noch in Technovit eingebetteten Knochenmaterials, diente primär zur Vorbereitung der Präparation. Es ließ sich aber auch vorab eine grobe Einschätzung des Zustandes der PLLA-Schrauben vornehmen. In den Schnittbildern und zum Teil auch in den erstellten 3D-Modellen ließen sich optisch Unterschiede im Auflösungsprozess der Schrauben zwischen den beiden Messpunkten von 6 Wochen (Abb. 14) und 52 Wochen (Abb. 15) ansatzweise erkennen. Diese äußerten sich subjektiv betrachtet vor allem durch eine Volumenverminderung des Schraubenmaterials bzw. einer Verkürzung der Schraube. Diese Veränderungen waren am deutlichsten bei den Präparaten zu sehen, die nach 52 Wochen Verweildauer untersucht wurden. Bei einer Einheilungszeit von 6 Wochen wurden hingegen kaum Veränderungen im Vergleich zum Ausgangszustand der Schraube beim Einbringen in den Knochen festgestellt.

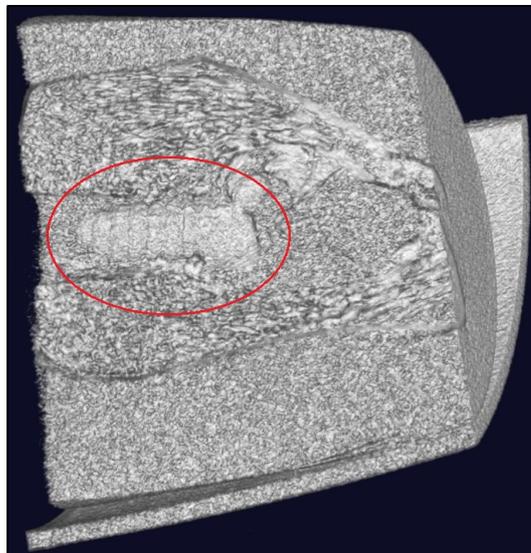


Abbildung 14: Mikro-CT-Aufnahme (6W); In dieser Aufnahme ist die Schraube innerhalb des Knochens (rote Markierung) sichtbar. Der Bohrkanal ist ebenfalls deutlich erkennbar. Soweit beurteilbar erscheint die Schraube in diesem Bild intakt und zeigt nur wenige Auflösungserscheinungen. In den Bereichen mit dem größten Umfang zeigt sie vollen Kontakt zum Knochenkanal.

Aber nicht nur zwischen den beiden Messpunkten zeigten sich Unterschiede in der Degradation des Materials, sondern auch in den einzelnen Messgruppen selbst. Bei den Präparaten, die nach 6 Wochen Einheilungszeit betrachtet wurden, waren diese Unterschiede marginal und somit zu vernachlässigen. In der zweiten Gruppe, mit einer Integrationszeit der Schrauben von 52 Wochen, variierten die Zustände des eingebrachten Materials allerdings deutlich. Manche der Schrauben zeigten kaum Unterschiede zu denen der kürzeren Einheilungszeit und waren fast vollständig erhalten geblieben (Abb. 15 b). Andere wiederum zeigten Auflösungszeichen in Form von Brüchen verschiedenster Ausprägung, sowie oben genannte Volumenminderung (Abb. 15 a).

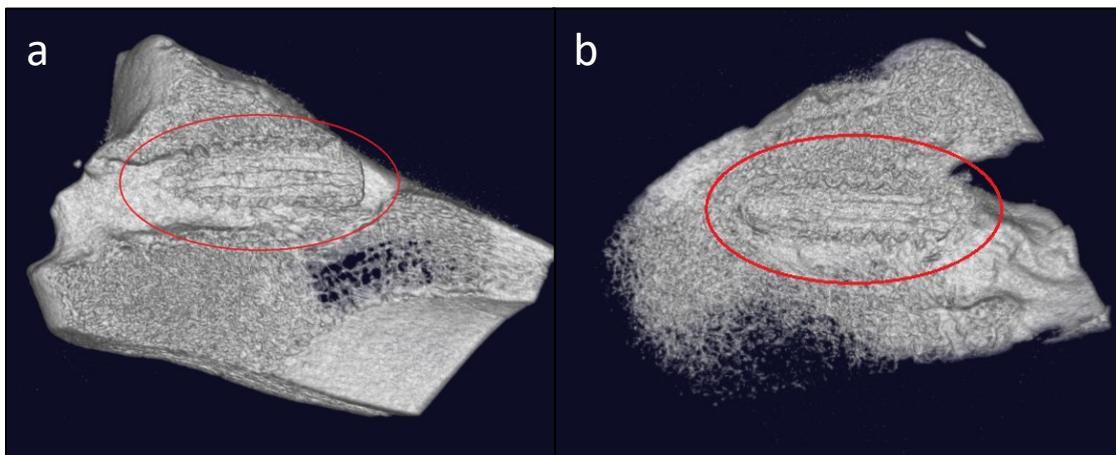


Abbildung 15: Mikro-CT-Aufnahmen (52W); Die Aufnahmen zweier unterschiedlicher Präparate zum 52-Wochen Zeitpunkt zeigen die Heterogenität der Knochenproben in einem seitlichen Schnitt. Die im Knochenkanal liegenden Schrauben (rote Markierung) sind deutlich erkennbar. Die Schraube in Bild a zeigt einen Versatz, der besonders am Kanal innerhalb der Schraube zu erkennen ist. Diese Stufenbildung kann auf einen Bruch der Schraube hindeuten. Die Schraube in Bildteil b zeigt sich hingegen intakt.

Die Übergänge zwischen den verschiedenen Zuständen der Schrauben waren hierbei fließend, Materialbrüche und Volumenabnahme kamen zusammen, aber auch getrennt, sowie in unterschiedlicher Ausprägung vor. Da keine weiteren objektiven Analysen der Bilder, wie zum Beispiel Längenmessungen oder Dichtebestimmungen, durchgeführt wurden, konnten keine endgültigen Aussagen über den Auflösungsprozess gemacht werden. Die ersten subjektiven Einschätzungen anhand der CT-Bilder zu den Schraubenzuständen bestätigten sich größtenteils beim späteren Zuschneiden der Präparate.

5.2 Movat-Pentachrom-Färbung

Mit der Movat-Pentachrom-Färbung sollten die verschiedenen Gewebeelemente in den Präparatschnitten dargestellt werden, welche sich während des Einheilungsprozesses des Fremdmaterials in dessen unmittelbarer Nähe zeigten. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das mineralisierte und nichtmineralisierte Knochengewebe gelegt. Das restliche Gewebe, welches sich nicht in diese beiden Gruppen einteilen ließ, wurde zusätzlich als dritte Kategorie „fibrokartilaginös“ definiert. Es wurde jeweils ein Schnitt pro Schraube angefärbt.

Mit dem Lichtmikroskop wurde von jedem Präparat ein Übersichtsbild in 5-facher Vergrößerung erstellt. Diese Auflösung gewährleistete den besten Kompromiss zwischen Übersicht über das Präparat und Differenzierbarkeit der Gewebearten. In den Aufnahmen der Proben, die nach 6 Wochen gewonnen wurden, ist die Schraube nur als Umriss zu erkennen, nach 52 Wochen Einheilungszeit hingegen werden Teile der Schraube in der Färbung mit dargestellt (Abb. 16 b).

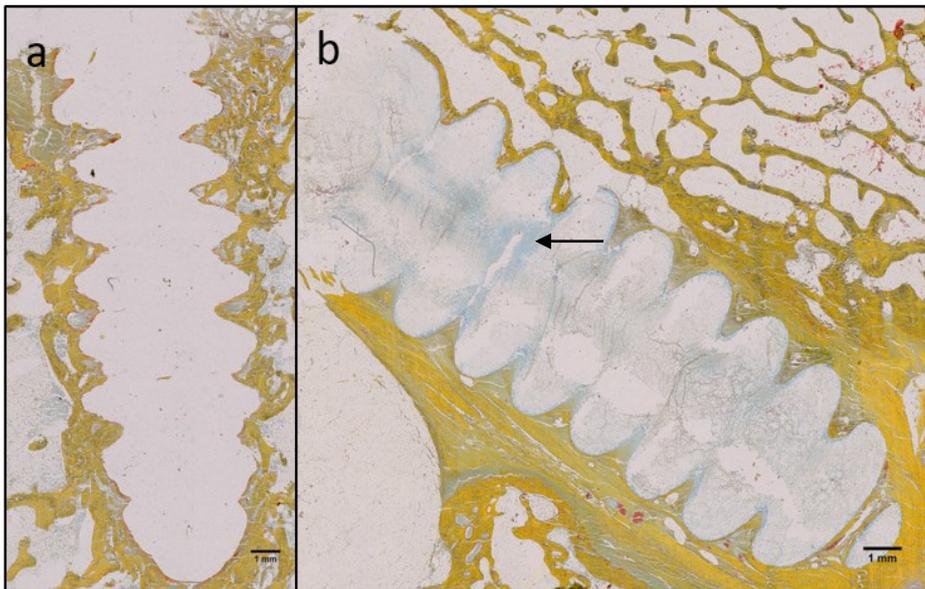


Abbildung 16: Übersichtsaufnahmen der Movat-Pentachromfärbung in 5-facher Vergrößerung; Die Schraube der 6W-Probe (a) ist allein anhand ihres Umrisses zu erkennen, der Innenraum ist nicht angefärbt. Die Probe der Gruppe 52W (b) zeigt hingegen eine bläulich-grüne Anfärbung innerhalb der Schraubenfläche (Pfeil).

Dies spricht für die fortschreitende Degradation des Materials, da hier Gewebe angefärbt wurde, welches das zuvor bestehende Schraubenmaterial ersetzt hat. Für die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von ImageJ in diesen Bildern eine „Region of interest“ (im folgenden ROI) definiert. Diese ROI schloss ein 250 Pixel breites Band um die jeweilige Schraube ausgehend von deren Rand ein. Auf die Vergrößerung des Mikroskops umgerechnet ergab sich so ein Band von ca. 3246 μm Breite. Ebenfalls wurden der Flächeninhalt der ROIs und der Flächeninhalt der Schrauben für jedes Präparat ermittelt. Das Gewebe außerhalb dieser ROI sowie das Schraubenmaterial wurden als Hintergrund definiert und weiß überfärbt, um die folgenden Schritte der Auswertung nicht zu verfälschen (Abb. 17).

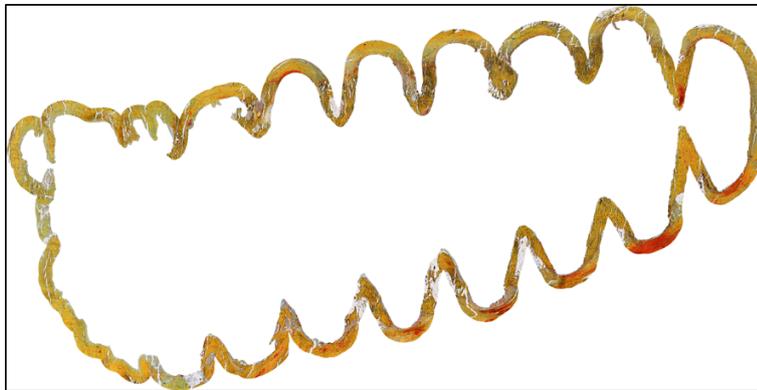


Abbildung 17: „Region of interest“ (ROI); Zuschnitt für die Auswertung der Movat-Pentachrom-Färbung

Mit dem ImageJ Tool-Plugin „Trainable Weka Segmentation“ konnten nun die vorher definierten Kategorien einem bildmorphologischen Korrelat zugeordnet werden. Hierzu wurde manuell ein sogenannter „Classifier“ definiert, der den vorher festgelegten Klassen eine bestimmte Bildfarbe zuwies (Abb. 18). Es wurden 4 Klassen unterschieden:

- 1) dunkelgelb angefärbte mineralisierte Knochenmatrix
- 2) rotes nichtmineralisiertes Osteoid
- 3) hellblau-hellgelbes fibrocartilaginöses Gewebe
- 4) weißer Hintergrund und Schraubenmaterial.

Da sich manche der Präparate in ihrer Intensität der Färbung unterscheiden, musste für diese ein zweiter „Classifier“ definiert werden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewähren.

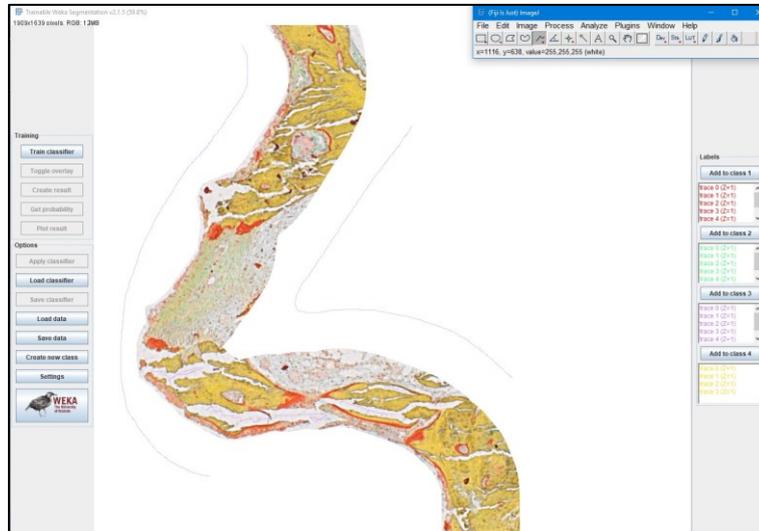


Abbildung 18: Erstellen des „Classifiers“; Mit bis zu 20 Freihandlinien wurden im ImageJ-Tool „Trainable Weka Segmentation“ die vier verschiedenen Klassen definiert; rot = Osteoid, grün = fibrocartilaginöses Gewebe, gelb = mineralisierter Knochen, violett = Hintergrund

Mit diesen „Classifiern“ und dem ImageJ Tool-Plugin „Trainable Weka Segmentation“ wurden jetzt alle Bilder der Präparate in vierfarbige Bilder umgewandelt (Abb. 19).

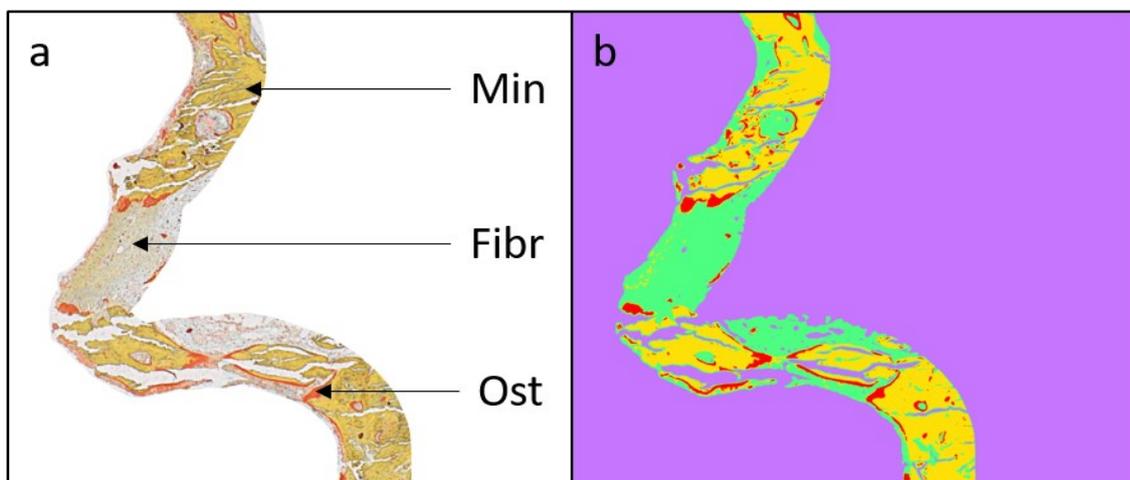


Abbildung 19: Segmentausschnitt der ROI vor und nach der Klassifizierung; Mit Hilfe des „Classifiers“ werden die vorher heterogen angefärbten Gewebeabschnitte in ein vierfarbiges Bild umgewandelt; Min = mineralisierte Knochenmatrix, Fibr = fibrocartilaginöses Gewebe, Ost = Osteoid.

Für jedes dieser vierfarbigen Bilder konnte nun der prozentuale Anteil der vorher definierten Klassen am Gesamtbild ermittelt werden. Da die einzelnen Übersichtsbilder zu hohe Rechenleistung erforderten, mussten diese vorher in Bildreihen von 20-25 Einzelbilder zerlegt werden. Deren Ergebnisse konnten im Folgenden wieder zusammengeführt werden, um ein Gesamtergebnis pro Übersichtsbild zu erhalten.

Alle Bildanteile, die sich dabei als Hintergrund darstellten, wurden in der weiteren Auswertung außen vorgelassen. Für die Auswertung ergaben sich damit prozentuale Werte für die zuvor definierten Gewebeklassen bezogen auf die ROI. Bei vorher korrekt eingestellter Skalierung konnte über ImageJ die Gesamtbildfläche bestimmt werden, zusammen mit den prozentualen Werten der Gewebeklassen ließ sich nun deren Fläche in μm^2 ermitteln. Für die statistische Vergleichbarkeit wurden diese Werte auf die Fläche der ROI und zusätzlich in Bezug zur Schraubenfläche normalisiert, da die Schraubenfläche von der Schnittebene abhängt und bei den Präparaten unterschiedlich sein kann.

Nach der oben genannten Auswertungsmethode wurden sukzessive die Ergebnisse berechnet und verglichen. Für die verschiedenen Gewebearten in Bezug zur ROI konnte gezeigt werden, dass das nicht-mineralisierte und das fibrocartilaginöse Material vom Zeitpunkt 6W hin zum Zeitpunkt 52W abgenommen hatte, während der mineralisierte Knochen an Masse gewann (Abb. 20 a): Das nicht-mineralisierte Gewebe verringerte sich im Durchschnitt von 6,54 % nach 6 Wochen auf 2,24 % nach 52 Wochen und der fibrocartilaginöse Anteil sank durchschnittlich von 28,27 % auf 24,33 %. Die Werte für das mineralisierte Knochenmaterial stiegen vom Zeitpunkt 6W von 34,65 % hin zu 45,76 % zum Zeitpunkt 52W. Allerdings zeigte keine dieser Veränderungen eine statistische Signifikanz von $p < 0.05$ (Tab. 6).

Tabelle 6: Statistische Ergebnisse der Movat-Pentachrom-Färbung der Gewebeklassen normalisiert auf die ROI; Angaben in [%]

Gewebefläche	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Nicht-Mineralisiert	6,54 %	2,24 %	$p = 0,193$
Fibrocartilaginös	28,27 %	24,33 %	$p = 0,862$
Mineralisiert	34,65 %	45,76 %	$p = 0,345$

Tabelle 7: Statistische Ergebnisse der Movat-Pentachrom-Färbung der Gewebeklassen normalisiert auf die Schraubenfläche; Angaben in [%]

Gewebe­fläche	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Nicht-Mineralisiert	1,17 %	0,52 %	p = 0,193
Fibrokartilaginös	5,37 %	5,55 %	p = 0,808
Mineralisiert	6,56 %	10,70 %	p = 0,058

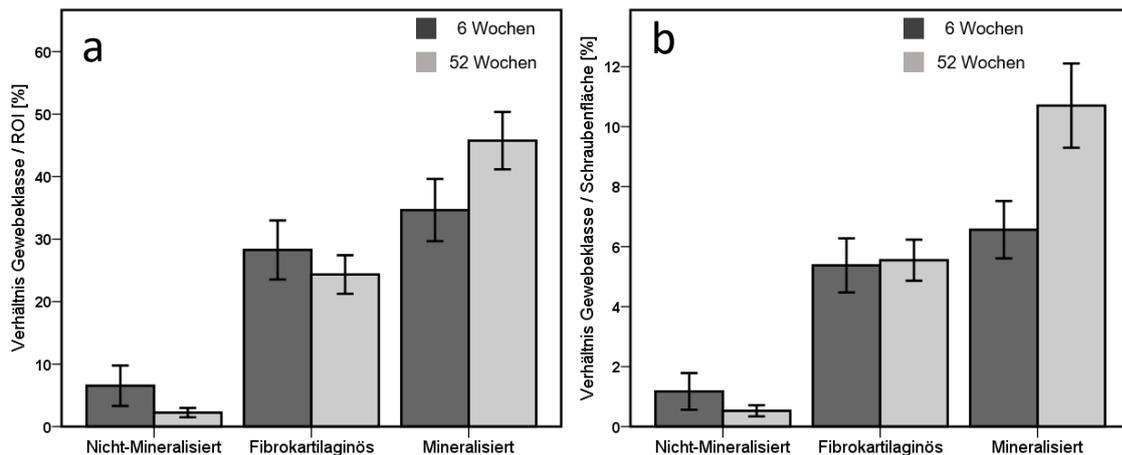


Abbildung 20: Quantitative Auswertung der Movat-Pentachrom-Färbung; a) Verhältnis der Gewebeklassen normalisiert auf die ROI [%]; b) Verhältnis der Gewebeklassen normalisiert auf die Fläche der Schraube [%]. n = 21

Die zweite Auswertung mit Normalisierung der Daten auf die ermittelte Fläche der Schraube ergab für das nicht-mineralisierte und das mineralisierte Gewebe ein ähnliches Bild wie die erste, auf die ROI normalisierte Auswertung (Abb. 20 b). Das fibrokartilaginöse Gewebe hingegen war, hier bezogen auf die Schraube, im Gegensatz zum Bezug auf die ROI oben, etwas angestiegen. Die durchschnittlichen Verhältnisse stellten sich nach Berechnung wie folgt dar: nicht-mineralisiert: 6W = 1,17 %, 52W = 0,52 %; fibrokartilaginös: 6W = 5,37 %, 52W = 5,55 %; mineralisiert: 6W = 6,56 %, 52W = 10,70 %. Der Unterschied des mineralisierten Knochengewebes verglichen zwischen den zwei Zeitpunkten zeigte zwar keine statistische Signifikanz (p = 0,058), ließ aber einen Trend hin zur fortschreitenden Mineralisierung erkennen (Tab. 7).

5.3 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase findet sich unter anderem in den Osteoklasten des Knochens. Zwar ist ihre Funktion in den Osteoklasten noch nicht hinreichend geklärt, nichtsdestotrotz wird ihre Aktivität in diesen Zellen genutzt, um wie in diesem Beispiel das Vorkommen von Osteoklasten nachzuweisen. Das Auftreten von Osteoklasten, sowie ihre Quantifizierung lassen Rückschlüsse auf den stattfindenden Gewebsumbau zu. Nach Ablauf der enzymatischen Prozesse stellten sich die TRAP-gefärbten Zellen deutlich rot dar (Abb. 21). Wie bei der Movat-Pentachrom-Färbung wurde ein Schnitt jeder Probe mittels dieser Färbetechnik behandelt und anschließend analysiert.

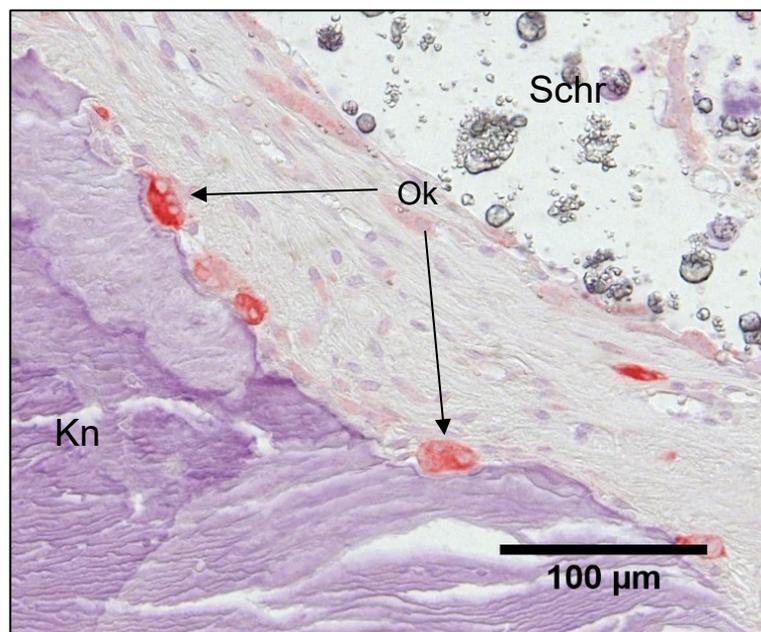


Abbildung 21: Darstellung der Osteoklasten; Die Osteoklasten (Ok) sind als mehrkernige, rote Zellen in den Lakunen im Knochen (Kn) zu erkennen. Schr = Schraubenmaterial

Jeder der angefärbten Schnitte ist am Lichtmikroskop sorgfältig untersucht worden. Die zu beobachtende Region befand sich dabei im direkten Umfeld der Operationsstelle. Eine genaue ROI, wie sie bei der Movat-Pentachrom-Färbung verwendet wurde, konnte hierfür nicht erstellt werden, da die nötige Vergrößerung es nicht zuließ, entsprechende Übersichtsaufnahmen zu erzeugen. Wenn sich im Präparat eine deutliche Farbreaktion zeigte, wurde eine Fotografie in 20-facher Vergrößerung dieses Bereiches erstellt. Die verschiedenen Bilder eines Präparates wurden anschließend am PC mithilfe von ImageJ analysiert. Als Osteoklast gewertet wurden nur jene angefärbten Zellen, auf die folgende Eigenschaften zutrafen:

- 1) klare TRAP-positive Farbreaktion
- 2) mehrere Zellkerne sichtbar
- 3) in einer Lakune dem Knochengewebe anliegend.

Anhand dieser Kriterien wurden die Bilder durchmustert und manuell die Osteoklastenzahl durch Zählung bestimmt. Zusätzlich zur Gesamtzellzahl sollten noch die Länge der Osteoklasten eines Schnittes bestimmt werden, um auch eine Aussage über deren Zellaktivität treffen zu können. Dazu wurde in ImageJ mittels des Zeichentools eine Linie entlang der Knochenauflagefläche jedes gewerteten Osteoklasten gezogen. Mithilfe der entsprechenden Skalierungseinstellung in ImageJ konnte diese Bildstrecke in μm umgerechnet werden und man erhielt die Einzellänge eines Osteoklasten (Abb. 22). Aus der Summe der Einzelstrecken dividiert durch die Osteoklastenzahl erhielt man zusätzlich die mittlere Länge der Osteoklasten eines Präparates:

$$\text{mittl. Osteoklastenlänge} = \frac{\sum \text{Einzelstrecken}}{\text{Osteoklastenzahl}}$$

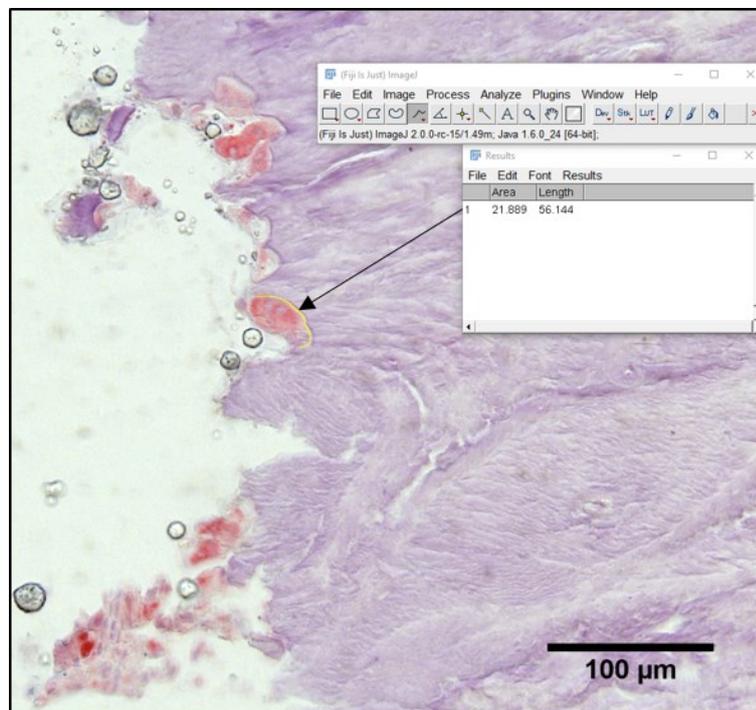


Abbildung 22: Bestimmung der Osteoklastenlänge und –anzahl; Mittles der Zeichenfunktion (gelbe Linie) und der korrekt eingestellten Skalierung in ImageJ konnte die Osteoklastenlänge ermittelt werden. Im Bild wird dies exemplarisch für einen Osteoklasten gezeigt, der alle Auswertungskriterien erfüllt.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte wurden diese auf die beobachtete Trabekelfläche normalisiert. Hierzu wurden die Bilder in ImageJ geladen und durch das Umwandeln in eine binäre Schwarz-Weiß-Version konnte das Knochengewebe vom Hintergrund und anderem Gewebe getrennt werden. Manche Bildbereiche ohne Knochen mussten dafür per Hand überfärbt werden. Anhand der Bildfläche und der ermittelten prozentualen Trabekelfläche wurde die Trabekelfläche in μm^2 berechnet. Die Summe der einzelnen Knochenflächen ergab die Gesamtknochenfläche pro Präparat:

$$\text{Gesamttrabekelfläche} = \sum \text{Bildfläche} \cdot \text{Trabekelfläche}$$

Da die Längen der Osteoklasten allerdings nur eindimensional vermessen, jedoch auf eine zweidimensionale Fläche normalisiert wurden, sollte als zweite Bezugsgröße noch die Trabekellänge berechnet werden, um einen besseren Vergleich zu gewährleisten. Sie wurde ermittelt, indem in jedem Einzelbild mit gewerteten Osteoklasten die sichtbaren Ränder des Knochengewebes ausgemessen und zusammenaddiert wurden. Die Summe der Trabekellängen aller Einzelbilder ergab schließlich die Gesamttrabekellänge. Dies geschah analog zur Messmethode der Osteoklasten mittels ImageJ. Auf diese Weise konnte für jedes Präparat die Trabekellänge bestimmt werden.

Zuerst wurden die reinen Osteoklastenzahlen in Bezug zur beobachteten Trabekelfläche bzw. Schraubenfläche untersucht. Mit durchschnittlich 11,75 Zellen/ mm^2 zum Zeitpunkt 6W und 11,87 Zellen/ mm^2 im Mittel zum Zeitpunkt 52W konnten für die Trabekelfläche keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Die Werte im Bezug zur Schraube fielen dahingehend anders aus, dass die Anzahl mit 0,19 Zellen/ mm^2 nach 52 Wochen in diesem Fall geringer ausfiel als mit 0,28 Zellen/ mm^2 nach 6 Wochen, aber auch hier zeigte sich keine statistische Signifikanz, sondern lediglich ein Trend hin zu einer sinkenden Zellanzahl. Bei Betrachtung der Osteoklastenzahl pro Trabekellänge zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Zwar war mit 1,60 Zellen/mm am frühen Messpunkt und 1,49 Zellen/mm zum späteren Messpunkt eine geringe Differenz zu verzeichnen, diese war jedoch mit $p=0,754$ nicht statistisch signifikant (Abb. 23 und Tab. 8).

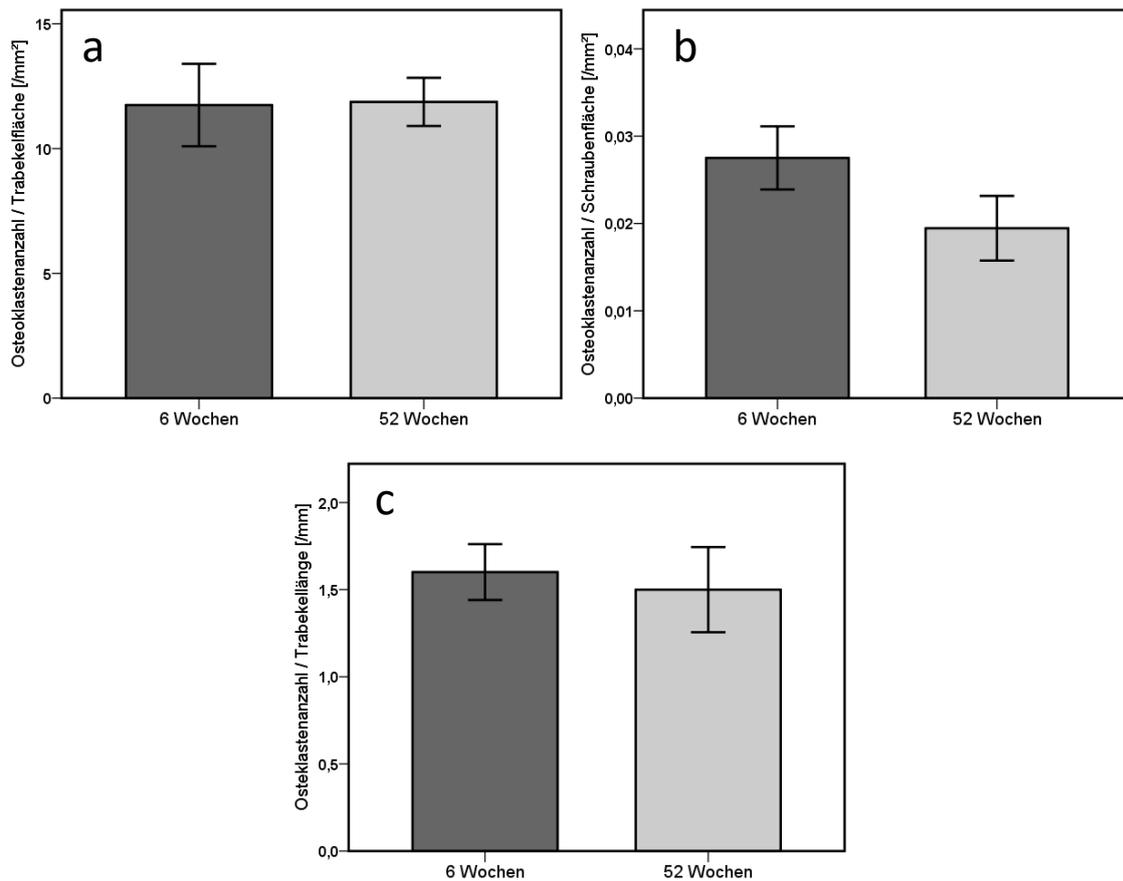


Abbildung 23: Quantitative Auswertung der Osteoklastenanzahl; Osteoklastenanzahl a) pro Trabekelfläche [mm²], b) pro Schraubenfläche [mm²], c) pro Trabekellänge [mm]; n = 21

Tabelle 8: Ergebnisse der Osteoklastenanzahlen zu den Bezugsvariablen; Angaben für Schrauben und Trabekelfläche in [Zellen/mm²], für Trabekellänge in [Zellen/mm]

Osteoklastenanzahl	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Pro Trabekelfläche	11,75	11,87	p = 0,917
Pro Schraubenfläche	0,28	0,19	p = 0,069
Pro Trabekellänge	1,60	1,49	p = 0,754

Auch die mittlere Länge der Osteoklasten unterschied sich nicht signifikant. Zum Zeitpunkt 6W betrug sie 25,24 µm, zum Zeitpunkt 52W wurden im Schnitt 23,95 µm gemessen (Abb. 24 und Tab. 9).

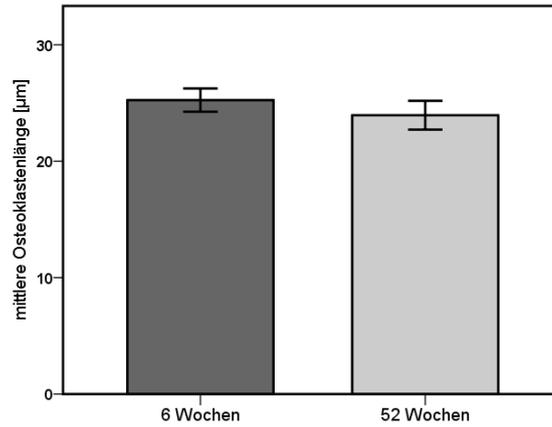


Abbildung 24: Vergleich der mittleren Osteoklastenlänge; Angaben in [µm], n = 21

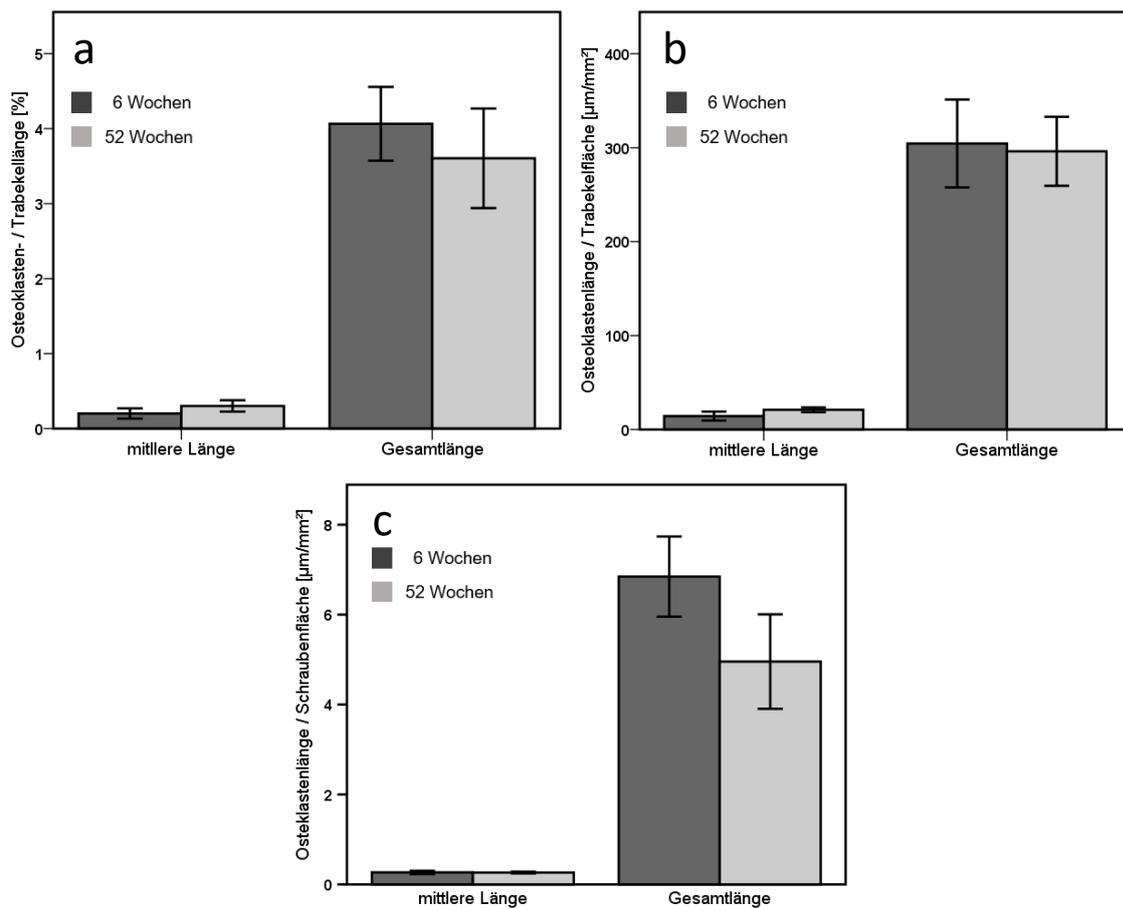


Abbildung 25: Quantitative Auswertung der Osteoklastenlängen; Gesamtlänge und mittlere Länge im Verhältnis zur a) Trabekellänge [%], b) Trabekelfläche [µm²/mm²], c) Schraubenfläche [µm²/mm²]; n = 21

Tabelle 9: Mittlere Osteoklastenlänge; Angabe in [μm]

	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Mittlere Osteoklastenlänge	25,24	23,95	p = 0,422

Im weiteren Verlauf wurden die Längenverhältnisse der Osteoklasten zu Trabekellänge und Trabekelfläche ermittelt. So zeigten die Verhältnisse der gesamten Osteoklastenlänge zur Trabekellänge Werte von durchschnittlich 4,06 % nach 6 Wochen und 3,60 % nach 52 Wochen. Das Verhältnis der mittleren Osteoklastenlänge zur Trabekellänge folgte einer entgegengesetzten Tendenz und war mit 0,30 % zum Zeitpunkt 52W im Gegensatz zu 0,20 % zum Zeitpunkt 6W 1,5-fach höher (Abb. 25 a und Tab. 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der Osteoklastenlängen normalisiert auf die Trabekellänge; Angaben in [%]

Osteoklastenlänge	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Mittlere Länge	0,20	0,30	p = 0,148
Gesamtlänge	4,06	3,60	p = 0,382

Die Ergebnisse für die Osteoklastenlänge im Bezug zur Trabekelfläche fielen analog dazu aus (Abb. 25 b und Tab. 11). Auch hier fiel die Gesamtlänge zum 6-Wochen-Messpunkt mit $304,50 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ höher aus als zum Messpunkt nach 52 Wochen mit $296,18 \mu\text{m}/\text{mm}^2$, die mittlere Länge war zum zweiten Zeitpunkt allerdings ebenfalls um das 1,5-fache größer (6W = $14,31 \mu\text{m}/\text{mm}^2$; 52W = $21,02 \mu\text{m}/\text{mm}^2$).

Tabelle 11: Ergebnisse der Osteoklastenlängen normalisiert auf die Trabekelfläche; Angaben in [$\mu\text{m}/\text{mm}^2$]

Osteoklastenlänge	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Mittlere Länge	14,31	21,02	p = 0,058
Gesamtlänge	304,50	296,18	p = 0,651

Die Normalisierung der Längenwerte auf die Schraubenfläche erbrachte bei Betrachtung der Gesamtlänge ebenfalls keine zusätzlichen Erkenntnisse (6W = $6,85 \mu\text{m}/\text{mm}^2$; 52W = $4,96 \mu\text{m}/\text{mm}^2$). Die Werte für die mittlere Länge hingegen näherten sich weiter an und waren mit $0,267 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ nach 6 Wochen und $0,264 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ nach 52 Wochen nahezu identisch (Abb. 25 c und Tab. 12).

Tabelle 12: Ergebnisse der Osteoklastenlängen normalisiert auf die Schraubenfläche; Angaben in $[\mu\text{m}/\text{mm}^2]$

Osteoklastenlänge	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Mittlere Länge	0,267	0,264	$p = 0,702$
Gesamtlänge	6,85	4,96	$p = 0,095$

Allein das Verhältnis von mittlerer Länge zur beobachteten Trabekelfläche zeigte eine zunehmende Tendenz mit $p = 0,058$ (detaillierte Ansicht in Abb. 26 b). Alle anderen Unterschiede in den Ergebnissen hingegen blieben statistisch nicht unterscheidbar.

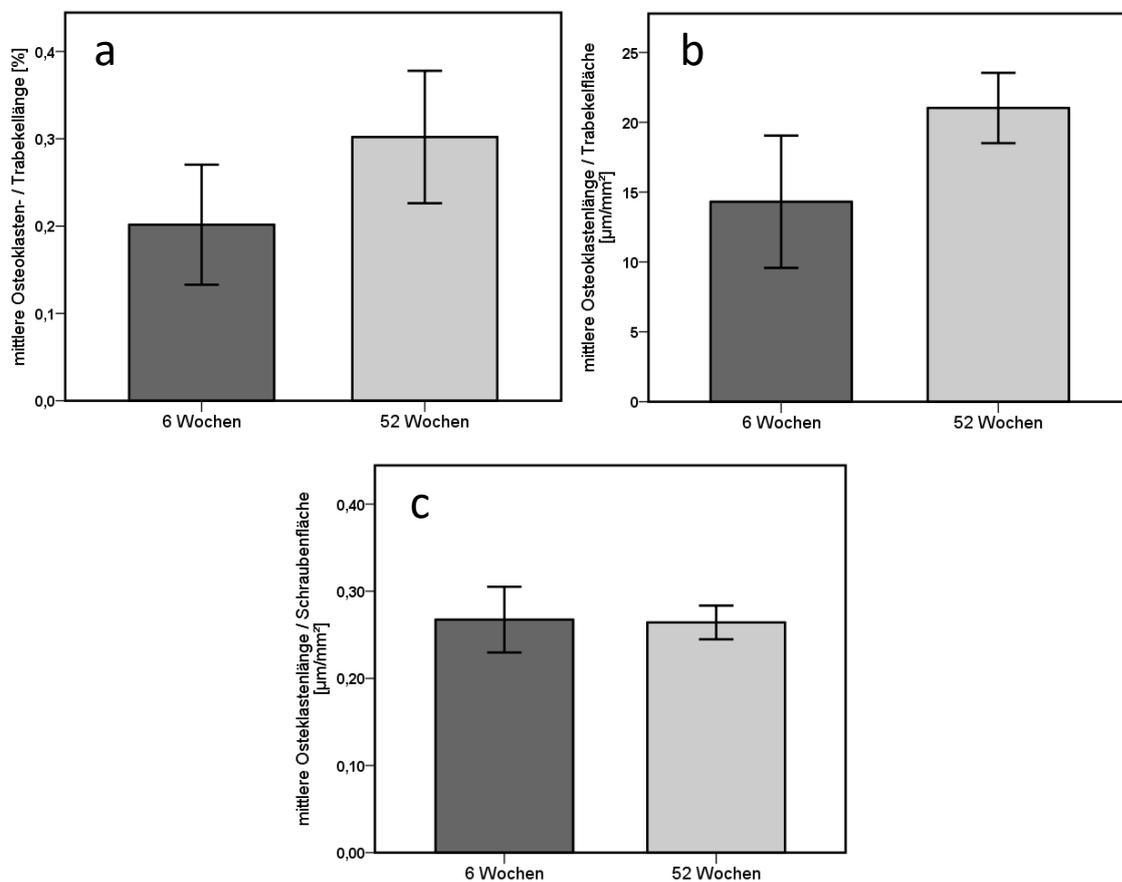


Abbildung 26: Darstellung der mittleren Osteoklastenlänge (siehe auch Abbildung 25); mittlere Länge im Verhältnis zur a) Trabekellänge [%], b) Trabekelfläche $[\mu\text{m}/\text{mm}^2]$, c) Schraubenfläche $[\mu\text{m}/\text{mm}^2]$; $n = 21$

Um diese vorliegenden Ergebnisse endgültig zu bestätigen, wurden die zuvor ermittelten Werte der Osteoklastenlängen pro Trabekelfläche oder pro Trabekellänge zusätzlich auf die Schraubenfläche normalisiert (Daten nicht dargestellt). Dabei zeigten sich für die beiden Werte der Gesamtlängen und den Wert der mittleren Länge pro Trabekellänge keine Veränderungen im Signifikanzniveau.

5.4 Alkalische Phosphatase (ALP) Färbung

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) dient als Marker für ausdifferenzierte Osteoblasten. Diese Methode ermöglicht somit deren Quantifizierung innerhalb des untersuchten Knochengewebes. Ebenso wie die Osteoklasten, liefern auch die Osteoblasten einen Hinweis auf die ablaufenden Umbau- und Aufbauprozesse innerhalb des Knochengewebes. Die ALP stellt sich bei dieser Färbemethode dunkellila dar, das restliche Gewebe zeigt sich rosafarben. Von jedem Tier wurde die ALP in einem Schnitt des femoralen und tibialen Anteil des Kniegelenkes angefärbt.

Die Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop vollständig durchmustert. Von besonderem Interesse waren dabei die unmittelbaren Gewebebereiche um das Schraubenmaterial. Wie auch bei der Färbung der Osteoklasten war es bei der ALP Färbung aufgrund der Vergrößerung nicht möglich, die genau definierte ROI um die Schraube zu erfassen. An den Stellen, an denen sich die ALP durch ihre dunkellila Färbung zeigte, wurde jeweils ein Bild in 20-facher Vergrößerung gemacht. In drei der einundzwanzig Präparate war im beobachteten Bereich keine Reaktion der ALP zu erkennen. Diese wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen. Für die Färbung der ALP reduzierte sich das Kollektiv folglich auf $n = 18$.

Die weitere Auswertung erfolgte mithilfe des Programms ImageJ. Der erste Teil verlief dabei ähnlich zur Färbung nach Movat: Zuerst erfolgte das Zuschneiden der entsprechenden Bilder. Dazu wurden alle Bereiche, die keine ALP enthielten, entfernt und als Hintergrund deklariert. Dann wurde mit dem ImageJ Tool „Trainable Weka Segmentation“ ein „Classifier“ erstellt. In diesem Fall wurden zwei Klassen erstellt:

- 1) ALP und
- 2) Restgewebe mit Hintergrund.

In allen zugeschnittenen Bildern wurde jetzt der prozentuale Anteil der ALP am Gesamtbild bestimmt. Als nächstes wurde dann die Skalierung mittels eines vergrößerungsspezifischen Faktors korrigiert und die Gesamtbildfläche in μm^2 bestimmt. Durch das Multiplizieren des prozentualen Wertes der ALP mit dieser Gesamtfläche erhielt man den Wert für die ALP im Bild in μm^2 .

Die Summe aller Einzelbilder ergab letztlich die gesamte ALP-positive Fläche für ein Präparat:

$$\text{Gesamt ALP} = \sum \text{Bildfläche} \cdot \text{ALP in Prozent}$$

Diese Werte allein reichten aber noch nicht aus, da aufgrund der fehlenden ROIs auch die Bezugsgröße fehlte. Als solche Bezugsgröße wurde die beobachtete Knochenfläche herangezogen. Um diese Bezugsgröße zu erhalten, wurden die Bilder mit ImageJ in eine binäre Bildversionen umgewandelt. Bildanteile, die definitiv kein Knochengewebe zeigten, wurden dazu weiß überfärbt, so ließ sich die Knochenmatrix vom Hintergrund und dem restlichen Gewebe unterscheiden. Durch Auswerten dieser binären Bildversionen erhielt man den prozentualen Bildanteil für das Knochengewebe, allerdings schloss er die ALP-Anteile mit ein. Auch dieser Wert wurde mit der Gesamtbildfläche multipliziert, um ein Ergebnis in μm^2 zu erhalten. Anschließend sind alle Einzelwerte eines Präparates zu einem Gesamtwert für „Knochen + ALP“ zusammengefügt worden. Durch Subtrahieren des ALP-Wertes konnte jetzt die reine Knochenfläche ermittelt werden:

$$\text{Knochenfläche} = \left(\sum \text{Bildfläche} \cdot \text{Knochenanteil} \right) - \text{Gesamt ALP}$$

Anhand dieser Werte wurde das Verhältnis von ALP zur beobachteten Knochenfläche berechnet. Darüber hinaus wurde noch das Verhältnis von ALP zur Schraubenfläche in die Ergebnisauswertung mit einbezogen.

Die Osteoblasten in den untersuchten Präparaten stellten sich vor allem in zwei unterschiedlichen Organisationsformen dar. Zum einen zeigten sich abgeschlossene ovale bis runde Strukturen, denen sich die Zellen innen anlagerten (Abb. 27 b), des Weiteren zeigten sich lineare Abschnitte mit ALP-Färbung an den Außenseiten der Knochenbälkchen und teilweise auch an den Übergangflächen zum Schraubenmaterial oder bindegewebigen Strukturen (Abb. 27 a). Für die Auswertung wurden beide Organisationsformen beachtet, solange diese sich in dem definierten Areal um die Schraube herum befanden.

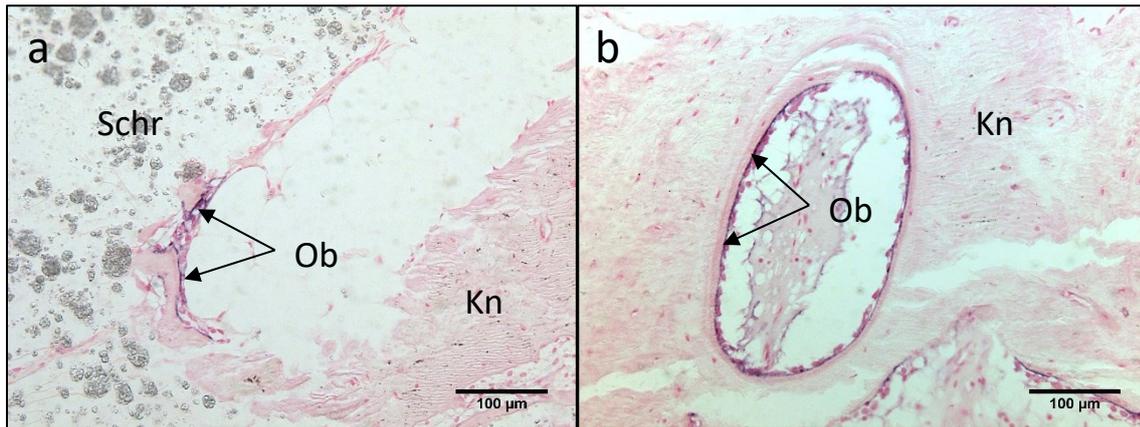


Abbildung 27: ALP-Färbung der Osteoblasten; a) Lineare Anlagerung der ALP-positiven Osteoblasten auf der Knochenoberfläche im Bereich der Schraubengrenzfläche. b) Organisation der Osteoblasten in einer ovalen Knochenhöhle. Ob = Osteoblast; Kn = Knochen; Schr = Schraubenmaterial.

Das Verhältnis der ALP-positiven Fläche (ALP+) zur beobachteten Knochenfläche betrug in den Präparaten des Zeitpunktes 6W im Mittel 0,53 %, am zweiten Messpunkt nach 52 Wochen konnte nur 0,39 % ALP-positive Fläche nachgewiesen werden (Abb. 28).

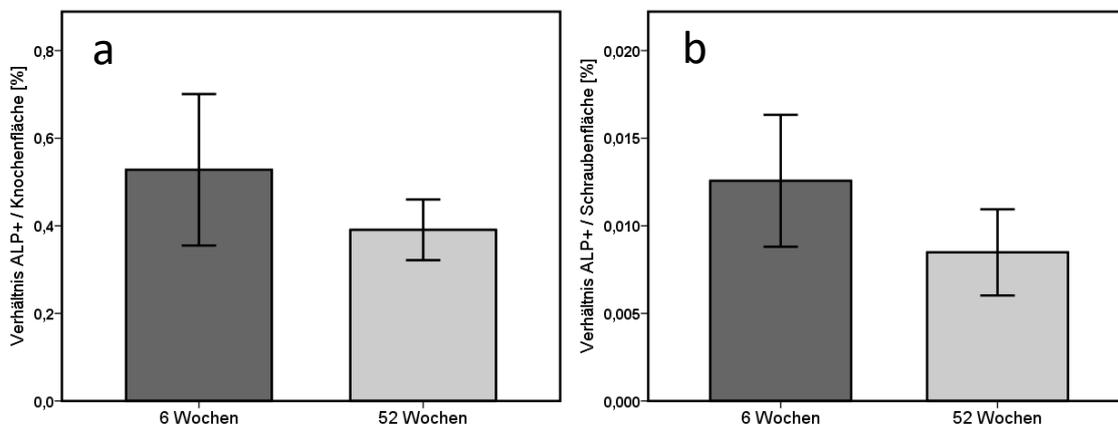


Abbildung 28: Quantitative Auswertung der ALP-Färbung; Verhältnisse der ALP-positiven Fläche pro Knochenfläche [%] (a) und der ALP-positiven Fläche pro Schraubenfläche; n=18

In der genaueren statistischen Auswertung zeigte sich kein signifikanter Unterschied dieser Mittelwerte. Eine analoge Entwicklung zeigten die Ergebnisse bei Normalisierung der ALP-positiven Anteile auf die Schraubenfläche. Auch hier wies die angefärbte ALP-Fläche nach 6 Wochen einen nicht-signifikant höheren Wert auf als nach insgesamt 52 Wochen Einheilungszeit des Fremdmaterials (6W = 0,0126 %; 52W = 0,0085 %, p = 0,494).

Tabelle 13: Verhältnis der ALP-positiven Fläche (ALP+) zur Bezugsfläche; Angaben in [%]

ALP+	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
pro Knochenfläche	0,53	0,39	p = 0,616
pro Schraubenfläche	0,0126	0,0085	p = 0,494

Insgesamt zeigte sich innerhalb der Versuchsgruppe und auch innerhalb des jeweiligen Zeitpunktes eine starke Heterogenität der ALP-Anfärbung. Dies ist unter anderem ein Grund für die recht hohen Standardabweichungen, die sich bei der statistischen Auswertung ergaben. So wurden in manchen Präparaten viele oder große Anteile ALP-positiv markiert, während sich in anderen Präparaten nur dezente Färbungen nachweisen ließen. Auch innerhalb der Präparate selbst traten stark angefärbte Stellen gleichzeitig mit weniger deutlichen gekennzeichneten Arealen auf. Drei der einundzwanzig untersuchten Präparate zeigten indes überhaupt keine ALP-positiven Anteile. Diese drei Präparate stammten alle aus der Versuchsgruppe zum Zeitpunkt 6W und verkleinerten so deren Stichprobenzahl auf sechs.

5.5 α -Smooth-Muscle-Actin (ASMA) Färbung

Das Ziel der immunhistochemischen Färbung mit ASMA war es, die Angiogenese (Gefäßneubildung) während des Einheilungsprozesses der Schrauben zu visualisieren. Eine hohe Anzahl an Gefäßen spricht für aktive, zelluläre Prozesse innerhalb des Gewebes. Darum ist es nicht nur wichtig die Anzahl, sondern auch die Morphologie der Gefäße zu untersuchen. Größe und Form der Gefäße geben Aufschluss darüber, ob sich das Gewebe eher in der akuten, entzündlichen Heilungsphase befindet, abgeheilt ist, oder eventuell ein chronisch-entzündlicher Prozess abläuft. Glatte Muskulatur, wie sie in den Blutgefäßen zu finden ist, stellt sich bei dieser Färbemethode dunkelrot dar. Für jede der Proben wurde ein Schnittpräparat angefertigt und entsprechend gefärbt (Abb. 29 a).

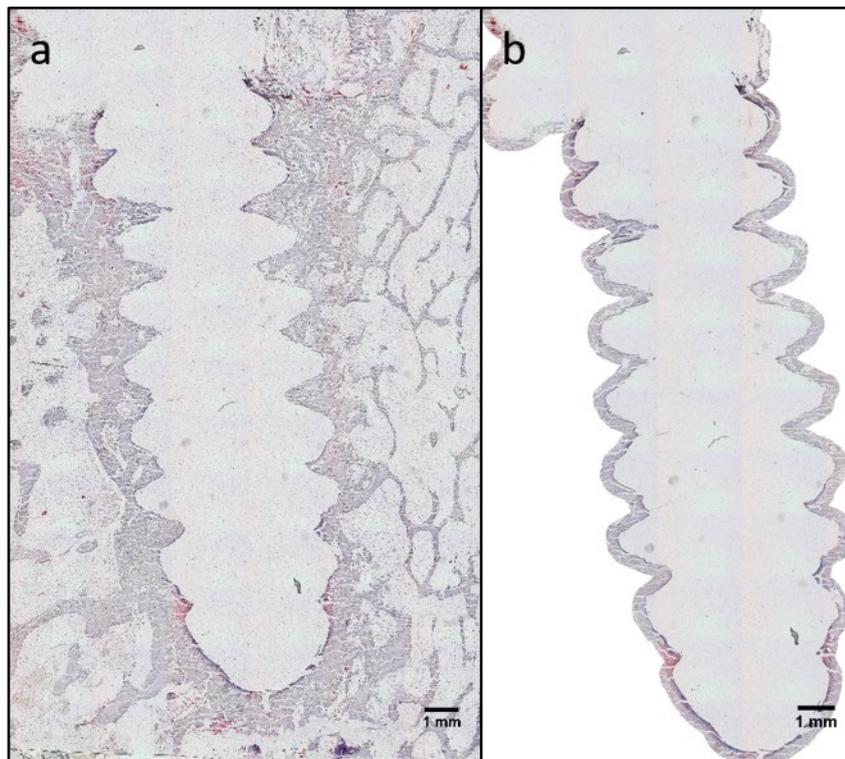


Abbildung 29: Aufnahmen der ASMA-Färbung; a) Übersichtsaufnahme in 5-facher Vergrößerung, b) Für die Auswertung zugeschnittene ROI

Wie schon bei der Färbemethode nach Movat wurden nach dem Färben lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen der Präparate bei 5-facher Vergrößerung angefertigt. Ebenso wurde die ROIs entsprechend den Auswertungsschritten der Färbung nach Movat definiert. Da es sich bei den Präparaten um fortlaufende Schnitte handelt, wurden die errechneten Werte für die ROI aus der Movat-Pentachrom Färbung übernommen.

Die Bilder wurden entsprechend ihrer ROI zugeschnitten (Abb. 29 b) und die Auswertung erfolgte per Hand unter der Zuhilfenahme des Programms ImageJ. Die genaue Skalierung der Bilder von Pixel in μm wurde mittels des spezifischen Korrekturfaktors gewährleistet.



Abbildung 30: Auswertung der ASMA-Färbung; Die Abbildung zeigt beispielhaft die Ausmessung der Gesamtfläche eines elliptischen Gefäßes in ImageJ (gelb). Auf gleiche Weise wurde die Lumenfläche bestimmt, die Muskelfläche konnte anschließend errechnet werden. Beim Ausmessen wurden die Gefäße gleichzeitig gezählt und nach ihrer Morphologie aufgeteilt.

Jede ROI wurde manuell durchmustert. Dabei wurden die Gefäße gezählt und gleichzeitig in verschiedene, morphologische Kategorien unterteilt. Unterschieden wurde zwischen runden, elliptischen und irregulär geformten Gefäßen. Zusätzlich zu Zahl und Morphologie wurde für jedes Gefäß eine Flächenbestimmung in μm^2 vorgenommen (Abb. 30). Zuerst wurde durch das Erstellen einer ROI um den Gefäßaußenrand die Gesamtfläche des Gefäßes ermittelt, anschließend nach dem gleichen Verfahren am inneren Rand des Gefäßes dessen Innenfläche. Die ermittelte Innenfläche wurde dann von der Gesamtfläche subtrahiert, um die Muskelfläche des entsprechenden Gefäßes zu erhalten:

$$\sum \text{Muskelflächen} = \sum \text{Gefäßflächen} - \sum \text{Lumenflächen}$$

Am Ende der Auswertung ergab sich für jedes Präparat eine Gesamtgefäßanzahl, welche sich auf drei Einzelwerte für die entsprechende Morphologie aufteilte. Aus den einzelnen Flächen der Gefäße wurde die Gesamtfläche aller Gefäße eines Präparats berechnet. Daraus wurden zusätzlich die Gesamttinnenfläche und die Gesamtmuskelfläche errechnet. Für die Normalisierung dieser Werte musste die ROI, welche schon bei der Movat-Pentachrom Färbung verwendet wurde, modifiziert werden. Hier sollte nicht die ganze ROI betrachtet werden, sondern nur die Anteile, die Gewebe darstellten. Diese neue Gewebe-ROI konnte durch die ermittelten Werte der Movat-Pentachrom Färbung errechnet werden und ergab sich aus der Summe der Flächen für Knochen, Osteoid und fibrocartilaginöses Gewebe. Diese neue Gewebe-ROI wurde anschließend genutzt um die Ergebnisse zu normalisieren. Bezüglich der Schraubenfläche wurde nur die Gesamtanzahl der Gefäße betrachtet.

Verglichen wurde die Anzahl der ausgezählten Gefäße, einmal in der Gesamtschau und anschließend aufgeteilt nach ihrer Morphologie. Schon bei der Betrachtung der Gesamtzahl der beobachteten Gefäße zeichnete sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,00180$) zwischen den beiden Zeitpunkten ab: Nach 52 Wochen ($2,42$ Gefäße/ mm^2) lagen die Werte mehr als 2,5-fach höher als nach 6 Wochen Heilungszeit ($0,89$ Gefäße/ mm^2), was für eine zunehmende Vaskularisierung spricht. Auch im Bezug zur Schraubenfläche konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Mit $0,12$ Gefäßen/ mm^2 zum Zeitpunkt 6W und $0,38$ Gefäßen/ mm^2 zum Zeitpunkt 52W war ebenfalls ein signifikanter Unterschied gegeben ($p = 0,00066$) (Abb. 31 a und b, Tab. 14).

Tabelle 14: Verhältnis der Gefäßgesamtanzahl zur Bezugsfläche; Angaben in [Gefäße/ mm^2]

Gesamtanzahl	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
pro Gewebefläche	0,89	2,42	$p = 0,00180$
pro Schraubenfläche	0,12	0,38	$p = 0,00066$

Sowohl nach 6 Wochen als auch nach 52 Wochen stellte sich die Verteilung so dar, dass die elliptisch geformten Gefäße den größten Anteil an der Gesamtzahl ausmachten. Runde Gefäße wurden am zweithäufigsten beobachtet und die irregulären Gefäße wurden am seltensten registriert.

Wie auch bei der Gesamtanzahl zeigte die Aufteilung nach der Gefäßmorphologie, dass zum späteren Zeitpunkt durchgehend mehr Gefäße zu beobachten waren als zum frühen Zeitpunkt (Abb. 31 c). So waren die elliptischen Gefäße nach 52 Wochen (0,99 Gefäße/mm²) doppelt so häufig aufzufinden wie nach 6 Wochen (0,46 Gefäße/mm²), die rund geformten Gefäße zeigten sich sogar dreimal so viel (6W = 0,28 Gefäße/mm²; 52W = 0,92 Gefäße/mm²). Mit 0,15 Gefäßen/mm² nach 6 Wochen und 0,51 Gefäßen/mm² nach 52 Wochen wiesen auch die irregulär ausgebildeten Blutgefäße, trotz insgesamt niedrigster Anzahl, einen klaren Unterschied auf und mit einem Faktor von 3,4 sogar den deutlichsten Anstieg. Obwohl die Unterschiede in allen Fällen auf den ersten Blick sehr deutlich ausfielen, ergab sich nur für die rund und die irregulär geformten Gefäße eine statistische Signifikanz (rund: $p = 0,00178$; irregulär: $p = 0,00423$). Für die elliptischen Gefäße ($p = 0,06928$) ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Anzahl zwischen den Messzeitpunkten (Tab. 15).

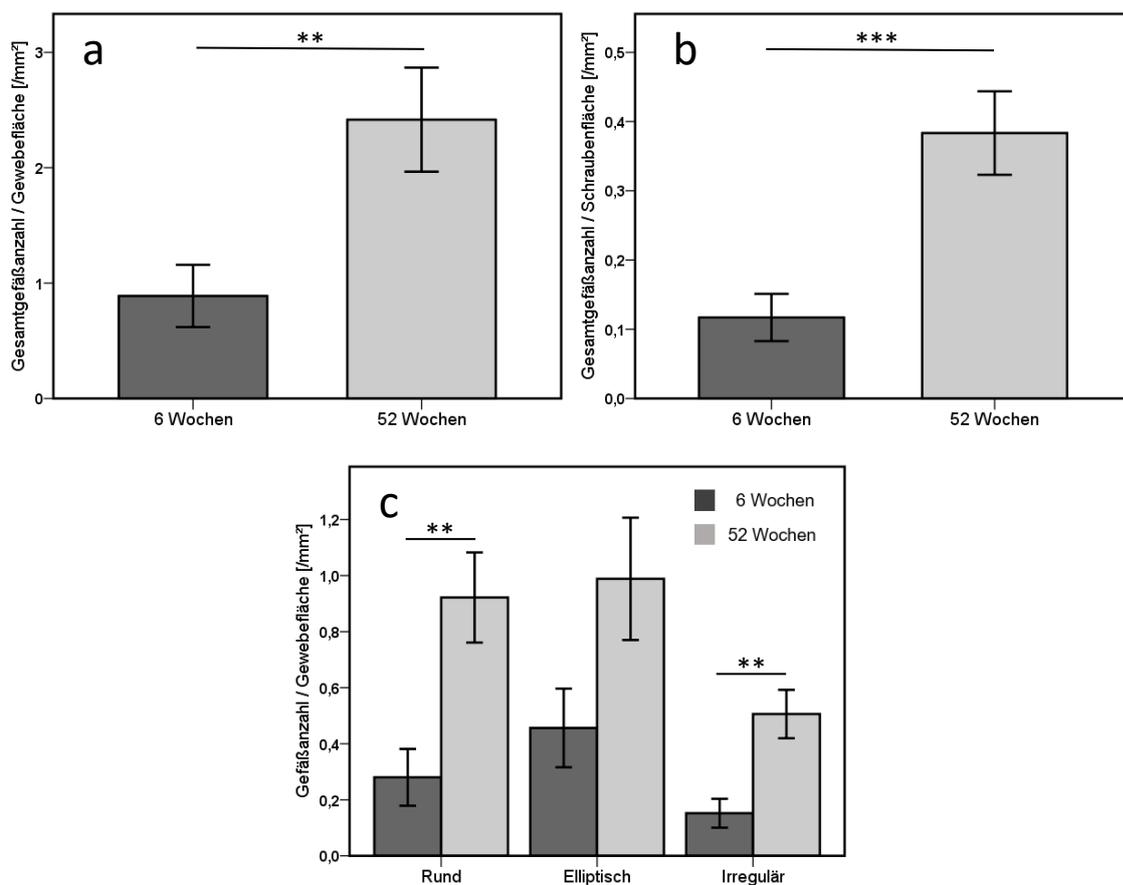


Abbildung 31: Quantitative Auswertung der Gefäßanzahl; Gesamtgefäßanzahl pro a) Gewebefläche [mm²] und b) Schraubenfläche [mm²] waren zum Zeitpunkt 52W jeweils signifikant größer; c) Die Gefäßanzahl aufgeschlüsselt nach Morphologie pro Gewebefläche [mm²] ergab für die runden und irregulären Gefäße ein signifikant höheres Ergebnis; (Mann-Whitney-U * $p \leq 0,05$, $n = 21$)

Tabelle 15: Gefäßanzahl pro Gewebefläche aufgeteilt nach ihrer Morphologie; Angaben in [Gefäße/mm²]

Morphologie	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Elliptisch	0,46	0,99	p = 0,06928
Rund	0,28	0,92	p = 0,00178
Irregulär	0,15	0,51	p = 0,00423

Nicht nur die Form der Gefäße wurde untersucht, sondern auch die Gefäßfläche sowie deren Aufteilung in Muskelanteil und Lumenanteil wurden herausgearbeitet und normalisiert auf die Gewebe-ROI miteinander verglichen (Abb. 32 a und Tab. 16). Diese weitere Analyse ergab, dass zum Zeitpunkt 52W nicht nur mehr Gefäße in den Präparaten zu erkennen waren, sondern diese auch einen größeren Anteil der Fläche einnahmen als zum Zeitpunkt 6W: Das Verhältnis Gesamtgefäßfläche zur Gewebefläche nach 6 Wochen betrug 0,23 % nach 52 Wochen hingegen 0,34 %. Für die Muskelfläche ergaben sich nach 6 Wochen die Werte von 0,15 % und nach 52 Wochen 0,17 %. In diesen zwei Fällen konnte keine Signifikanz festgestellt werden, allein die Untersuchung der Lumenfläche konnte mit einer Differenz von 6W = 0,08 % und 52W = 0,16 % ein signifikantes Ergebnis vorweisen (p = 0,0184).

Tabelle 16: Verhältnis der Gefäßflächen zur Gewebefläche; Angaben in [%]

Anteil Gefäßfläche	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Gefäßfläche	0,23 %	0,34 %	p = 0,0692
Muskelfläche	0,15 %	0,17 %	p = 0,1111
Lumenfläche	0,08 %	0,16 %	p = 0,0184

Ausgehend von den vorangegangenen Ergebnissen wurde nun die Gefäßfläche pro einzelnes Gefäß betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass nach 6 Wochen Heilungszeit insgesamt zwar weniger Gefäße vorhanden waren als nach 52 Wochen, diese sich aber mit 1962,81 $\mu\text{m}^2/\text{Gefäß}$ im Durchschnitt größer darstellten und der Anteil des Muskelgewebes an dieser Fläche mit durchschnittlich 1322,30 $\mu\text{m}^2/\text{Gefäß}$ ungefähr doppelt so hoch war wie die Lumenfläche (640,51 $\mu\text{m}^2/\text{Gefäß}$). Die Gefäße zum Zeitpunkt nach 52 Wochen waren zusammengenommen mit 1478,33 $\mu\text{m}^2/\text{Gefäß}$ im Mittel etwas kleiner, dafür aber zahlreicher vertreten. Beim Vergleich der Muskelfläche (751,08 $\mu\text{m}^2/\text{Gefäß}$) mit der Lumenfläche (727,25 $\mu\text{m}^2/\text{Gefäß}$) zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung (Abb. 32 b und Tab. 17).

Auch nach der Normalisierung der mittleren Gefäßflächen auf die Gewebe-ROI blieben diese Flächenverhältnisse bestehen. Nach 6 Wochen zeigten die Gefäße ein Verhältnis Muskelfläche/Lumenfläche von ca. 2:1, nach 52 Wochen sank dieses Verhältnis auf ca. 1:1. Allerdings waren all diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant.

Tabelle 17: Durchschnittliche Gefäßflächen; Angaben in [μm^2 /Gefäß]

Fläche/Gefäß	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Gesamt	1962,81	1478,33	p = 0,808
Muskel	1322,30	751,08	p = 0,422
Lumen	640,51	727,25	p = 0,382

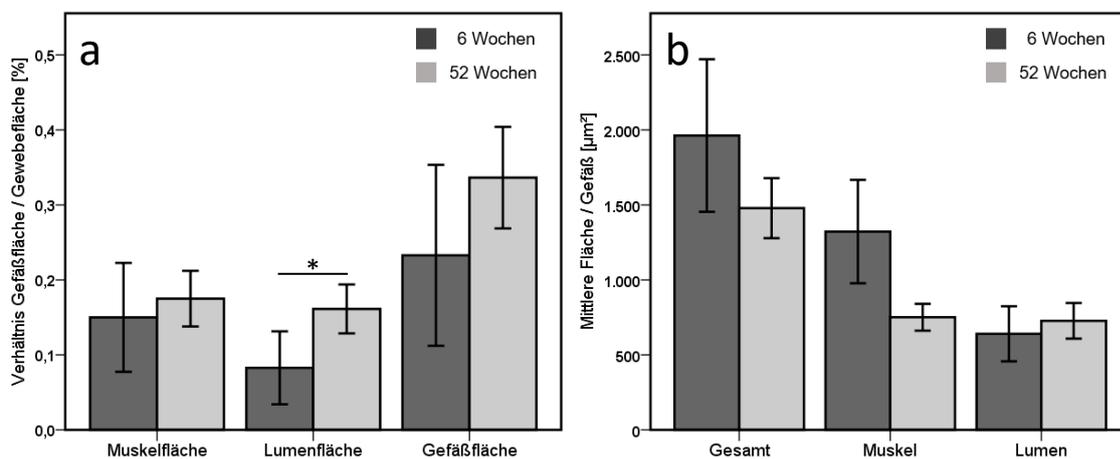


Abbildung 32: Quantitative Auswertung der Gefäßflächen; a) Verhältnis der einzelnen Gefäßflächen zur Gewebefläche [%]. Die Lumenfläche war zum Zeitpunkt 52W signifikant größer; b) Durchschnittsfläche pro Gefäß [μm^2]; (Mann-Whitney-U *p \leq 0,05, n = 21)

Wie auch schon bei den Untersuchungen der alkalischen Phosphatase zeigte sich in diesem Versuch eine sehr starke Heterogenität zwischen den Präparaten. Die teils gravierenden Unterschiede in Anzahl und Größe der Gefäße traten nicht nur zwischen Zeitpunkten auf, sondern jeweils auch innerhalb der zwei Gruppen und bedingten so die hohen Standardabweichungen.

5.6 Silbernitrat

Die Silbernitratfärbung wurde verwendet, um Osteozyten und deren kanalikuläres System sichtbar zu machen. Sie stellen sich im Knochen in unterschiedlichen Formen dar und erlauben anhand ihrer Morphologie Rückschlüsse auf die Zellaktivität.

Große, runde Zellen deuten auf neu entstandene und aktive Osteozyten hin. Sie liegen in großen Lakunen und gehen aus Osteoblasten hervor, die während des Mineralisierungsprozesses im Knochen eingeschlossen wurden. In den Lamellenknochen integrierte Osteozyten hingegen sind kleiner, haben einen spindelförmigen Zellkörper und liegen in ovalen Lakunen im Knochen. Ihr Netzwerk aus Kanalikuli ist in der Silbernitratfärbung ebenfalls zu erkennen und stellt sich als dünne, schwarze Ausläufer ausgehend von der Zelle dar. Leere Knochenlakunen sprechen für apoptotische Zellen. Von jeder Probe wurde jeweils ein Schnittpräparat mit der Silbernitratfärbung angefertigt.

Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 10-facher Vergrößerung die unmittelbaren Gewebestrukturen um die Schraube herum fotografiert. Besonders die Anteile, die in das Gewinde hineinragten, waren von Interesse (Abb. 33).

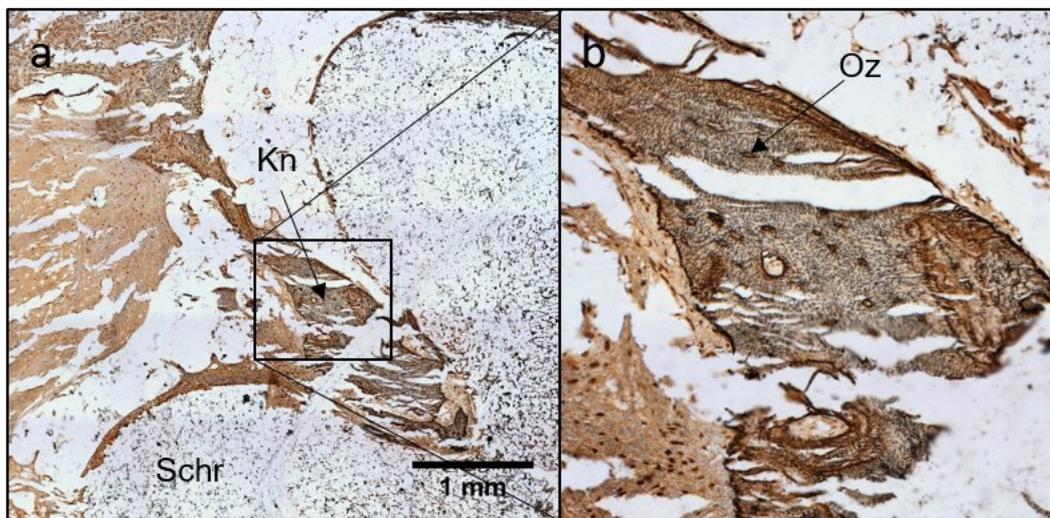


Abbildung 33: Silbernitratfärbung; Die Aufnahmen der Silbernitratfärbung wurden vor allem im Bereich des Gewindes angefertigt (a); Kn = Knochen, Schr = Schraubengewebe. Bild b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt mit dunkel angefärbten Knochenlakunen der Osteozyten (Oz).

Für jedes Präparat entstanden so mehrere Einzelbilder. Die finalen Auswertungsergebnisse für das jeweilige Präparat setzen sich aus den Ergebnissen der Einzelbilder zusammen. Die Auswertung der Bilder erfolgte unter Zuhilfenahme von ImageJ. Dazu wurde jedes Bild manuell durchmustert und mit dem Plugin „Cell Counter“ die Osteozyten gezählt.

Diese wurden dabei direkt in die Gruppen rund, spindelförmig und apoptotisch unterteilt. Am Ende ergaben sich pro Präparat eine Gesamtzahl der Osteozyten, sowie eine Aufteilung in deren Zellmorphologie. Damit eine Vergleichbarkeit der Werte gewährleistet war, musste zusätzlich die untersuchte Knochenfläche bestimmt werden, auf die die Werte später normalisiert wurden.

Wie auch bei den Färbungen zuvor wurde die Knochenfläche mit dem Programm ImageJ ermittelt. Dazu wurde jedes Einzelbild in eine Binärversion umgewandelt. Gewebeanteile, die definitiv nicht zum Knochen gehörten, wurden manuell entfernt. Anhand des binären Bildes konnte der prozentuale Anteil des Knochens am Gesamtbild ermittelt werden. Ebenfalls, wie schon in den Beispielen zuvor, wurde die Skalierung mit dem mikroskopspezifischen Umrechnungsfaktor von Pixel auf μm korrigiert. Die Knochenfläche in μm^2 erhielt man, indem man die bekannte Bildfläche mit dem ermittelten, prozentualen Knochenanteil des Bildes multiplizierte. Die Summe aus den Flächen der Einzelbilder ergab die Gesamtknochenfläche für ein Präparat:

$$\text{Knochenfläche} = \sum \text{Bildfläche} \cdot \text{Knochenanteil}$$

Die ausgezählten und kategorisierten Osteozyten wurden zum einen auf die errechnete Knochenfläche normalisiert, zum anderen wurde abermals die Fläche der Schraube im Präparat als Bezugsgröße zur Normalisierung verwendet. Bei der Betrachtung der Gesamtanzahl konnten, sowohl für das Verhältnis von Osteozyten zur Knochenfläche, wie auch das Verhältnis von Osteozyten zu Schraubenfläche zum Zeitpunkt 52W, höhere Zellzahlen pro mm^2 festgestellt werden als zum früheren Zeitpunkt 6W. Auf den beobachteten Knochen bezogen konnten so nach 6 Wochen 46,01 Zellen/ mm^2 und nach 52 Wochen 50,25 Zellen/ mm^2 gezählt werden (Tab. 18). Aufgrund der größeren Schraubenfläche im Vergleich zum Knochen fielen in diesem Fall die Werte mit 2,43 Zellen/ mm^2 nach 6 Wochen und 2,76 Zellen/ mm^2 wesentlich geringer aus (Tab. 19). Für beide Verhältnisse konnte keine statistische Signifikanz der Unterschiede nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Zellzahlen bei Aufschlüsselung nach ihrer Zellmorphologie folgten der gleichen Tendenz wie auch schon die Gesamtzahl der Osteozyten: Sowohl die Anzahl der spindelförmigen als auch die der runden Osteozyten nahm mit steigender Einheilungszeit zu.

Auch bei der Aufteilung der Unterkategorien auf die Gesamtzahl blieb dieses Muster bestehen. So waren zum Zeitpunkt 6W wie auch am Zeitpunkt 52W jeweils mehr spindelförmige als runde Osteozyten in den Präparaten erkennbar. Für die runden Osteozyten wurde nach 6 Wochen ein Wert von 17,21 Zellen/mm² Knochenfläche (0,91 Zellen/mm² Schraubenfläche) und nach 52 Wochen von 19,35 Zellen/mm² Knochenfläche (1,07 Zellen/mm² Schraubenfläche) ermittelt. Der Anteil der spindelförmigen Osteozyten änderte sich von 23,84 Zellen/mm² Knochenfläche (1,28 Zellen/mm² Schraubenfläche) zum Zeitpunkt 6W auf 25,85 Zellen/mm² Knochenfläche (1,44 Zellen/mm² Schraubenfläche) zum Zeitpunkt 52W (Tab. 18 und 19).

Tabelle 18: Osteozytenzahlen pro beobachteter Knochenfläche; Angaben in [Zellen/mm²]

Zellen / mm ² Knochenfläche	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Spindelförmig	23,84	25,85	p = 0,554
Rund	17,21	19,35	p = 0,464
Apoptotisch	4,96	5,05	p = 0,862
Gesamt	46,01	50,25	p = 0,651

Tabelle 19: Osteozytenzahlen pro beobachteter Schraubenfläche; Angaben in [Zellen/mm²]

Zellen / mm ² Schraubenfläche	6 Wochen	52 Wochen	Signifikanz
Spindelförmig	1,28	1,44	p = 0,382
Rund	0,91	1,07	p = 0,345
Apoptotisch	0,2503	0,2618	p = 0,602
Gesamt	2,43	2,76	p = 0,345

Zusätzlich wurde der Quotient aus spindelförmigen und runden Osteozyten errechnet und verglichen. Der geringe Unterschied des Quotienten von 1,368 nach 6 Wochen zu 1,402 nach 52 Wochen lässt sich anhand der zuvor dargestellten Daten leicht ableiten. Eine statistische Signifikanz der Unterschiede zeigte sich in keinem der genannten Fälle.

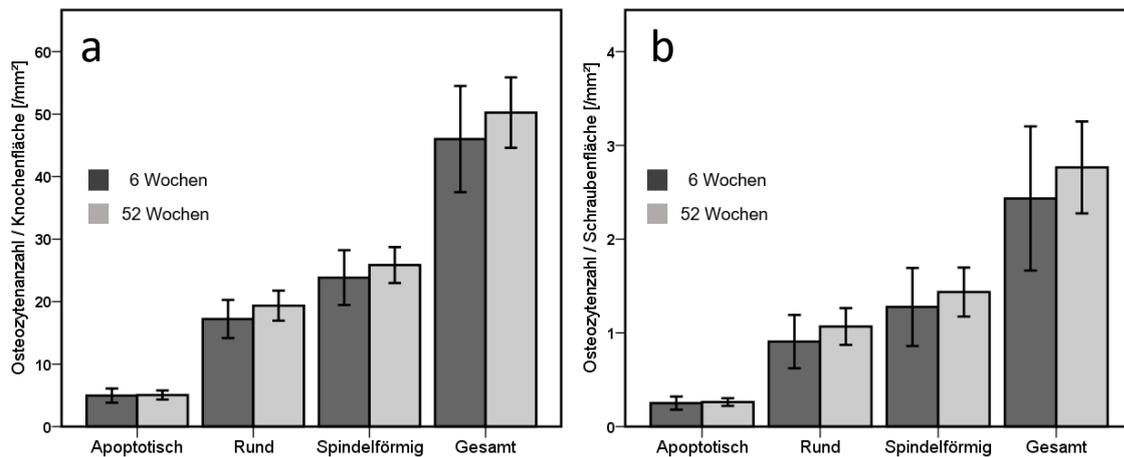


Abbildung 34: Quantitative Auswertung der Osteozytenanzahl; Osteozytenanzahl aufgeteilt nach ihrer Morphologie pro a) Knochenfläche [mm²] und b) Schraubenfläche [mm²]; n = 21

Als letzte Zellmorphologie wurden die als apoptotisch eingestuft Osteozyten verglichen. Sie stellten zu beiden Messpunkten die kleinste Zellpopulation dar. Das gleiche Verteilungsbild, wie bei den runden und spindelförmigen Zellen, zeigte sich bei der Normalisierung der Zellzahlen auf die Schraubenfläche. Der 6-Wochen Wert fiel wie schon zuvor mit 0,2503 Zellen/mm² nicht signifikant geringer aus als mit 0,2618 Zellen/mm² zum späteren Zeitpunkt nach 52 Wochen. Bei Normalisierung der apoptotischen Osteozyten auf die Knochenfläche zeigte sich in diesem Fall allerdings ein annähernd gleiches, ebenfalls statistisch nicht signifikantes Ergebnis (6W = 4,96 Zellen/mm²; 52W = 5,05 Zellen/mm²). Zu beachten ist, dass der nominale Unterschied bei der Normalisierung auf die Schraubenfläche zwar auch recht gering ist, aber aufgrund der wesentlich größeren Fläche der Schraube im Vergleich zum beobachteten Knochen einen größeren Effekt zufolge hatte (siehe Abb. 34).

6 Diskussion

Für die operative Behandlung einer traumatischen vorderen Kreuzbandruptur werden zur Fixierung von Sehnentransplantaten im Knochen am häufigsten Interferenzschrauben genutzt, die aus bioresorbierbaren Materialien gefertigt werden. Zu diesen Systemen gehört auch die in dieser Studie verwendete Biokomposit-Schraube der Firma Arthrex. An einem Schafmodell wurden die Osteointegration sowie die zellulären Reaktionen in der unmittelbaren Umgebung des eingebrachten Materials untersucht. Insgesamt stand dabei eine Probenanzahl von $n = 21$ Präparaten zur Verfügung.

Die Untersuchung der Mineralisation mittels Movat-Pentachrom-Färbung zeigte im Vergleich der zwei Zeitpunkte 6 Wochen/52 Wochen keine signifikanten Unterschiede, unabhängig davon, ob die beobachtete Gewebefläche oder die gemessene Schraubenfläche als Bezugsgröße herangezogen wurden. Es ließ sich jedoch ein Trend beobachten, dass sowohl das mineralisierte als auch das fibroartilaginöse Gewebe im Heilungsverlauf zunahm, wohingegen der Anteil des nicht-mineralisierten Gewebes rückläufig war. Dieses Ergebnis entspricht nur zum Teil der Erwartung, dass die Mineralisation nach 52 Wochen stärker ausgeprägt sein sollte, bei gleichzeitiger Abnahme fibroartilaginösen Gewebes. Vor allem verlief die weitere Zunahme des fibroartilaginösen Gewebes im Versuch entgegen der vorherigen Vermutung, eine Abnahme dieses Gewebeanteils beobachten zu können. Der Zuwachs an mineralisierter Matrix und die Abnahme des Osteoids waren zwar erwartungsgemäß vorhanden, jedoch wurden hierzu im Vorfeld größere Unterschiede zwischen den Messpunkten angenommen.

Auch in der Auswertung der Anzahl der Knochenzellen blieben die Ergebnisse insgesamt hinter den zuvor aufgestellten Prognosen zurück. Alle drei beobachteten Zellreihen zeigten keine signifikante Veränderung der Anzahl oder ihrer Aktivität im Vergleich zwischen 6 und 52 Wochen nach der Operation. Für Osteoblasten und Osteoklasten wurde eine Abnahme der Anzahl der Zellen und ihrer Aktivität erwartet, da mit fortschreitendem Heilungsprozess ein Abschluss des Remodellings im Knochen einhergehen sollte bzw. zum früheren Messpunkt ein deutlich höherer Knochenumsatz vermutet wurde. Die Ergebnisse für beide Zellreihen konnten diese Schlussfolgerung hingegen nicht abschließend bestätigen.

Auch die Anzahl der Osteozyten verglichen zwischen den beiden Messpunkten veränderte sich wider Erwarten kaum, obwohl hier vermutet wurde, dass ihre Zahl im Verlauf der Heilung mit zunehmendem Knochenanteil ebenfalls zunehmen müsste.

Die Untersuchung der Präparate hinsichtlich der Angiogenese mit Hilfe der ASMA-Färbung zeigte hingegen signifikante Unterschiede im Vergleich der Messungen am 6 und 52 Wochen Zeitpunkt. Es konnte für fast alle beobachteten Gefäßmorphologien ein signifikanter Anstieg ihrer Anzahl hin zum zweiten Messzeitpunkt gezeigt werden. Diese Entwicklung ist ebenfalls widersprüchlich in Bezug auf die Erwartungen. Zwar nehmen vor allem die rund geformten Gefäße im Verlauf in ihrer Anzahl zu, so wie man es bei gesunden Knochen erwarten würde, aber auch die irregulär geformten Gefäße nahmen in ihrer Anzahl deutlich zu und überstiegen im Absolutwert sogar die rundlichen Gefäße, wenn auch nicht signifikant. Im Vorfeld der Versuchsreihe wurde ein fortschreitender Heilungsprozess und abklingenden Entzündungsreaktionen im Versuchsverlauf zwischen den zwei Messpunkten angenommen. Einhergehend mit dieser Heilung wurde auch mit einer Abnahme der irregulär geformten Gefäße, welche für die Frühform der Angiogenese, oder eine rasche und eher unregelmäßig verlaufende Angiogenese sprechen, gerechnet.

Insgesamt zeigte sich in einigen Fällen, im Besonderen bei den Färbungen von ALP, TRAP und ASMA, eine deutlich ausgeprägte Heterogenität der Ergebnisse unterschiedlicher Präparate. Diese Variabilität führte bei einer relativ geringen Anzahl an Präparaten ($n = 18$ bis $n = 21$) zu teilweise sehr hohen Standardabweichungen in der statistischen Auswertung. Als mögliche Aspekte, welche die Interpretation des Versuchs und die nachfolgenden Ergebnisse erschweren, können vor allem das Studiendesign mit einer relativ geringen Anzahl an Versuchstieren sowie die ausgewählten Messpunkte von 6 und 52 Wochen angeführt werden. Da die Heterogenität vor allem in den immunhistochemischen Präparaten zu finden ist, könnte auch hier eine Variabilität während der Durchführung der komplexeren Versuche ein Grund sein. Eine weitere Färbung oder die Kontrolle der Ergebnisse durch eine andere sensitivere Methode war aufgrund der geringen Präparateanzahl nicht möglich.

Die derzeitige Forschungslage bezüglich bioresorbierbarer Kreuzbandschrauben stellt sich recht unübersichtlich dar. Zwar gibt es eine Fülle an Studien, die sich mit diesem Thema beschäftigen, aber allein durch die Vielfalt der verwendeten Materialien sind sie nur bedingt sinnvoll untereinander zu vergleichen.

Häufig sind vor allem Studien zu finden, die sich auf PLLA als Grundsubstanz beziehen [7, 13, 53, 59], aber auch PLGA ist häufig als Testmaterial verwendet worden [9, 13, 14, 58]. Diese Studien stammen meist noch aus der Zeit um die Jahrhundertwende, als bioresorbierbare Materialien anfangen sich in der Medizin zu etablieren. Seltener untersucht sind dahingegen Biokomposit-Werkstoffe, die zusätzlich zu dem verwendeten Polymer noch Hydroxylapatit oder β -TCP enthalten [6, 9, 36]. Studien, die sich wie die vorliegende auf das gleiche Gemisch aus PLDLA und BCP beziehen, waren nicht zu finden und ein genauer Vergleich somit nicht möglich. Auch in der Methodik der Studien findet man zahlreiche Variabilitäten, welche den Vergleich untereinander und auch in Bezug auf die hier vorliegende Studie erschweren. Zum Beispiel wird teilweise nur das entsprechende Material *in vitro* getestet, nicht aber in Form einer Schraube im Knochen *in vivo*.

Insgesamt finden sich wenige Untersuchungen an einem Großtiermodell, wie es in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Wenn überhaupt ein Tiermodell genutzt wurde, dann wurden meist Kleintiere wie Hasen oder Ratten verwendet, bei denen die anatomische Übertragbarkeit auf den Menschen fraglich ist. Ebenso wenig finden sich klar definierte Langzeitstudien in der Literatur. Es gibt zwar vereinzelt klinische Follow-Up-Studien mit Zeiträumen zwischen 4-7 Jahren mit menschlichen Probanden, aufgrund dieser Umstände wurden die Ergebnisse aber rein auf Basis von klinischer und bildgebender Untersuchung der Probanden erhoben. Eine histologische Aufarbeitung des getesteten Materials war dabei natürlich nicht möglich. Insgesamt ist es daher schwer, die vorliegende Studie mit anderen Forschungsergebnissen zu vergleichen und zeigt gleichzeitig einmal mehr die Notwendigkeit und Einzigartigkeit des hier durchgeführten Experiments. Im Folgenden sollen nun die einzelnen Versuchsteile noch einmal detaillierter betrachtet und diskutiert werden.

6.1 Unzureichendes Degradationsverhalten der Schrauben mit deutlicher Heterogenität

Die Betrachtung der Schraubenflächen erfolgte, um den Zerfall des Biokomposit-Materials auf makroskopischer Ebene zu überprüfen. Eine erste Einschätzung hinsichtlich dieses Parameters erfolgte schon durch die Mikro-CT Aufnahmen der Kniepräparate.

Hierbei zeigte sich bereits eine erhebliche Heterogenität der Präparate hinsichtlich des Schraubenvolumens und hinsichtlich der Intaktheit der Schrauben verglichen zwischen den beiden Messpunkten, aber auch innerhalb der Präparate eines Zeitpunkts. In den histologisch aufbereiteten Präparaten bestätigte sich dieses heterogene Bild. Zwischen den Messpunkten nach 6 und nach 52 Wochen ließen sich auf den ersten Blick nur wenige Unterschiede erkennen. Insgesamt zeigten die Schrauben rein optisch Anzeichen eines beginnenden Zerfalls (Degradation), manche Schrauben zeigten im Querschnitt Risse und Bruchlinien. In jedem Fall ließ sich jedoch die Schraube ohne Probleme optisch darstellen. Der Schraubenkanal war eindeutig ersichtlich und nie durch Knochen- oder anderes Gewebe aufgefüllt worden.

Wie genau die Heterogenität zwischen den einzelnen Messpunkten zustande kam bleibt unklar. Anfangs bestand die Vermutung, dass die Einbettung mittels PMMA zu einem unregelmäßigen Zerfall und der Hydrolyse einiger Schrauben geführt haben könnte. Im Vorfeld der Studie wurde diese Methode der Einbettung mit den entsprechenden Schrauben jedoch überprüft, sodass eine Auflösung durch das PMMA und den Prozess der Einbettung ausgeschlossen werden konnte.

Insgesamt zeigte sich bei der optischen Betrachtung der Präparate vor der eigentlichen histologischen Untersuchung, dass innerhalb von 52 Wochen eine komplette Auflösung der Schraube aus dem vorliegenden Biokomposit-Gemisch (unter Verwendung eines Stereoisomers wie PLDLA und unter Zuhilfenahme von Biokeramiken wie TCP und HA) sowie ein Auffüllen des Schraubenkanals durch neu einwachsenden Knochen nicht erfolgt ist. Das hier gezeigte Auflösungsverhalten ähnelte dem in der Studie des Herstellers beschriebenen Auflösungsverhalten. Im Gegensatz zur Herstellerstudie konnte in der hier durchgeführten Untersuchung jedoch kein neuer Knochen innerhalb des Schraubenbereichs nachgewiesen werden.

Dieses hier gezeigte, makroskopische Ergebnis fügt sich weitestgehend in die bisherige Literatur ein: Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Zerfallsdauer einer bioresorbierbaren Schraube trotz umfassender Studien nur schwierig vorherzusagen ist. Je nach betrachtetem Versuchsmodell können absolute Zerfallszeiten von bis zu 5 Jahren für z. B. PLLA beobachtet werden, für PDLA wird hingegen nur 1 Jahr beschrieben [5, 52, 72].

Diese ursprünglich erfassten Werte beziehen sich allerdings nur auf die spezifischen Tiermodelle und den spezifischen Versuchsaufbau, in denen sie ermittelt wurden, und sind mit Sicherheit nur zum Teil auf den Menschen oder ein anderes OP-Verfahren übertragbar.

Die hier dargestellte Studie im Großtiermodell und das angewandte OP-Verfahren führt dahingehend zu einer höheren klinischen Relevanz und verbesserten Anwendbarkeit der ermittelten Daten. MRT-Untersuchungen von PLLA-Interferenzschrauben im Menschen zeigten nach bis zu 24 Monaten keine signifikante Volumenabnahme [84]. Stähelin et al. zeigte in einem Case Report auf, dass PLLA-Schrauben teilweise kaum bis gar nicht resorbiert werden. Für reine PLDLA-Schrauben zeigt die Studie allerdings, dass die Schrauben schon nach 10 – 14 Monaten postoperativ vollständig resorbiert sein können [72]. Die Ergebnisse dieses Reports wurden zwar arthroskopisch erhoben, es wurden allerdings insgesamt nur 3 Patienten evaluiert, was das Ergebnis aufgrund der geringen Fallstärke in seiner Aussagekraft abschwächt. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien stehen zum Teil also im Widerspruch zueinander, sodass sie wenig aussagekräftig sind. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien beschreiben Tecklenburg et al. beispielsweise, dass eine PLDLA/HA-Schraube auch nach 24 Monaten noch klar erkennbar war [78].

In klinischen Studien zur Langzeitabsorption von bioresorbierbaren Kreuzbandschrauben von Barber und Dockery wurden verschiedene Schraubenarten nach erfolgreicher Kreuzbandrekonstruktion verglichen. In klinischen Tests sowie unter radiologischer Kontrolle der Patienten wurden PLLA-Schrauben und PLLA/TCP-Schrauben nach bis zu 7 Jahren postoperativ untersucht. Die Studien zeigten, dass die PLLA-Schrauben nach diesem Zeitraum radiologisch nicht mehr darstellbar waren; für die PLLA/TCP Schrauben war dies sogar schon nach einem Zeitraum von 4 Jahren der Fall. Da diese Resultate allein aus der CT-Untersuchung erfolgten und es keine arthroskopische oder gar histologische Überprüfung erfolgte, sind sie nur bedingt interpretierbar [6, 7].

Unabhängig vom verwendeten Material werden also ungefähre Abbauzeiten von mindestens 2 Jahren oder länger gefunden.

Aufgrund der vielfältigen Zusammensetzungsmöglichkeiten der verwendeten Materialien, dem unterschiedlichen Einfluss des individuellen Gewebemilieus je nach Studiendesign und dem Fehlen von aussagekräftigen Langzeitstudien ist es jedoch bis heute kaum möglich eine genaue Vorhersage darüber zu treffen, wie lange eine bestimmte bioresorbierbare Kreuzbandschraube benötigt, um komplett abgebaut zu werden. Es können daher lediglich Richtwerte angegeben werden.

Bei der Entwicklung neuer Schrauben versucht man in einen Bereich zu gelangen, in dem die Resorption so schnell wie möglich, gleichzeitig aber auch so langsam wie nötig von statten geht. Damit soll erreicht werden, dass die Schraube bis zur Einheilung des Implantats genug Stabilität gewährleistet, jedoch nicht zu lange im Körper verbleibt, um Fremdkörper- bzw. Abwehrreaktionen und Entzündungen hervorzurufen. Letztlich ist dieses Intervall schwer zu bestimmen, v.a. da auch eine individuelle Komponente je nach Körperbau, Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand angenommen werden kann. Mit Blick auf die Studienlage zum Thema Degradation von bioresorbierbaren Materialien ist im hier vorliegenden Fall der Studienzeitraum mit 52 Wochen gegebenenfalls zu kurz, um einen signifikanten Unterschied in der Degradation der Schrauben erkennen zu können. Dies bestätigt die Annahmen der vorher genannten Studien, die davon ausgehen, dass sich der Zerfallsprozess über 2 Jahre oder länger hinziehen kann. Für zukünftige Versuchsanordnungen sollte deshalb in Betracht gezogen werden gegebenenfalls ein längeres Zeitintervall von bis zu 2 Jahren zu untersuchen, um den Verfallsprozess der bioresorbierbaren Schrauben besser erfassen zu können. Dadurch kann gegebenenfalls besser abgeschätzt werden, ob die gewählte Schraube im optimalen Rahmen der gewünschten Zerfallsdauer liegt und weder zu schnell noch zu langsam resorbiert wird.

6.2 Unzureichende Mineralisation im Schraubenkanal

Das Hauptaugenmerk dieser experimentellen Studie lag vor allem auf der Gewebereaktion und Knochenmineralisation im unmittelbaren Grenzbereich zur Schraubenfläche. Durch verschiedene histologische Methoden wurden die unterschiedlichen Gewebearten dargestellt und anschließend analysiert. Ziel war es herauszufinden, ob die Zusammensetzung der Schraube durch gleichmäßige Degradation im Körper unter Verwendung von Biokeramiken ein geregeltes Einwachsen von gesundem Knochen in den freiwerdenden Schraubenkanal initiiert.

Dieser Vorgang ist nötig, um eine sichere Verankerung des Sehnentransplantats im Knochen zu gewährleisten.

Die mechanische Stabilität der verwendeten Schraube und des Transplantates wurde durch einen anderen Teil der Arbeitsgruppe mittels biomechanischer Tests überprüft (Siehe Kap. 4.2 Studiendesign, S. 37). Diese zeigten eine ausreichende mechanische Stabilität der Schraube und des rekonstruierten vorderen Kreuzbands. Eine Publikation der Daten ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht erschienen.

Das neu gebildete Gewebe im unmittelbaren Umfeld der Schraube bestand in der vorliegenden Studie größtenteils aus fibrocartilaginösem Material. Die vom Hersteller veröffentlichten Studie bleibt an diesem Punkt vage. Nach 52 Wochen werden dort variierende Mengen an fibrösem Gewebe im Bereich der Schraube beschrieben. Eine genaue Quantifizierung erfolgte allerdings nicht [3]. Im Vergleich zwischen den beiden Messpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach 6 Wochen oder nach 52 Wochen. Zwar nahm der Anteil des Osteoids, wie vermutet, im Trend ab und auch das mineralisierte Knochengewebe wurde wie erwartet mehr, aber auch der Anteil des fibrocartilaginösen Gewebes nahm im zeitlichen Verlauf weiter zu. Dies deutet darauf hin, dass das Gros des neu gebildeten Knochengewebes nicht nur primär aus neu gebildetem Osteoid entstanden ist, sondern auch durch sekundäre Verknöcherung aus dem umliegenden Bindegewebe, welches so vermutlich nur ein unzureichend entwickeltes Knochengewebe bilden konnte. Das fibrocartilaginöse Gewebe führte hier vermutlich zu einer sich selbst verstärkenden Reaktion: Zum einen wird seine Bildung als Reaktion auf das eingesetzte und sich zersetzende PLDLA als unspezifische Gewebsreaktion initiiert [14, 59], zum anderen kommt es durch diesen Saum aus fibrocartilaginösem Gewebe um die Schraube herum zu einer Art Abkapselung (Walling-Off Phänomen), welche den weiteren Abbau der Schraube behindert [14, 59].

Somit verlängert sich die Degradationszeit der Schraube im Körper und durch den mangelnden Abbau und Abtransport des Fremdmaterials kann kein adäquates Remodelling des Knochens erfolgen. Auch das eingesetzte TCP als osteokonduktives Material hätte in diesem Fall vermutlich nur wenig Wirkung, da es ebenso durch den Bindegewebssaum vom Knochen getrennt wird und so ein Kontakt zu Knochenzellen verhindert wird [14, 59].

Das Ergebnis dieses Versuchsteils ist, dass trotz Einsatz von Biokeramiken, wie z. B. BCP in diesem Fall, die Grenzfläche zwischen Schraube und Knochengewebe als Schwachstelle der Verbindung bestehen bleibt. Im Beobachtungszeitraum der Studie konnten keine Belege dafür erbracht werden, dass der durch die sich auflösende Schraube freiwerdende Raum im Bohrkanal adäquat durch neues, primär gebildetes Knochenmaterial ersetzt wird. Obwohl sich die untersuchte Schraube in den biomechanischen Tests als stabil erwies, könnte darin ein Schwachpunkt dieses Verfahrens angesehen werden. Darin besteht nun ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Verfahren oder Materialien, da alle bisherigen Verfahren auf Basis von Polymerverbindungen vergleichbare Nachteile zeigten, unabhängig davon, in welchem Verhältnis sie eingesetzt wurden oder welche Zusatzmaterialien sie enthielten. Zwar zeigt der Knochen keine Abstoßungsreaktion oder eine massive Fremdkörperreaktion, trotzdem wird durch das oftmals auftretende Walling-Off Phänomen* die komplette Einheilung behindert. Als grundlegender Auslöser wird dafür der Einsatz der Polymere angesehen, die durch ihren Zerfall in saure Derivate ein unphysiologisches Milieu schaffen und damit den Heilungsprozess behindern [36].

Durch die Einführung der Kompositwerkstoffe konnten einige der Nachteile reiner Polymerverbindungen vermieden werden und Hunt et al. zeigten in ihrer Studie eine verbesserte Einheilung von Kompositwerkstoffen im Vergleich zu reinem PLLA [36]. Eine vollständige Verhinderung von Komplikationen ist, wie in dieser Studie dargelegt, damit jedoch nicht möglich. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte zukünftig erforscht werden, ob und wie die Verwendung der polymerbasierten Implantate durch den Einsatz neu entwickelter Werkstoffe ersetzt werden kann.

Wie schon bei der Beobachtung der Schraubendegradation wären auch zur Betrachtung der Mineralisation des Bohrkanals und der Grenzfläche mit Blick in die Zukunft längerfristig angelegte Studien von Nöten, um eine bessere Aussage über das Auflöseverhalten der Schraube und die Gewebereaktion des umliegenden Knochens zu treffen. Der Studienendpunkt von 52 Wochen war in diesem Falle vermutlich zu früh. Insgesamt fehlt es in diesem Gebiet der Forschung an aussagekräftigen Endpunktstudien mit anschließender, histologischer Auswertung.

* Walling-Off = Frühe Neubildung von Bindegewebe und Knochen im Grenzbereich zur Schraube ohne Einwachsen in den Schraubenkanal. Die sich auflösende Schraube wird „eingemauert“ und bei weiterer Degradation nicht durch Knochen, sondern durch Bindegewebe ersetzt [14, 59].

Solche Langzeitstudien im Tiermodell werden selten durchgeführt, da Langzeitkosten und ein hoher Aufwand in der Tierhaltung die Versuchsdauer begrenzen. Langzeitstudien am Menschen sind meist nicht mit einer histologischen Untersuchung vereinbar und lassen daher nur nicht-invasive Untersuchungsmethoden zu, um den Heilungserfolg und das Auflöseverhalten der Schraube zu überprüfen. Nicht-invasive Langzeitstudien am Menschen können beispielsweise durch CT-Untersuchungen durchgeführt werden, eine detaillierte Beurteilung der Remineralisation ist alleine durch eine Bildgebung ohne Histologie jedoch nur bedingt aussagekräftig. Es kann lediglich die Abbaubarkeit des Materials verfolgt werden. Die Art und Qualität des neu gebildeten Gewebes sind nur ungenau bestimmbar. Somit bleiben Aussagen abseits der Theorie über das Einwachsen von polymerbasierten Schrauben im Zuge einer vorderen Kreuzbandrekonstruktion vage.

6.3 Keine signifikante Änderung der Zahl von Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten

Die Auswertung der Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten erfolgte zur Beurteilung des Knochenwachstums und -umsatzes auf zellulärer Ebene. Anhand der Anzahl und Aktivität der entsprechenden Knochenzellen können Rückschlüsse auf die Neubildung von Knochengewebe zu den verschiedenen Zeitpunkten gezogen werden. Diese Differenzierung und Quantifizierung *in vivo* wurde in der Studie des Herstellers nicht vorgenommen. Es erfolgte lediglich eine *in vitro* Testung der Osteoblastenadhäsion an das Material [3].

In der vorliegenden Studie sollte hingegen geprüft werden, inwieweit sich die Aktivität der Knochenzellen zwischen den Zeitpunkten 6 und 52 Wochen unterscheidet. Im Vorfeld wurde die Hypothese aufgestellt, dass zum früheren Zeitpunkt nach 6 Wochen eine höhere Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten besteht, die einen erhöhten Knochenumsatz und ein aktives Remodelling bedeuten würden. Diese Vermutung bestätigte sich im Versuch jedoch nicht. Weder die Osteoklasten noch die Osteoblasten zeigten einen signifikanten Unterschied ihrer Aktivität zwischen den Zeitpunkten 6 und 52 Wochen. Es ließ sich lediglich ein leichter Trend erkennen, der eine Abnahme der Zellanzahl und -aktivität vermuten ließ. Aufgrund der großen Inhomogenität der angefärbten Präparate in den Untersuchungen zu ALP und TRAP ist aber selbst dieser Trend nicht aussagekräftig.

In den Untersuchungen zur Mineralisation wurde hier gezeigt, dass sich direkt um die Schraube nur wenig neuer, primärer Knochen ausgebildet hatte. Für die Osteoklasten lässt sich vermuten, dass aufgrund dieses fehlenden neuen Knochens um die Schraube herum keine Wanderung der Zellen stattgefunden hat und sie im Bereich des originären Knochens im Bohrkanal verblieben sind. Aus den Versuchsergebnissen lässt sich ableiten, dass im Vergleich der beiden Zeitpunkte kein erhöhtes Remodelling zum Zeitpunkt 6 Wochen um die Schraube herum stattgefunden hat.

Auch die Osteoblastenanzahl und deren Aktivität unterschieden sich nicht statistisch signifikant zwischen dem frühen und dem späten Beobachtungspunkt. Wie bei den Osteoklasten ist auch hier nur ein leichter Trend zur Abnahme nachweisbar. Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass nicht nur der Abbau von Knochen, sondern auch die neue Mineralisation von gesundem Knochen weder nach 6 noch nach 52 Wochen vermehrt stattgefunden hat. Der neu gebildete Knochen besteht vermutlich noch hauptsächlich aus sekundär mineralisiertem fibrocartilaginösem Gewebe, wie es bei der sekundären Frakturheilung entsteht. Dieses entstand vermutlich durch Mineralisation von Bindegewebe durch Fibroblasten. Diese Annahme wurde jedoch nicht durch eine histologische Methode überprüft und bleibt als Ergebnishypothese unbestätigt. Bestärkt wird diese Vermutung allerdings durch das Auswertungsergebnis der Osteozyten im beobachteten Knochenanteil.

Aus den vorliegenden Ergebnissen von Osteoblasten und Osteoklasten wurde die Hypothese abgeleitet, dass die durch das Einbringen der Schraube und das Anlegen des Bohrkanals induzierte generelle Frakturheilung schon zu beiden Zeitpunkten abgeschlossen gewesen sein musste und nur noch ein Knochenumbau auf physiologischem Niveau stattfand. Dieser Umbau zeigte sich jedoch nur in relativ schraubenfernen Bereichen. Der fibrocartilaginäre Saum zeigte sich in der Untersuchung davon nicht betroffen. Ein Eindringen von aktiven Knochenzellen in den freiwerdenden Knochenkanal konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden.

Zuletzt wurden zur Beurteilung der Knochenmineralisation auf zellulärer Ebene die Osteozyten im Bereich der eingebrachten Schraube untersucht. Aus Anzahl und Form der beobachteten Zellen konnten Rückschlüsse auf die aktuelle Aktivität und den vorhergegangenen Knochenaufbau gezogen werden. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass bei zunehmender Mineralisation von neuem Knochen auch die Anzahl der Osteozyten steigen müsste.

Dies hätte auf einen Aufbau von Knochen während dieses Prozesses hingedeutet, da Osteozyten eingeschlossene Osteoblasten der Mineralisationsfront darstellen. In den Ergebnissen der hier gezeigten Studie fehlt dieser erwartete Zuwachs an aktiven Osteozyten. Aus den Versuchsergebnissen lässt sich nur ein minimaler Trend erkennen - ein signifikanter Unterschied von Anzahl oder Form der Osteozyten zwischen 6 Wochen und 52 Wochen ließ sich allerdings nicht feststellen. Diese Tatsache kann so gedeutet werden, dass sich nach 52 Wochen Integrationszeit nur wenig neuer, gesunder Knochen durch primäre Ossifikation im unmittelbaren Grenzbereich der Schraube gebildet hat.

6.4 Weiterhin anhaltender Heilungsprozess nach 52 Wochen

Wie schon beschrieben erfolgte die Beobachtung der Angiogenese und Gefäßmorphologie mittels der ASMA-Färbung zur Beurteilung des Heilungsprozesses. Die Neubildung von Gefäßen ist eine essentielle Komponente bei der Wundheilung, Entzündungsreaktionen und beim Aufbau sowie Reparationen des Knochengewebes [17, 75, 80]. Sie dient zur späteren Versorgung der Gewebeanteile mit Nährstoffen und sorgt für die Migration von Zellen wie z. B. Makrophagen und anderen Monozyten [60]. Normalerweise verläuft die Neoangiogenese, egal ob bei physiologischer Wundheilung oder bei Entzündungsreaktionen, nach dem gleichen Prinzip. Aus dem Wundgebiet angrenzenden Gefäßen und Kapillaren bilden sich zuerst Gefäßsprossen aus, welche sich durch Schleifenbildung und weitere Reifung zu neuen Kapillargefäßen entwickeln und damit die Blutversorgung des Wundgebiets garantieren [75, 80]. Mit fortschreitender Wundheilung bilden sich die unregelmäßig ausgebildeten Gefäße und Aussprossungen weitestgehend zurück und es verbleiben wenige reife Gefäße im Gewebe [60]. Diese Gefäßregression ist ein zentraler Schritt der Wundheilung und Ausreifung des adulten Gewebes in dieser Region, da mit dem Rückgang der Neokapillaren auch weniger Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden, die chronische Entzündungsreaktionen oder überschießende Bindegewebsformationen begünstigen [60, 75, 80].

In den Versuchen dieser Studie zeigte sich im Verlauf der 52 Wochen und im Vergleich zum Zeitpunkt von 6 Wochen eine stetige Zunahme der Gefäßanzahl in den untersuchten Präparaten. Eine Regression in der Angiogenese konnte somit nicht festgestellt werden, auch wenn sich die Flächen der Lumen im Verhältnis zur Muskulatur zunahmten, was als fortschreitende Ausreifung der Gefäße gedeutet werden kann.

Es wurden ebenfalls die Gefäßmorphologien betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass die rund und elliptisch geformten Gefäße, welche für ausgereifte Kapillaren und Arteriolen stehen, am häufigsten vertreten waren. Aber auch die irregulär geformten Gefäße nahmen in ihrer Anzahl nach den 6 Wochen weiterhin zu. Diese irregulären Strukturen stehen für die neu aussprossenden Gefäßknospen während der Neovaskularisation. Ihre Persistenz in den Präparaten auch nach 52 Wochen wird somit als ein Hinweis dafür gewertet, dass die Vaskularisation im umliegenden Gewebe der Schraube zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war.

Fehlende Gefäßverminderung und Fortbestehen der Neoangiogenese zeigen also, dass auch nach 52 Wochen die Heilungsprozesse rund um das Fremdmaterial nicht abgeschlossen sind. In der Studie des Schraubenherstellers wird beschrieben, dass kein inflammatorisches Gewebe im Bereich der Schraube identifiziert werden konnte. Die histologische Auswertung erfolgte in diesem Fall aber allein durch eine HE-Färbung und stellt deren Aussagekraft in Frage [3]. Ob die hier vorliegende und beschriebene Reaktion nur eine verlängerte Wundheilung ist oder ob es sich um eine chronisch-entzündliche Reaktion aufgrund des Fremdmaterials handelt kann nicht beurteilt werden, da eine weitere histomorphologische Untersuchung der zellulären Anteile dieser Bereiche nicht stattgefunden hat.

6.5 Allgemeine Bewertung

In der Gesamtzusammenschau der hier vorgestellten Ergebnisse lassen sich die zu Beginn aufgestellten Arbeitshypothesen weitestgehend beantworten. Wie in den Untersuchungen dargestellt, zeigte die verwendete Schraube zwar ansatzweise Degradationserscheinungen, war aber in jedem Präparat deutlich erkennbar. Mit einer vollständigen Auflösung der Schraube ist somit in keinem Fall vor 52 Wochen zu rechnen, setzt man eine Übertragbarkeit der Versuche auf den Menschen voraus. In Anbetracht der Studienlage muss dafür also mit einem wesentlich längeren Zeitraum gerechnet werden. Auch die beobachteten Gewebeprozesse und zellulären Aktivitäten zeigten zwischen den beiden Beobachtungszeitpunkten kaum Unterschiede.

Dieses Ergebnis legt nun nahe, dass die Einheilung der eingebrachten Schraube entweder nach 6 Wochen komplett abgeschlossen war, da sich keine signifikanten Veränderungen des Knochenbaus mehr beobachten ließen, oder dass der Heilungsprozess noch weit über 6 bzw. 52 Wochen hinaus nicht vollendet war. Letzteres wird durch die Ergebnisse der ASMA-Färbung untermauert. Diese zeigten signifikante Unterschiede in Anzahl und Morphologie der betrachteten Gefäße zwischen den beiden Messpunkten. Die Tatsache, dass keine Rückbildung der Gefäße stattfand und auch die unregelmäßigen Gefäße in der Menge zunahmen, spricht für eine weitgehend unregulierte und stetig ablaufende Neoangiogenese, wie sie bei entzündlichen Fremdkörperreaktionen und fortlaufenden Heilungs- und Umbauprozessen zu beobachten ist [17, 75, 82]. Dieses Resultat unterstützt wiederum die Annahme, dass der Heilungsprozess in der unmittelbaren Peripherie der Schraube verlangsamt abläuft und es ggf. zu einer chronisch-entzündlichen Gewebsreaktion in diesem Bereich kommt. Um dies zu bestätigen, könnte in weiteren Studien eine genauere Betrachtung der Gewebs- und Entzündungszellen um das Fremdmaterial neue Erkenntnisse bringen. Insgesamt deuten die vorliegenden Studienergebnisse darauf hin, dass auch nach 52 Wochen die endgültige Einheilung der Biokomposit-Schraube noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Auch wenn in klinischen Studien die Anzahl der dokumentierten Fremdkörperreaktionen gering ausfällt [14] und auch die biologische Verträglichkeit gut erscheint, könnte dieser nur langsam fortschreitende Einheilungsprozess von Fremdmaterial zu späten Komplikationen führen. In mehreren Studie von Böstman et al. wurde bereits beschrieben, dass vor allem bei Verwendung von bioresorbierbaren Polymeren die Gefahr einer späten Fremdkörperreaktion besteht [13, 14]. Solch eine spät auftretende Reaktion kann dann letztlich zu einer Instabilität des Transplantates führen. Unter Betrachtung der hier vorgelegten Ergebnisse sollte bei der Planung zukünftiger Studien auch vermehrt die Untersuchung der Langzeitergebnisse im Fokus stehen. Hierzu ist eine Anpassung des Versuchsmodells nötig, das langfristige Untersuchungen nicht nur durch Bildgebung, sondern auch durch histologische Methoden ermöglicht.

Seit Einführung von bioresorbierbaren Materialien und deren Verwendung im Bereich der VKB-Rekonstruktion haben sich negative Eigenschaften wie z. B. der lange Zerfall und mangelnde Stabilität durch Weiterentwicklung von Material und Technik deutlich reduzieren lassen.

Durch die vorgelegte Studie konnte jedoch aufgezeigt werden, dass trotz der stetigen Weiterentwicklung und auch mit Einführung der Biokomposit-Materialien diese grundsätzlichen Probleme der Polymer-Schrauben bisher nicht endgültig gelöst werden konnten. Zurzeit ist diese Methode der Kreuzbandrekonstruktion jedoch eine der einfachsten und dabei gleichzeitig sichersten Verfahren. Mit Blick auf die zukünftige Forschung könnte sich, neben der Weiterentwicklung alter Verfahren, die Entwicklung komplett neuer Methodiken als zielführend herausstellen. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre der Verzicht auf bioresorbierbare Polymere, die sich, wie hier dargestellt, gegebenenfalls sogar negativ auf die Knochenheilung auswirken und schwer untersuchen sowie entwickeln lassen. In den Anfängen der Entwicklung war es z. B. technisch nicht möglich, Interferenzschrauben rein aus Hydroxylapatit oder Kalziumtriphosphat herzustellen. Die fortschreitende Technik und Entwicklung neuer Verfahren könnte dies heutzutage aber ermöglichen. Eine Möglichkeit dieser neuen Methoden, eine neu designte Schraube rein aus Hydroxylapatit, wird zurzeit durch eine Arbeitsgruppe des Instituts für experimentelle Unfallchirurgie an der Justus-Liebig-Universität Gießen in einer Studie untersucht. Die Veröffentlichung der entsprechenden Ergebnisse steht aber noch aus. Abschließend wird die zukünftige Entwicklung zeigen, ob die Weiterentwicklung einer solchen Interferenzschraube für VKB-Rekonstruktionen deutlichere Vorteile gegenüber den derzeit verwendeten Biokomposit-Schrauben hat, wie beispielsweise eine bessere Stabilität bei gleichzeitig schnellerem Abbau, schnellerer Integration und verbesserter Knochenheilung.

7 Zusammenfassung

Zur Fixierung von Kreuzbandtransplantaten können verschiedene Systeme genutzt werden - eine etablierte Methode ist dabei der Gebrauch von Interferenzschrauben, die heutzutage aus bioresorbierbaren Polymeren bestehen. Die modernsten Schrauben dieser Art werden als Biokomposit-Schrauben bezeichnet und enthalten zusätzlich einen Anteil von Biokeramiken (z. B. HA, TCP).

Die Studie diente zur Untersuchung der Einheilung solcher Biokomposit-Schrauben und mögliche Vor- oder Nachteile zu ergründen. Dazu wurden vordere Kreuzbandpräparate (ACL) von 13 Merinolandschaften betrachtet. Die verwendete Schraube bestand aus einem Gemisch aus 70 % PLDLA und 30 % TCP. Die betrachteten Einheilungszeiten betragen 6 bzw. 52 Wochen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe verschiedener Färbemethoden, um Gewebe, Zellzahlen und -eigenschaften für Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten sowie Angiogenese darzustellen.

Dabei zeigte sich im Allgemeinen eine große Heterogenität der Präparate und kein gutes Auflöseverhalten der Biokomposit-Schraube im betrachteten Zeitraum von 52 Wochen: Abgesehen von einer signifikant gesteigerten Neo-Angiogenese zeigte sich in der Auswertung keine signifikante Remineralisation des Knochens im Vergleich der Zeitpunkte 6 und 52 Wochen.

Zusammengefasst konnte daher durch diese Studie aufgezeigt werden, dass trotz der stetigen Weiterentwicklung und auch mit Einführung der Biokomposit-Materialien das grundsätzliche Problem der Polymer-Schrauben (unzureichender und langwieriger Degradation sowie Einheilung) nicht endgültig gelöst werden kann. Die zukünftige Forschung sollte sich daher, neben der Weiterentwicklung bestehender Materialien, auf die Entwicklung ganz neuer Werkstoffe bzw. Fixierungsverfahren konzentrieren. Des Weiteren sollte das Design zukünftiger Studien dahingehend optimiert werden, dass größere Kohorten und längere Einheilungszeiträume verglichen werden, um die Aussagekraft und klinische Relevanz zu verbessern. Weitere interessante Parameter könnten dabei neben der Angiogenese und Remineralisation auch die Langzeitfolgen, wie z.B. Stabilität und Entstehung von Komplikationen sein.

8 Summary

For surgical reconstruction of the anterior crucial ligament, a huge variety of fixation systems is used with interference screws as the most common ones. These screws are primarily composed of bioresorbable polymers. Most modern screws are so-called biocomposite screws consisting of bioceramics (e.g. HA, TCP) added to the polymers.

The aim of the present study was the detailed analysis of the healing properties of such screws and detection of potential advantages or disadvantages in their use. Here, 13 merino sheep were subjected to ACL-reconstruction at two distinct time points (6 and 52 weeks). The screws being used were composed of 70 % PLDLA and 30 % TCP.

The analysis of the knee tissue was performed using several stainings in order to determine tissue regeneration, cell count and properties of osteoblasts, osteoclasts and osteocytes, as well as angiogenesis, respectively.

In summary, a significant heterogeneity of samples was observed as well as insufficient disintegration of the biocomposite screw during the observation period.

Apart from the detection of a significant increase of angiogenesis, statistical evidence for additional remineralization during the time between 6 and 52 weeks was lacking.

Overall, throughout this study it was shown that despite constant development and the introduction of the biocomposite materials, fundamental drawbacks of the polymer-based screws are not properly addressed.

Therefore, future research should aim at focusing on further developing existing materials, however, development of completely different constituents and methodologies would be an option as well. Furthermore, future studies should be conducted based on optimized study design criteria such as bigger cohorts and longer observation periods to ensure meaningful conclusions and clinical relevance. Besides angiogenesis and remineralization, further relevant parameters should involve long-term consequences such as stability as well as appearance of severe complications.

9 Anhang

9.1 Alkalische Phosphatase (ALP) Färbung

Reagenzien

1. (2-Methoxyethyl)-Acetat (MEA) (Nr. 8.06061, Merck, Darmstadt, Deutschland)
2. Tris-Puffer Stammlösung: 121,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan auf 1 l Aqua dest. = 1 M
3. BCIP/NBT Phosphatase Substrat: fertiges Substrat (Nr. 508108, KPL, MD, USA)
4. Kernechtrot-Aluminiumsulfat: Fertiglösung (Nr. N069.1, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Färbeprotokoll

Entplastinieren der Schnitte in MEA	3 x 10 min
Absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 70%)	je 5 min
Spülen mit Aqua dest.	2 x 5 min
Spülen mit 0,1 M Tris-Puffer, pH 9,4	10 min
Schnitte mit Pap-Pen einkreisen	
Färben mit BCIP/NBT Phosphatase-Substrat in Feuchtkammer bei 37°C	110 min
Spülen mit Aqua dest.	3 x
Gegenfärben mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat	5 min
Spülen mit Aqua dest.	3 x
Aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, 100%)	je 5 min
Fixieren in Xylol	2 x 5 min
Eindecken mit Vitro Clud	

9.2 α -Smooth-Muscle-Actin (ASMA) Färbung

Reagenzien

1. MEA (Nr. 8.06061, Merck, Darmstadt, Deutschland)
2. Tris-NaCl-Puffer (TBS), pH 7,4
3. Tris-EDTA-Puffer, pH 0,9

4. Triton X-100 (Nr. X100, Sigma-Aldrich, MO, USA)
5. Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin (Nr. M0851, Dako, Santa Clara, CA, USA)
6. Antibody Diluent (Nr. S302283, Dako, Santa Clara, CA, USA)
7. Vectastain ABC-AP Kit (Nr. AK-5000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
8. Vector Red Substrat (Nr. SK-5100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
9. BLOXAL Blocking Solution (Nr. SP-6000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
10. Vector Hematoxylin Nuclear Counterstain (Nr. H-3401, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Vorbereitung der Lösungen

1. Tris-NaCl-Puffer (TBS), pH 7,4: 30,29 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan + 43,83 g NaCl in 400 ml Aqua dest. lösen, mit 25 %iger Salzsäure auf pH 7,4 einstellen, Volumen auf 500 ml auffüllen
2. Tris-EDTA-Puffer, pH 0,9: 1,21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan + 0,37 g EDTA in 1000 ml Aqua dest. lösen, mit 1 Trpf. 10N NaOH auf pH 0,9 einstellen
3. Waschpuffer: Tris-NaCl-Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnen + 0,025 % TritonX-100 (250 µl in 1000 ml)
4. Primärer Antikörper, ASMA 1:400: 1 µl Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin + 399 µl Dako Antibody Diluent
5. Sekundärer Antikörper: 2 Trpf. Universalserum + 2 Trpf. Universalantikörper + 5 ml TBS
6. ABC-AP Komplex Vector: 50 µl Reagenz A + 50 µl Reagenz B + 5 ml TBS, 30 min vor Gebrauch ansetzen
7. Vector Red: 5 ml 150 mM Tris-HCl Puffer pH 8,3 + 2 Trpf. Reagenz 1 + 2 Trpf. Reagenz 2 + 2 Trpf. Reagenz 3

Färbeprotokoll

Entplastinieren der Schnitte in MEA	3 x 10 min
Aceton	10 min
35 ml Aceton + 35 ml Waschpuffer	10 min
Waschpuffer	2 x 10 min
Tris/EDTA-Puffer (pH 0,9)	1h bei 60 °C
Schnitte mit Pap-Pen einkreisen	
BLOXAL Blocking Solution	10 min
Waschpuffer	2 x 5 min
Blocken mit Universalsersum (AP-Kit): 1 Trpf. + 5 ml TBS	20 min
Flüssigkeit von Objektträger abklopfen	
Primärer Antikörper ASMA auftragen, bei 4 °C inkubieren	über Nacht
Antikörper entfernen	
Waschpuffer	3 x 5 min
Sekundärer Antikörper auftragen, in Feuchtkammer inkubieren	30 min
Waschpuffer	2 x 5 min
ABC-AP Komplex Vector	30 min
Waschpuffer	2 x 5 min
Aqua dest.	5 min
Vector Red	15 min
Aqua dest.	2 x 5 min

Gegenfärbung	
Spülen mit Leitungswasser	
Hämatoxylin Vector	5 min
Spülen mit Leitungswasser	
2 % Eisessig	10-mal Eintauchen
Bläuen in Ammoniak	1 min
Spülen in Leitungswasser	
Aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, 100%)	je 5 min
Eindecken mit Vitro Clud	

9.3 Movat-Pentachrom-Färbung

Reagenzien

1. MEA (Nr. 8.06061, Merck, Darmstadt, Deutschland)
2. Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung A (Nr. X906, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
3. Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung B (Nr. X907, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
4. Alcian Blau (Nr. 2C-005, Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland)
5. Brilliant Crocein R (Nr. 1B-109, Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland)
6. Säurefuchsin (Nr. 1B-525, Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland)
7. Phosphorwolframsäure (Nr. 1.00583, Merck, Darmstadt, Deutschland)
8. Saffron du Gatinais (Nr. 5A-394, Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland)
9. Ammoniaklösung 32% (Nr. P093.1, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Vorbereitung der Lösungen

1. Alkalisches Ethanol: 20 ml 25 % Ammoniak (Ammonium Hydroxid) + 180 ml 96 % Ethanol, pH >8
2. 25 % Ammoniak = 78 ml Ammoniak + 22 ml Aqua dest.
3. Hämatoxylinlösung A + Hämatoxylinlösung B (Verhältnis 1:1)
4. 5 g Phosphorwolframsäure in 100 ml Aqua dest. lösen
5. Brilliant-Crocein-Säurefuchsin =
 - I. Lösung A= 0,1 g Brilliant Crocein R in 99,5 ml Aqua dest. lösen + 0,5 ml Essigsäure
 - II. Lösung B= 0,1 g Säurefuchsin in 99,5 ml Aqua dest. lösen + 0,5 ml Essigsäure
 - III. Lösung A + Lösung B (Verhältnis 5:1)
6. Saffron du Gatinais: 6 g in 100 ml Ethanol (100 %) lösen, bei 50°C für 48 Stunden inkubieren

Färbeprotokoll

Außer Alcianblau alle Färbelösungen vor Gebrauch filtrieren	
Entplastinieren der Schnitte in MEA	3 x 10 min
Absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 70%)	je 5 min
Aqua dest.	5 min
Alcianblau	10 Min.
Spülen mit Leitungswasser	5 min
Alkalischer Ethanol (unter Abzug)	1 h
Spülen mit Leitungswasser	10 min
Aqua dest.	eintauchen
Weigerts Eisenhämatoxylin A + B (1:1)	10 min
Aqua dest	
Spülen mit Leitungswasser	15 min
Brillant Crocein-Säurefuchsin	12,5 min
0,5% Essigsäure	kurz spülen
5% Phosphorwolframsäure	20 min
0,5% Essigsäure, schütteln	2 min
Ethanol (100%)	3 x 5 min
Saffron du Gatinais	1 h
Ethanol (100%)	3 x spülen
Ethanol (100%)	2 min
Xylol	2 x 5 min
Eindecken mit Depex	

9.4 Silbernitrat**Reagenzien:**

1. MEA (Nr. 8.06061, Merck, Darmstadt, Deutschland)
2. Ameisensäure (Nr. 1.00264, Merck, Darmstadt, Deutschland)
3. Gelatine from bovine skin (Nr. G9391-100G, Sigma-Aldrich, United Kingdom)
4. Silbernitrat (Nr. 31630-100G-R, Sigma-Aldrich, United Kingdom)
5. Natriumthiosulfat-Pentahydrat (Nr.1.06509.0100, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Vorbereiten der Lösung

1. Lösung A: 24,75 ml Aqua bidest + 250 µl Ameisensäure + 0,5 g Gelatine Low Bloom. Bei 37 °C unter ständiger Bewegung lösen. Kühl lagern, vor Gebrauch auf 37 °C erwärmen.
2. Lösung B: 50 % Silbernitrat = 10 g Silbernitrat + 20 ml Aqua bidest

Färbeprotokoll:

Entplastinieren der Schnitte in MEA	3 x 10 min
Absteigende Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %)	je 5 min
Spülen mit Aqua dest	2 x 5 min
Einkreisen mit Pap Pen	
Lösung A+B (Verhältnis 1:2), in Feuchtkammer inkubieren	70 min
Spülen mit Aqua dest.	5 min
Natriumthiosulfat 5 %	10 min
Spülen mit Aqua dest	5 min
Aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %)	je 5 min
Fixieren in Xylol	2 x 5 min
Eindecken mit Vitro Clud	

9.5 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung**Reagenzien**

1. MEA (Nr. 8.06061, Merck, Darmstadt, Deutschland)
2. Natriumacetatpuffer: 0,1 M, pH 5,2 = 8,203 g/l (Merck, Darmstadt, Deutschland)
3. Instant Hämatoxylin (Shandon Inc, PA, USA) 1 + 3 in Bidest
4. TRAP-Färbelösung:
 - I. 35 mg Naphtol-AS-TR-Phosphat (Nr. N6125, Sigma-Aldrich, MO, USA)
 - II. 125 µl N-N-Dimethylformamid (Nr. D-4551, Sigma-Aldrich, MO, USA)
 - III. 57,5 mg Na-Tartrat (Nr. 1.06663.0250, Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - IV. 35 mg Echtrotsalz (Fast Red TR Salt) (Nr. 89453-69-0, Sigma-Aldrich, MO, USA)
 - V. 25 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,2

Färbeprotokoll

Entplastinieren der Schnitte in MEA	3 x 10 min
Absteigende Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %)	je 5 min
Spülen mit Aqua dest.	2 x 5 min
Spülen mit 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,2	10 min
Schnitte mit Pap-Pen einkreisen	
Färben mit TRAP-Färbelösung in Feuchtkammer bei 37 °C	70 min
Spülen mit Aqua dest.	3 x
Gegenfärben mit Instant Hämatoxylin	1 min
Spülen mit Aqua dest.	
Spülen mit Leitungswasser	10 min
Spülen mit Aqua dest.	5 min
Eindecken mit Kaisers Glyceringelantine (Merck, Darmstadt, Deutschland)	

10 Literaturverzeichnis

1. Agrawal CM, Athanasiou KA (1997) Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *J Biomed Mater Res* 38(2):105–114
2. Arendt EA, Agel J, Dick R (1999) Anterior cruciate ligament injury patterns among collegiate men and women. *J Athl Train* 34(2):86–92
3. Arthrex Research and Development (2010) BioComposite Interference Screws. A Stronger Turn in ACL/PCL Reconstruction. <https://www.arthrex.com/resources/white-paper/sjjhzfkEEeCRTQBQVoRH0w/biocomposite-interference-screws-a-stronger-turn-in-acl-pcl-reconstruction>. Zugegriffen: 07. November 2021.
4. Aumüller G, Wurzinger LJ (2010) Anatomie, 2. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
5. Barber FA (1999) Biology and Clinical Experience of Absorbable Materials in ACL Fixation. *Techniques in Orthopaedics* 14(1)
6. Barber FA, Dockery WD (2008) Long-term absorption of beta-tricalcium phosphate poly-L-lactic acid interference screws. *Arthroscopy* 24(4):441–447 doi:10.1016/j.arthro.2007.10.004
7. Barber FA, Dockery WD (2006) Long-term absorption of poly-L-lactic Acid interference screws. *Arthroscopy* 22(8):820–826 doi:10.1016/j.arthro.2006.04.096
8. Barber FA, Hrnack SA (2013) Poly L-lactide co-glycolide/ β -tricalcium phosphate interference screw fixation for bone-patellar tendon bone anterior cruciate ligament reconstruction. *J Knee Surg* 26(6):423–428 doi:10.1055/s-0033-1343614
9. Barber FA, Dockery WD, Hrnack SA (2011) Long-term degradation of a poly-lactide co-glycolide/ β -tricalcium phosphate biocomposite interference screw. *Arthroscopy* 27(5):637–643 doi:10.1016/j.arthro.2010.11.056
10. Barber FA, Spenciner DB, Bhattacharyya S, Miller LE (2017) Biocomposite Implants Composed of Poly(Lactide-co-Glycolide)/ β -Tricalcium Phosphate. Systematic Review of Imaging, Complication, and Performance Outcomes. *Arthroscopy* 33(3):683–689 doi:10.1016/j.arthro.2016.09.032
11. Beynon BD, Johnson RJ, Abate JA, Fleming BC, Nichols CE (2005) Treatment of anterior cruciate ligament injuries, part 2. *Am J Sports Med* 33(11):1751–1767 doi:10.1177/0363546505279922
12. Blindow S, Pulkin M, Koch D, Grathwohl G, Rezwani K (2009) Hydroxyapatite/SiO₂ Composites via Freeze Casting for Bone Tissue Engineering. *Adv. Eng. Mater.* 11(11):875–884 doi:10.1002/adem.200900208
13. Böstman O, Pihlajamäki H (2000) Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation. A review. *Biomaterials* 21(24):2615–2621 doi:10.1016/S0142-9612(00)00129-0
14. Böstman OM, Laitinen OM, Tynnenen O, Salminen ST, Pihlajamäki HK (2005) Tissue restoration after resorption of polyglycolide and poly-lactic acid screws. *J Bone Joint Surg Br* 87(11):1575–1580 doi:10.1302/0301-620X.87B11.16520
15. Bryan JM, Bach BR, Bush-Joseph CA, Fisher IM, Hsu KY (1996) Comparison of "inside-out" and "outside-in" interference screw fixation for anterior cruciate ligament surgery in a bovine knee. *Arthroscopy* 12(1):76–81
16. Buckup K (2005) Klinische Tests an Knochen, Gelenken und Muskeln. Untersuchungen - Zeichen - Phänomene, 3. Aufl. Thieme, Stuttgart
17. Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070):932–936 doi:10.1038/nature04478

18. Chen QZ, Ahmed I, Knowles JC, Nazhat SN, Boccaccini AR, Rezwan K (2008) Collagen release kinetics of surface functionalized 45S5 Bioglass-based porous scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 86(4):987–995 doi:10.1002/jbm.a.31718
19. Chhabra A, Kline AJ, Nilles KM, Harner CD (2006) Tunnel expansion after anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous hamstrings. A comparison of the medial portal and transtibial techniques. *Arthroscopy* 22(10):1107–1112 doi:10.1016/j.arthro.2006.05.019
20. Chiras DD (2013) Human body systems. Structure, function, and environment, 2. Aufl. Jones & Bartlett Learning, Burlington, MA
21. Cho KO (1975) Reconstruction of the anterior cruciate ligament by semitendinosus tenodesis. *J Bone Joint Surg Am* 57(5):608–612
22. Cochrane JL, Lloyd DG, Butfield A, Seward H, McGivern J (2007) Characteristics of anterior cruciate ligament injuries in Australian football. *J Sci Med Sport* 10(2):96–104 doi:10.1016/j.jsams.2006.05.015
23. Dave LYH, Leong OK, Karim SA, Chong CH (2014) Tunnel enlargement 5 years after anterior cruciate ligament reconstruction. A radiographic and functional evaluation. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 24(2):217–223 doi:10.1007/s00590-013-1175-4
24. Drenckhahn D (Hrsg) (2008) Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem, 17. Aufl. Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 1. Elsevier, München
25. Foldager C, Jakobsen BW, Lund B, Christiansen SE, Kashi L, Mikkelsen LR, Lind M (2010) Tibial tunnel widening after bioresorbable poly-lactide calcium carbonate interference screw usage in ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18(1):79–84 doi:10.1007/s00167-009-0865-2
26. Frank CB, Jackson DW (1997) The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 79(10):1556–1576
27. Geiger EV, Laurer HL, Jakob H, Frank JM, Marzi I (2013) Behandlungskosten in der Kreuzbandchirurgie: Therapiebezogene Kostenträgerrechnung an einem Universitätsklinikum. *Unfallchirurg* 116(6):517–523 doi:10.1007/s00113-011-2114-7
28. Graf B, Uhr F (1988) Complications of intra-articular anterior cruciate reconstruction. *Clin Sports Med* 7(4):835–848
29. Graf BK, Ott JW, Lange RH, Keene JS (1994) Risk factors for restricted motion after anterior cruciate reconstruction. *Orthopedics* 17(10):909–912
30. Hall MP, Hergan DM, Sherman OH (2009) Early fracture of a bioabsorbable tibial interference screw after ACL reconstruction with subsequent chondral injury. *Orthopedics* 32(3):208
31. Harvey A, Thomas NP, Amis AA (2005) Fixation of the graft in reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Br* 87(5):593–603 doi:10.1302/0301-620X.87B5.15803
32. Herrera A, Martínez F, Iglesias D, Cegoñino J, Ibarz E, Gracia L (2010) Fixation strength of biocomposite wedge interference screw in ACL reconstruction. Effect of screw length and tunnel/screw ratio. A controlled laboratory study. *BMC Musculoskelet Disord* 11:139. doi:10.1186/1471-2474-11-139
33. Hosseini A, Gill TJ, Li G (2009) In vivo anterior cruciate ligament elongation in response to axial tibial loads. *J Orthop Sci* 14(3):298–306 doi:10.1007/s00776-009-1325-z

34. Hughes G, Watkins J (2006) A risk-factor model for anterior cruciate ligament injury. *Sports Med* 36(5):411–428
35. Hunt P, Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A (2005) A model of soft-tissue graft anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 125(4):238–248 doi:10.1007/s00402-004-0643-z
36. Hunt JA, Callaghan JT (2008) Polymer-hydroxyapatite composite versus polymer interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction in a large animal model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16(7):655–660 doi:10.1007/s00167-008-0528-8
37. Ikada Y, Tsuji H (2000) Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.* 21(3):117–132 doi:10.1002/(SICI)1521-3927(20000201)21:3<117::AID-MARC117>3.0.CO;2-X
38. Jackson DW, Schaefer RK (1990) Cyclops syndrome. Loss of extension following intra-articular anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 6(3):171–178
39. Kaeding C, Farr J, Kavanaugh T, Pedroza A (2005) A prospective randomized comparison of bioabsorbable and titanium anterior cruciate ligament interference screws. *Arthroscopy* 21(2):147–151 doi:10.1016/j.arthro.2004.09.012
40. Karlsson J, Irrgang JJ, van Eck CF, Samuelsson K, Mejia HA, Fu FH (2011) Anatomic single- and double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction, part 2. Clinical application of surgical technique. *Am J Sports Med* 39(9):2016–2026 doi:10.1177/0363546511402660
41. Katz JW, Fingerhuth RJ (1986) The diagnostic accuracy of ruptures of the anterior cruciate ligament comparing the Lachman test, the anterior drawer sign, and the pivot shift test in acute and chronic knee injuries. *Am J Sports Med* 14(1):88–91 doi:10.1177/036354658601400115
42. Kokubo T (Hrsg) (2008) Bioceramics and their clinical applications. Woodhead Publishing in materials. Woodhead Pub. and Maney Pub. on behalf of Institute of Materials Minerals & Mining, Cambridge, England, Boca Raton
43. Kulkarni RK (1966) Polylactic Acid for Surgical Implants. *Arch Surg* 93(5):839 doi:10.1001/archsurg.1966.01330050143023
44. Kulkova J, Moritz N, Suokas EO, Strandberg N, Leino KA, Laitio TT, Aro HT (2014) Osteointegration of PLGA implants with nanostructured or micro-sized β -TCP particles in a minipig model. *J Mech Behav Biomed Mater* 40:190–200 doi:10.1016/j.jmbbm.2014.08.028
45. Lang G (2006) *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer, Wien u. a.
46. Leitlinienkommission der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V. (aktueller Stand: 2014) S1-Leitlinie 012/005: Vordere Kreuzbandruptur. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/012-0051_S1_Vordere_Kreuzbandruptur_2014-06_01.pdf. Zugegriffen: 16. August 2018
47. Lind M, Menhert F, Pedersen AB (2012) Incidence and outcome after revision anterior cruciate ligament reconstruction. Results from the Danish registry for knee ligament reconstructions. *Am J Sports Med* 40(7):1551–1557 doi:10.1177/0363546512446000
48. Lohmander LS, Englund PM, Dahl LL, Roos EM (2007) The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries. Osteoarthritis. *Am J Sports Med* 35(10):1756–1769 doi:10.1177/0363546507307396
49. Lubowitz JH, Bernardini BJ, Reid JB (2008) Current concepts review. Comprehensive physical examination for instability of the knee. *Am J Sports Med* 36(3):577–594 doi:10.1177/0363546507312641

50. Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie, 3. Aufl. Thieme, Stuttgart
51. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F (2012) Taschenlehrbuch Histologie, 4. Aufl. G. Thieme, Stuttgart
52. Martinek V, Friederich NF (1999) Tibial and Pretibial Cyst Formation After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction With Bioabsorbable Interference Screw Fixation. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 15(3):317–320 doi:10.1016/S0749-8063(99)70042-3
53. Martinek V, Seil R, Lattermann C, Watkins SC, Fu FH (2001) The fate of the poly-L-lactic acid interference screw after anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 17(1):73–76 doi:10.1053/jars.2001.7797
54. Matthews LS, Soffer SR (1989) Pitfalls in the use of interference screws for anterior cruciate ligament reconstruction. Brief report. *Arthroscopy* 5(3):225–226
55. Mohtadi NG, Webster-Bogaert S, Fowler PJ (1991) Limitation of motion following anterior cruciate ligament reconstruction. A case-control study. *Am J Sports Med* 19(6):620-4; discussion 624-5 doi:10.1177/036354659101900612
56. Mouzopoulos G, Fotopoulos VC, Tzurbakis M (2009) Septic knee arthritis following ACL reconstruction. A systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17(9):1033–1042 doi:10.1007/s00167-009-0793-1
57. Noyes FR, Butler DL, Grood ES, Zernicke RF, Hefzy MS (1984) Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. *J Bone Joint Surg Am* 66(3):344–352
58. Päiväranta U, Böstman O, Majola A, Toivonen T, Törmälä P, Rokkanen P (1993) Intraosseous cellular response to biodegradable fracture fixation screws made of polyglycolide or polylactide. *Arch Orthop Trauma Surg* 112(2):71–74 doi:10.1007/BF00420258
59. Pihlajamäki H, Böstman O, Tynnininen O, Laitinen O (2006) Long-term tissue response to bioabsorbable poly-L-lactide and metallic screws. An experimental study. *Bone* 39(4):932–937 doi:10.1016/j.bone.2006.04.009
60. Pober JS, Sessa WC (2015) Inflammation and the Blood Microvascular System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(1):a016345 doi:10.1101/cshperspect.a016345
61. Quatman CE, Paterno MV, Wordeman SC, Kaeding CC (2011) Longitudinal anterior knee laxity related to substantial tibial tunnel enlargement after anterior cruciate ligament revision. *Arthroscopy* 27(8):1160–1163 doi:10.1016/j.arthro.2011.02.039.
62. Schneider O, Scharf H-P, Stein T, Knapstein S, Hermann C, Flechtenmacher J (2016) Inzidenz von Kniegelenkverletzungen. Zahlen für die ambulante und stationäre Versorgung in Deutschland. *Der Orthopäde* 45(12):1015–1026 doi:10.1007/s00132-016-3301-6
63. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2011) Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 182 Tabellen, 3. Aufl. Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll und Karl Wesker. Thieme, Stuttgart
64. Scranton PE, Lanzer WL, Ferguson MS, Kirkman TR, Pflaster DS (1998) Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. *Arthroscopy* 14(7):702–716
65. Sharma V, Curtis C, Micheli L (2008) Extra-articular extraosseous migration of a bioabsorbable femoral interference screw after ACL reconstruction. *Orthopedics* 31(10)
66. Shelbourne KD, Wilckens JH, Mollabashy A, DeCarlo M (1991) Arthrofibrosis in acute anterior cruciate ligament reconstruction. The effect of timing of reconstruction

- and rehabilitation. *Am J Sports Med* 19(4):332–336 doi:10.1177/036354659101900402
67. Shin CS, Chaudhari AM, Andriacchi TP (2011) Valgus plus internal rotation moments increase anterior cruciate ligament strain more than either alone. *Med Sci Sports Exerc* 43(8):1484–1491 doi:10.1249/MSS.0b013e31820f8395
68. Siebold R, Dejour D, Zaffagnini S (2014) *Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*. Springer, Berlin, Heidelberg
69. Siewert JR, Brauer RB (2010) *Basiswissen Chirurgie, 2. Aufl. Springer-Lehrbuch*. Springer, Berlin, Heidelberg
70. Singh N (2018) International Epidemiology of Anterior Cruciate Ligament Injuries. *OPROJ* 1(5) doi:10.31031/OPROJ.2018.01.000525
71. Spindler KP, Wright RW (2008) Clinical practice. Anterior cruciate ligament tear. *N Engl J Med* 359(20):2135–2142. doi:10.1056/NEJMc0804745
72. Stähelin AC, Weiler A, Rüfenacht H, Hoffmann R, Geissmann A, Feinstein R (1997) Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws. A report of six cases. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 13(2):238–244 doi:10.1016/S0749-8063(97)90162-6
73. Stener S, Ejerhed L, Sernert N, Laxdal G, Rostgård-Christensen L, Kartus J (2010) A long-term, prospective, randomized study comparing biodegradable and metal interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction surgery. Radiographic results and clinical outcome. *Am J Sports Med* 38(8):1598–1605 doi:10.1177/0363546510361952
74. Strobel M (1998) *Arthroskopische Chirurgie*. Springer, Berlin, Heidelberg
75. Szekanecz Z, Koch AE (2007) Mechanisms of Disease. Angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 3(11):635–643 doi:10.1038/nprheum0647
76. Tapper JE, Fukushima S, Azuma H, Thornton GM, Ronsky JL, Shrive NG, Frank CB (2006) Dynamic in vivo kinematics of the intact ovine stifle joint. *J Orthop Res* 24(4):782–792 doi:10.1002/jor.20051
77. Tashiro T, Kurosawa H, Kawakami A, Hikita A, Fukui N (2003) Influence of medial hamstring tendon harvest on knee flexor strength after anterior cruciate ligament reconstruction. A detailed evaluation with comparison of single- and double-tendon harvest. *Am J Sports Med* 31(4):522–529 doi:10.1177/03635465030310040801
78. Tecklenburg K, Burkart P, Hoser C, Rieger M, Fink C (2006) Prospective evaluation of patellar tendon graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction comparing composite bioabsorbable and allograft interference screws. *Arthroscopy* 22(9):993–999 doi:10.1016/j.arthro.2006.05.010
79. Teske W, Anastasiadis A, Lichtinger T, Schulze Pellengahr C von, Engelhardt LV von, Theodoridis T (2010) Ruptur des vorderen Kreuzbands. Diagnostik und Therapie. *Der Orthopäde* 39(9):883–898 doi:10.1007/s00132-010-1670-9
80. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000) Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 5(1):40–46 doi:10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x
81. Torzewski M (2015) Die Movat-Pentachromfärbung – eine farbenprächtige Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten. *MK* 2(10):204–208 doi:10.5414/MKX0060
82. van Amerongen MJ, Molema G, Plantinga J, Moorlag H, van Luyn MJ (2002) Neovascularization and vascular markers in a foreign body reaction to subcutaneously implanted degradable biomaterial in mice. *Angiogenesis* 5(3):173–180 doi:10.1023/A:1023822504224

83. Vroman I, Tighzert L (2009) Biodegradable Polymers. *Materials* 2(2):307–344 doi:10.3390/ma2020307
84. Warden WH, Friedman R, Teresi LM, Jackson DW (1999) Magnetic Resonance Imaging of Bioabsorbable Polylactic Acid Interference Screws During the First 2 Years After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 15(5):474–480 doi:10.1053/ar.1999.v15.015047
85. Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A, Abel C, Südkamp NP, Hoffmann RF (2002) Tendon healing in a bone tunnel. Part I. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 18(2):113–123 doi:10.1053/jars.2002.30656
86. Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ, Rehm O, Südkamp NP (2002) Tendon healing in a bone tunnel. Part II. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 18(2):124–135 doi:10.1053/jars.2002.30657
87. Welsch U, Deller T (2010) *Lehrbuch Histologie*, 3. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München
88. Wetzler MJ, Getelman MH, Friedman MJ, Bartolozzi AR (1998) Revision anterior cruciate ligamentsurgery. Etiology of failures. *Operative Techniques in Sports Medicine* 6(2):64–70 doi:10.1016/S1060-1872(98)80051-8
89. Wilk KE, Macrina LC, Cain EL, Dugas JR, Andrews JR (2012) Recent advances in the rehabilitation of anterior cruciate ligament injuries. *J Orthop Sports Phys Ther* 42(3):153–171 doi:10.2519/jospt.2012.3741
90. Williams GN, Chmielewski T, Rudolph K, Buchanan TS, Snyder-Mackler L (2001) Dynamic knee stability. Current theory and implications for clinicians and scientists. *J Orthop Sports Phys Ther* 31(10):546–566 doi:10.2519/jospt.2001.31.10.546
91. Witte, Frank, Dr.med., Hort, Norbert, Dr.-Ing., Fröhlich, Bernd, Dipl.-Ing., Voith W, Fischer, Hans Joachim, Dr.-Ing., Wolfstädter, Marco, Dipl.-Ing. (2008) Patent Interferenzschraube (DE102008037202A1 25.02.2010)
92. Xerogeanes JW, Fox RJ, Takeda Y, Kim HS, Ishibashi Y, Carlin GJ, Woo SL (1998) A functional comparison of animal anterior cruciate ligament models to the human anterior cruciate ligament. *Ann Biomed Eng* 26(3):345–352
93. Yasuda K, van Eck CF, Hoshino Y, Fu FH, Tashman S (2011) Anatomic single- and double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction, part 1. Basic science. *Am J Sports Med* 39(8):1789–1799 doi:10.1177/0363546511402659
94. Yoshiya S, Nagano M, Kurosaka M, Muratsu H, Mizuno K (2000) Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* (376):278–286
95. Zantop T, Weimann A, Schmidtko R, Herbort M, Raschke MJ, Petersen W (2006) Graft laceration and pullout strength of soft-tissue anterior cruciate ligament reconstruction. In vitro study comparing titanium, poly-d,l-lactide, and poly-d,l-lactide-tricalcium phosphate screws. *Arthroscopy* 22(11):1204–1210 doi:10.1016/j.arthro.2006.06.015
96. Zelle BA, Lattermann C, Chhabra A, Fu FH, Huard J (2005) Biological considerations of tendon graft incorporation within the bone tunnel. *Operative Techniques in Orthopaedics* 15(1):36–42 doi:10.1053/j.oto.2004.11.014
97. Zilles K, Tillmann B (2010) *Anatomie. Mit 121 Tabellen*. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau des Röhrenknochens (Schema)	5
Abbildung 2: Mikroskopischer Aufbau des Knochens	7
Abbildung 3: Osteoblasten und Osteoid (Schema)	9
Abbildung 4: Funktion eines Osteoklasten (Schema)	11
Abbildung 5: Knochenumbau in der Kompakta (Schema)	13
Abbildung 6: Koordination der Osteoblasten und Osteoklasten (Schema).....	14
Abbildung 7: Knochen und Bänder eines rechten Kniegelenkes	17
Abbildung 8: Unfallmechanismen der VKB-Ruptur	20
Abbildung 9: VKB-Rekonstruktion mit STS-Transplantat (Zeichnung).....	27
Abbildung 10: Studiendesign	38
Abbildung 11: Sehnenentnahme und Aufbereitung	41
Abbildung 12: Kreuzbandrekonstruktion.....	42
Abbildung 13: Prinzip einer immunhistochemischen Färbungen	50
Abbildung 14: Mikro-CT-Aufnahme (6W).....	56
Abbildung 15: Mikro-CT-Aufnahmen (52W).....	57
Abbildung 16: Übersichtsaufnahmen der Movat-Pentachromfärbung in 5-facher Vergrößerung	58
Abbildung 17: „Region of interest“ (ROI)	59
Abbildung 18: Erstellen des „Classifiers“	60
Abbildung 19: Segmentausschnitt der ROI vor und nach der Klassifizierung	60
Abbildung 20: Quantitative Auswertung der Movat-Pentachrom-Färbung.....	62
Abbildung 21: Darstellung der Osteoklasten	63
Abbildung 22: Bestimmung der Osteoklastenlänge und –anzahl	64
Abbildung 23: Quantitative Auswertung der Osteoklastenanzahl	66
Abbildung 24: Vergleich der mittleren Osteoklastenlänge	67
Abbildung 25: Quantitative Auswertung der Osteoklastenlängen.....	67
Abbildung 26: Darstellung der mittleren Osteoklastenlänge	69
Abbildung 27: ALP-Färbung der Osteoblasten.....	73
Abbildung 28: Quantitative Auswertung der ALP-Färbung	73
Abbildung 29: Aufnahmen der ASMA-Färbung	75
Abbildung 30: Auswertung der ASMA-Färbung.....	76
Abbildung 31: Quantitative Auswertung der Gefäßanzahl	78
Abbildung 32: Quantitative Auswertung der Gefäßflächen.....	80
Abbildung 33: Silbernitratfärbung	81
Abbildung 34: Quantitative Auswertung der Osteozytenanzahl.....	84

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten der PMMA-Einbettung	45
Tabelle 2: Mischungsverhältnis der Gebrauchslösungen	46
Tabelle 3: Protokoll der PMMA-Einbettung I	47
Tabelle 4: Protokoll der PMMA-Einbettung II	47
Tabelle 5: Protokoll der PMMA-Einbettung III	47
Tabelle 6: Statistische Ergebnisse der Movat-Pentachrom-Färbung der Gewebeklassen normalisiert auf die ROI	61
Tabelle 7: Statistische Ergebnisse der Movat-Pentachrom-Färbung der Gewebeklassen normalisiert auf die Schraubenfläche	62
Tabelle 8: Ergebnisse der Osteoklastenzahlen zu den Bezugsvariablen	66
Tabelle 9: Mittlere Osteoklastenlänge	68
Tabelle 10: Ergebnisse der Osteoklastenlängen normalisiert auf die Trabekellänge	68
Tabelle 11: Ergebnisse der Osteoklastenlängen normalisiert auf die Trabekelfläche	68
Tabelle 12: Ergebnisse der Osteoklastenlängen normalisiert auf die Schraubenfläche	69
Tabelle 13: Verhältnis der ALP-positiven Fläche (ALP+) zur Bezugsfläche;	74
Tabelle 14: Verhältnis der Gefäßgesamtanzahl zur Bezugsfläche	77
Tabelle 15: Gefäßanzahl pro Gewebefläche aufgeteilt nach ihrer Morphologie	79
Tabelle 16: Verhältnis der Gefäßflächen zur Gewebefläche	79
Tabelle 17: Durchschnittliche Gefäßflächen	80
Tabelle 18: Osteozytenzahlen pro beobachteter Knochenfläche	83
Tabelle 19: Osteozytenzahlen pro beobachteter Schraubenfläche	83

13 Abkürzungsverzeichnis

ACL.....	anterior cruciate ligament	NNM	Neutral-Null-Methode
ALP	Alkalische Phosphatase	OPG.....	Osteoprotegrin
ALP+	ALP-positive Fläche	PDLA	poly-D-lactic acid
ASMA	α -Smooth-Muscle-Actin	PGA.....	polyglycolic acid
ATP	Adenosintriphosphat	pH.....	potentia hydrogenii (Potential des Wasserstoffs)
BCIP	Brom-Chlor-Indolylphosphat	PLA	polylactic acid
BCP	biphasisches Kalziumphosphat	PLDLA.....	poly-L,D-lactic acid
BMP	bone morphogenetic Protein	PLGA	poly-L-glycolic acid
BMU.....	bone multicellular unit	PLLA.....	poly-L-lactic acid
BTB	Bone-Tendon-Bone	PMMA	Polymethylmethacrylat
bzw.	beziehungsweise	PTH	Parathormon
ca.	circa	RANK	receptor activator of Nuclear Factor- κ B
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Trikalziumphosphat (chemische Formel)	RANK-L.....	RANK-Ligand
Ca ₅ [OH(PO ₄) ₃]	Hydroxylapatit (chemische Formel)	ROI.....	Region of Interest
CT.....	Computertomographie	ROM.....	Range of Motion
dest.	destilliert	STS.....	Semitendinosussehne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tab.	Tabelle
ER.....	endoplasmatisches Retikulum	TBS	Tris-NaCl-Puffer
EZM	Extrazellulärmatrix	TCP	Trikalziumphosphat
HA	Hydroxylapatit	TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
MEA	(2-Methoxyethyl)-Acetat	Trpf.....	Tropfen
MRT	Magnetresonanztomographie	VKB	vorderes Kreuzband
MSCF	macrophage colony-stimulating factor	W.....	Wochen
NBT.....	Nitroblautetrazoliumchlorid	β -TCP	β -Trikalziumphosphat

Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zu allererst gilt mein Dank meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß. Ich danke Ihm für die mir gegebene Möglichkeit, dass ich diese Promotionsarbeit in der Forschungsgruppe und dem Labor der unfallchirurgischen Klinik der Universität Gießen durchführen konnte.

Ebenso geht mein besonderer Dank an dieser Stelle auch an PD. Dr. Thaqif El Khassawna für die intensive Betreuung, Beratung und Unterstützung während der Zeit der praktischen Versuche und auch weit darüber hinaus. Er hat mir zu Beginn zunächst geholfen, einen Ein- und Überblick für das Thema zu gewinnen. Während der Versuche stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hat mir geholfen, wenn ich vielleicht gerade nicht mehr weiterwusste oder gezweifelt habe.

Ein weiteres, riesiges Dankeschön geht an alle Mitarbeitenden in der Arbeitsgruppe, die mich auf unterschiedlichste Art und Weise auf diesem Weg begleitet und mir geholfen haben. Vor allem Annette und Ida kann ich nicht genug dafür danken, dass sie mich bei der praktischen Durchführung der Versuche, den entsprechenden Verfahren sowie dem Umgang mit den Geräten und den Färbungen, so tatkräftig unterstützt haben. Ohne sie wären diese Versuche wahrscheinlich gar nicht möglich gewesen.

Die namentliche Nennung aller Personen, die an dieser Arbeit beteiligt waren und sie damit eigentlich erst ermöglicht haben, würde vermutlich den Rahmen sprengen und gar nicht zu erfassen sein. Denjenigen Personen, die ich nicht persönlich kennengelernt habe, aber ein großer Bestandteil dieses Projekts waren oder sind, wie z.B. die Teams rund um die Planung, Vorbereitung und die Operationen, sei an dieser Stelle gedankt.

Zuletzt geht der größte Dank an die Personen die mich auch im privaten Umfeld auf diesem Weg begleitet haben. An alle meine Freunde für die willkommenen Ablenkungen, wenn diese nötig waren. Im ganz besonderen aber natürlich an meine Familie und an meine Freundin. Sie haben mir zu allen Zeiten zur Seite gestanden und mich immer wieder motiviert und vorangetrieben (ab und zu auch mit für mich eher unangenehmen Fragen). Sie haben mich stets „auf Kurs“ gehalten und sie waren der Grund, warum diese Arbeit überhaupt fertig geworden ist. Alle Worte die mir dazu einfallen reichen nicht aus, um meine Dankbarkeit an alle auszudrücken!