

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(komm. Direktor: PD Dr. med. D. Wohlrab)

**Ossäres und intraartikuläres Heilverhalten zweier  
verschiedener mittels  $\beta$ -TCP „press fit“ fixierter  
Kreuzbandplastiken in einer Schafstudie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
von  
Franz Otto Fraedrich  
geboren am 02.03.1980 in Halle/Saale

Betreuer: PD Dr. med. H. Mayr  
PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. A. Bernstein

Gutachter : 1. PD Dr. med. H. Mayr, München und Universität Freiburg  
2. Prof. Dr. med. habil. Andreas Nerlich, Universität München  
3. PD Dr. med. Thore Zantop, Universität Münster

Tag der öffentlichen Verteidigung: 13.01.2011

Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet

## **Referat**

Im Lauf der Geschichte der Kreuzbandchirurgie wurden bereits viele Methoden und Techniken bezüglich der Wahl der Sehnentransplantate und deren knöcherner Fixierung untersucht und diskutiert. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob eine primär belastungsstabile „press fit“-Fixierung zweier verschiedener Bandplastiken (Patellasehne und Flexorsehne) mittels eines Passzylinders ( $\varnothing = 7 \text{ mm}$ ; Länge = 25 mm) aus mikroporösem ( $5 \mu\text{m}$ ), interkonnektierendem  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) möglich ist. Die fixierten Bandplastiken wurden histologisch auf Unterschiede im Einheilverhalten und der Langzeitprognose untersucht.

Für drei postoperative Standzeiten (6, 12, und 24 Wochen) wurde an jeweils 14 randomisiert zugeteilten Schafen ein Kreuzbandersatz durchgeführt. Für jeden Standzeitraum erhielten jeweils 7 Schafe ein mit einem Knochenblock versehenes Patellasehnentransplantat und 7 Schafe ein synovialisiertes Sehnentransplantat des Musculus flexorum digitorum superficialis (Flexorsehne). Nach der jeweiligen Standzeit erfolgte die vergleichende histologische und histomorphometrische Auswertung der Gewebestrukturen beider Transplantate im Umfeld des mittleren Implantatdrittels und eine histologische Untersuchung der Bandplastik intraartikulär. Ein weiterer Inhalt der Studie bestand darin, die Eignung des verwendeten Werkstoffs für den Knochenersatz unter Berücksichtigung seines Degradationsverhaltens und den zellulären Reaktionen im umliegenden Gewebe zu untersuchen. Hierfür wurde jeweils 7 Schafen pro Standzeit in den medialen Femurkondylus ein zusätzliches  $\beta$ -TCP-Implantat ossär implantiert. Die histologische und histomorphometrische Auswertung des  $\beta$ -TCPs als Knochenersatzwerkstoff war mit der des  $\beta$ -TCPs zur „press-fit“-Fixierung identisch.

Die Wahl des autologen Transplantates erscheint für das 24-Wochen-Ergebnis in der durchgeführten Studie unerheblich, da sowohl die synovialisierte Flexorsehne als auch die mit Knochenblock versehene Patellasehne im zeitlichen Verlauf primär ossär und fibrös über Sharpey-artige Fasern integriert wurden. Das Patellasehnentransplantat zeigte lediglich ein zeitlich schnelleres Integrations-, Umbau- und Remodellingverhalten als das Flexorsehnen-transplantat. Der Werkstoff mikroporöses  $\beta$ -TCP zeigte in diesem Versuch osteokonduktive Eigenschaften, Resorbierbarkeit und knöcherne Ersetzbarkeit. Sowohl der Integrations- und Umbauprozess der Transplantate als auch die Biodegradation des  $\beta$ -TCP waren nach Ablauf der 24 Wochen Standzeit noch nicht abgeschlossen.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass das verwendete mikroporöse, interkonnektierende  $\beta$ -TCP-Implantat als Knochenersatzwerkstoff und für die „press fit“-Fixierung sowohl von synovialisierten Flexorsehnen als auch von mit Knochenblock versehenen Patellasehnen für die vordere Kreuzbandplastik geeignet ist.

Fraedrich, Franz: Ossäres und intraartikuläres Heilverhalten zweier verschiedener mittels  $\beta$ -TCP „press fit“ fixierter Kreuzbandplastiken in einer Schafstudie. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2010

## **Inhaltsverzeichnis**

		<b>Seite</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie und Ätiologie der vorderen Kreuzbandruptur	1
1.2	Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes	1
1.3	Diagnostik der vorderen Kreuzbandruptur	2
1.4	Historie der Kreuzbandchirurgie	3
1.5	Fixierung der vorderen Kreuzbandplastik	4
1.6	Grundlagen zum Knochenersatz	5
1.7	Tricalciumphosphate	7
1.8	Biodegradation	7
1.9	Schlussfolgerung und Fragestellung für die Studie	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Tierversuch	9
2.1.1	Versuchstiere	9
2.1.2	Versuchsgruppen und Randomisierung	9
2.1.3	Haltung und Fütterung	10
2.1.4	Materialspezifikation des Implantates	11
2.2	Präoperative Versorgung	11
2.2.1	Narkose und Medikation	11
2.2.2	Lagerung und Operationseinleitung	12
2.3	Operation	12
2.3.1	Entnahme des Flexorsehnentransplantates	12
2.3.2	Entnahme des Patellasehnentransplantates	13
2.3.3	Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mittels „press fit“-Transplantatfixierung	14
2.3.4	β-TCP-Implantat für die Beurteilung von „β-TCP als Knochenersatzstoff“	16
2.3.5	Postoperative Betreuung	16
2.3.6	Fluoreszenzmarkierung	16
2.4	Tötung der Versuchstiere und Präparation des Kniegelenkes	17
2.5	Biomechanische Untersuchung	17
2.6	Herstellung der histologischen Präparate	17
2.6.1	Kreuzbandpräparate	17
2.6.2	Fixierung der β-TCP- Präparate	18
2.6.3	Entkalkung der β-TCP- Präparate	18
2.6.4	Paraffineinbettung	19

2.6.5	Schneiden der der $\beta$ -TCP- Präparate für die Histologie	19
2.6.6	Immunhistologie der $\beta$ -TCP- Präparate	20
2.6.7	Dünnschliffpräparate für Histologie und Histomorphometrie	20
2.7	Quantitative und qualitative Auswertung der histologischen Präparate	22
2.7.1	Band-Score	22
2.7.2	Histologie-Score	24
2.7.3	Zell-Score	25
2.7.4	Histomorphometrie	25
2.8	Statistik	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Mikroskopische Auswertung der intraartikulären Kreuzbandpräparate	28
3.1.1	Standzeit 6 Wochen	29
3.1.2	Standzeit 12 Wochen	29
3.1.3	Standzeit 24 Wochen	28
3.2	Visuelle, makroskopische Vorbetrachtung der Präparate im zeitlichen Verlauf	31
3.2.1	Makroskopische Beurteilung der ROI Knochen/Implantat	31
3.2.2	Makroskopische Beurteilung der ROI Knochen/Sehne	31
3.2.3	Makroskopische Beurteilung der ROI Sehne/Implantat	33
3.2.4	Makroskopische Beurteilung des „ $\beta$ -TCPs als Knochenersatzstoff“	33
3.3	Mikroradiographie	33
3.4	Histologische Auswertung der $\beta$ -TCP- Präparate (Histologie-Score)	34
3.4.1	Histologische Auswertung der ROI Knochen/Implantat	34
3.4.2	Histologische Auswertung der ROI Knochen/Sehne	38
3.4.3	Histologische Auswertung der ROI Sehne/Implantat	42
3.4.4	Histologische Auswertung „ $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung“ vs. „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“	43
3.5	Histologische Quantifizierung der Zellqualitäten innerhalb der „press fit“-Präparate (Zell-Score)	46
3.5.1	Zell-Score der ROI Knochen/Implantat	46
3.5.2	Zell-Score der ROI Knochen/Sehne	47
3.5.3	Zell-Score der ROI Sehne/Implantat	48
3.5.4	Zell-Score „ $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung“ vs. „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“	49
3.6	Auswertung der immunhistochemisch gefärbten $\beta$ -TCP- Präparate	50
3.7	Auswertung der fluoreszenzmarkierten Dünnschliffpräparate	51
3.8	Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen	52

3.9	Auswertung der Histomorphometrie	53
3.9.1	Histomorphometrische Auswertung der ROI Knochen/Implantat	53
3.9.2	Histomorphometrische Auswertung der ROI Knochen/Sehne	54
3.9.3	Histomorphometrische Auswertung der ROI Sehne/Implantat	54
3.9.4	Histomorphometrische Auswertung „ $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung“ vs. „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“	54
3.10	Resorption des $\beta$ -TCPs	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Methodenkritik	57
4.2	Diskussion der histologischen Ergebnisse	58
4.2.1	Einheilvorgänge des $\beta$ -TCPs	58
4.2.2	Einheilvorgänge der Sehnentransplantate	62
4.2.3	Schlussfolgerung	67
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>78</b>

## **Abkürzungen und Symbole**

®	lizensierter Name
Ø	Durchmesser
°	Grad
%	Prozent
±	Standardabweichung
α	alpha
α-TCP	alpha-Tricalciumphosphat
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
β	beta
β -TCP	beta-Tricalciumphosphat
BMP	bone morphologic protein
Ca	Calcium
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energy-Dispersive X-ray
ESEM	Enviromental Scanning Electron Microscope
Flexorsehne	Sehne des Musculus flexor digitorum superficialis
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämalaun-Eosin
IE	Internationale Einheiten
IGF	insulinlike growth factor
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
ME	Megaeinheiten
Midvastus	Musculus vastus medialis
min	Minute
ml	Milliliter
MLU	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
n. s.	nicht signifikant
Os%	prozentualer Anteil des mineralisierten Knochengewebes
Osteoid%	Prozentualer Anteil des Osteoids am mineralisierten Knochengewebe
p	p-Wert
PDLLA	Poly-D, L-Lactide Acid
PGLA	Polyglycolic Acid
PLLA	Poly-L-Lactide Acid
PLLA/HA	Poly-L-Lactide Acid/Hydroxylapatit
PLLA/TCP	Poly-L-Lactide Acid/Tricalciumphosphat
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGB	red green blue (rot grün blau) Echtfarbenmodus
ROI	region of interest
RTX	real-time X-radiography
s.o.	siehe oben
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Tab.	Tabelle
TCP/Os	Verhältnis von Tricalciumphosphat zu mineralisiertem Knochengewebe
TCP%	Prozentualer Tricalciumphosphat-Anteil
TGF- $\beta$	tissue growth factor - beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor – alpha
TNF- $\beta$	Tumornekrosefaktor – beta
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
U/min	Umdrehung pro Minute
vgl.	vergleiche
Vit.	Vitamin
Mm	Mikrometer
z. B.	zum Beispiel

## **1 Einleitung**

### **1.1 Epidemiologie und Ätiologie der vorderen Kreuzbandruptur**

Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes ist eine häufige Sportverletzung der modernen Zeit. In den „Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Orthopäden und Orthopädische Chirurgie und des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie“ sind die frische und die alte vordere Kreuzbandruptur wie folgt definiert:

„Eine frische vordere Kreuzbandruptur ist die vollständige oder teilweise Kontinuitätsunterbrechung des Bandes nach Überschreiten der Elongationsreserve durch äußere Gewalteinwirkung. Eine alte vordere Kreuzbandruptur ist der persistierende post-traumatische Bandschaden.“ (Dt. Ges. f. Orthopädie und orthopäd. Chirurgie, 2002)

Der dominierende Unfallmechanismus ist das Flexions-Außenrotations-Valgustrauma. Die jährliche Häufigkeit dieser Verletzung beläuft sich auf 50-100/100000 Einwohner (USA, Mitteleuropa). Männer sind etwa viermal so häufig betroffen wie Frauen ( $\text{♂} : \text{♀} \approx 4 : 1$ ). In den letzten Jahren hat die Häufigkeit der Kreuzbandruptur deutlich zugenommen. Führten in den 70er Jahren ca. 3,5% aller Skiverletzungen zu Kreuzbandverletzungen, so stieg deren Anteil bis zu den 90er Jahren auf 20% (CAMERON und VON STOKAR, 2006). Neben den Kreuzbandrupturen reißen durch den Valgusstress nicht selten auch zusätzlich das Innenband und stressbedingt der mediale und/oder laterale Meniscus.

### **1.2 Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes**

Die Kreuzbänder sind passiv für die anterioposteriore Stabilisierung und Rotationsstabilität des menschlichen Knies verantwortlich. Prinzipiell ist das Kniegelenk ein Scharniergelenk. Genauer betrachtet unterliegt es in seinem Bewegungsumfang einem Roll- und Gleitmechanismus. Das vordere Kreuzband entspringt an der lateralen Seite der Fossa intercondylaris femoris und setzt in der Area intercondylaris centralis tibiae an (BÖHRINGER, 1993). Es besteht aus zwei funktionellen Anteilen, einem anteromedialen und einem posterolateralen Bündel. Je nach Bewegung werden selektiv die verschiedenen Bandanteile beansprucht (BANZHAF, 2007). Streckungsnah ist das posterolaterale Bündel und mit zunehmender Beugung das anteromediale Bündel gespannt. Das hintere Kreuzband verläuft von der medialen Seite der Fossa intercondylaris femoris zur Area intercondylaris posterior tibiae. Auch das hintere Kreuzband besteht aus einem anteromedialen und einem posterolateralen Bündel. Deren Beanspruchung erfolgt ebenso selektiv wie die der vorderen Kreuzbandanteile.

Die mikroanatomische Struktur des vorderen Kreuzbandes entspricht der eines straffen Bindegewebes. Das Kreuzband besteht aus in Zugrichtung parallel verlaufenden Kollagenfaserbündeln (Fibrillen), die durch Bindegewebssepten unterteilt sind. Diese Fibrillen setzen sich zu 90% aus Kollagen Typ I und zu 10% aus Kollagen Typ III zusammen. Den Fibrillen liegen

Fibrozyten und Fibroblasten auf, die über zytoplasmatische Ausläufer miteinander in Verbindung stehen. Diese Bindegewebszellen gewährleisten über Kollagensynthese den Bestand und die zelluläre Regenerationsfähigkeit des Kreuzbandgewebes. Ebenfalls finden sich kleinere Blutgefäße sowie Mechanorezeptoren, Propriozeptoren und Nervenfasernäste des Nervus tibialis innerhalb des Kreuzbandes (HÄFNER, 2004). Das vordere und das hintere Kreuzband sind von einem Synovialschlauch umhüllt, der mit einem Kapillarnetzwerk durchzogen ist. In diesem Netzwerk bestehen Anastomosen zwischen den periligamentären, den intraligamentären Kapillaren und dem Periost. Das Kapillarsystem wird im Bereich des femoralen Kreuzbandanteils über die A. genicularis medialis und im tibialen Bereich über die A. genicularis medialis inferior gespeist. Beide Gefäße entspringen der A. poplitea. Trotz der beschriebenen Gefäßversorgung zeigt der intraartikuläre, mittlere Abschnitt des vorderen Kreuzbandes eine geringere Durchblutung als die Abschnitte im Bereich der femoralen und tibialen Ansätze. Die ossären Ansätze selbst sind allerdings avaskulär (UNTERHAUSER, 2004; SCHMIDT, 2007).

### **1.3 Diagnostik der vorderen Kreuzbandruptur**

Die wesentliche Folge eines Funktionsverlustes des vorderen Kreuzbandes bildet der nun nicht mehr komplett bandgeführte Bewegungsablauf. Der Roll-Gleit-Mechanismus ist gestört. Dieses äußert sich bei dem Patienten als Gefühl der Instabilität im Knie, zunächst vor allem beim Springen, beim Richtungswechsel und bei Drehbewegungen. Über einen längeren Zeitraum führt diese Störung zu einer progredienten Schädigung des Gelenkknorpels sowie der Menisci und steigert somit die Gefahr einer frühzeitigen sekundären Gonarthrose (SCHLICHTING, 2007). Durch das Zerreißen der intra- und periligamentären Strukturen (Nervenäste, Gefäße) tritt zum Zeitpunkt des Kreuzbandrisses kurzzeitig ein stechender Schmerz auf. Des Weiteren ergießt sich Blut in die Gelenkhöhle (Hämarthros), was zu einer deutlichen Schwellung des Kniegelenkes führt.

Die manuellen diagnostischen Möglichkeiten bestehen aus dem Schubladentest, dem Pivot-shift-Test und dem Lachman-Test. Das rupturierte vordere Kreuzband kann den anterograden Translationsschub im Kniegelenk nicht mehr auffangen, sodass sich der Unterschenkelknochen in der Flexionsbewegung sagittal nach ventral verschiebt („vorderes Schubladenzeichen“). In der ärztlichen Untersuchung wird dieses Phänomen in der 90°-Flexionsstellung provoziert und kann nach *Debrunner* je nach Verschiebbarkeit drei Klassifikationsgraden zugeteilt werden. Die Flexion ist nötig, damit die rückwärtige Zugwirkung der Sehne des Musculus popliteus und der dorsale Anteil der Gelenkkapsel bei gestrecktem Bein neutralisiert ist und keine falschnegativen Ergebnisse verursacht werden. Im „Lachman-Test“ wird ebenfalls Ventraltranslation getestet, allerdings in der 20°-Flexionsstellung. Nach der manuellen Untersuchung folgt die diagnostische Kniegelenkspunktion zum Hämarthros-Nachweis. Ferner kann über das Punktieren des Hämarthros der durch Kapseldehnung ausgelöste Schmerzreiz vermindert

werden. Der Punktion folgt die bildgebende Diagnostik. Hierfür stehen das konventionelle Röntgen und die Kernspintomographie zur Verfügung. Über das konventionelle Röntgen können die knöchernen Strukturen beurteilt werden. Über die Kernspintomographie ist eine sehr gute Beurteilung der Menisci, des Gelenkknorpels und der Bandstrukturen möglich. Ferner erlauben gehaltene, konventionelle Röntgenaufnahmen und das Kniearthrometer KT-1000 (Lachman-Testung) eine Objektivierung der Knieinstabilität (SCHMIDT, 2006).

Die Therapieentscheidung richtet sich nach dem Beschwerdemuster, dem Alter und der Lebensweise des Patienten. Patienten, die unter keinen subjektiven Einschränkungen oder Instabilitätsgefühlen leiden oder altersbedingt (> 65 Lebensjahre) nicht mehr intensiv Sport betreiben, kommen für einen konservativen Therapieansatz in Frage. In der konservativen Therapie versucht man durch Schienung, Koordinationsübungen und Kräftigung der Oberschenkelrückenmuskulatur die Instabilität des Kniegelenkes teilweise zu kompensieren. Bei jüngeren, sportlich aktiven Patienten ist in der heutigen Zeit die operative Rekonstruktion des Kreuzbandes das Mittel der Wahl.

#### **1.4 Historie der Kreuzbandchirurgie**

Der Beginn der modernen Kniechirurgie datiert auf das Jahr 1845. In diesem Jahr veröffentlichte *Bonnet* die Grundlagenstudie „Die Behandlung von Gelenkerkrankungen“ über die Pathomechanismen und Begleitverletzungen, die bei einer Kreuzbandverletzung ablaufen. Auch wenn in dieser Arbeit die Behandlungsmethoden konservativer Natur waren, so gab sie doch den Anstoß, dass in den folgenden 40 Jahren diese Pathomechanismen u. a. von *Stark* (1850) und *Bonnet* (1879) immer intensiver erforscht wurden. Die bis dato bestehenden Behandlungskonzepte konnten so hinterfragt, verbessert bzw. verworfen werden. Nachweislich erfolgte 1885 der erste echte chirurgische Eingriff in England durch *Robson* (UNTERHAUSER, 2004). Das vordere Kreuzband rekonstruierte er mittels einer Primärnaht. Für mehr als 25 Jahre sollte die primäre Bandnaht die Therapie der Wahl bei frischen vorderen Kreuzbandrupturen sein. Anfang des 20. Jahrhunderts begann man die Möglichkeit des Bandersatzes näher zu erforschen. Als Bandersatz wurden u.a. 1907 von *Lange* Seidenfäden getestet. Der Gedanke, ein autologes Sehnen transplantat zu nutzen, kam erstmalig 1913 durch *Nicoletti* auf. Er beschrieb die Möglichkeit, Faszien, Sehnen des pes anserinus oder Anteile der Patellasehne zu nutzen (MAYR, 2007a). Der Gedanke der heutigen vorderen Kreuzbandrekonstruktion war geboren. *Groves* (1917) und *Smith* (1918) verwendeten ein gestieltes Tractus-iliotibialis-Autotransplantat und legten den Grundstein für die heute durchgeführte Operationstechnik. Obwohl die Möglichkeiten einer Verwendung der Sehnen des pes anserinus und der Patellasehne als Autotransplantat bereits 1913 diskutiert worden waren, dauerte es fast 20 Jahre bis zur erstmaligen Nutzung. *Zur Verth* transplantierte erst 1932 eine gestielte Patellasehne. *Macy* nutzte die Sehnen

des Musculus semitendinosus und des Musculus gracilis (Hamstringsehne), die am *pes anserinus* ansetzen, gar erst 1939. Weiterführend wurde 1963 von *Jones* eine Technik beschrieben, in der ein distal gestieltes Transplantat des mittleren Patellasehnedrittels genutzt wurde. *Brückner* verwendete 1966 ein freies Patellasehnentransplantat aus dem medialen Drittel und setzte damit über Jahre den „Golden Standard“ in der Frage der Transplantatwahl (EICHHORN, 2006). Ende der 70er Jahre begann man synthetische Bandprothesen und Materialien wie Nylon, Polyester, Carbon und Teflon als Implantat in Erwägung zu ziehen. Doch Ende der 80er Jahre nahm man aufgrund des schlechten langfristigen Outcomes von dieser Therapieoption Abstand. Stattdessen versuchte man die Operationstechnik zu optimieren. Bis in die 80er Jahre hinein erfolgte die Kreuzbandrekonstruktion am „offenen Knie“ (Arthrotomie über Payr-Schnitt). Die Rekonstruktion unter Zuhilfenahme der Arthroskopie reduzierte die Invasivität und erhöhte die Präzision. So hat sich bis zum heutigen Tage bezüglich des Kreuzbandersatzes der Grundgedanke von *Nicoletti* (1913) durchgesetzt. Die Hamstringsehne als knochenfreies und die Patellasehne als Knochen-Sehne-Knochen-Transplantat kommen heutzutage am häufigsten zur Anwendung und stellen somit die am besten untersuchten Kreuzbandplastiken dar. Ob ein Autotransplantat dem anderen vorzuziehen ist, bleibt bis heute umstritten.

### **1.5 Fixierung der vorderen Kreuzbandplastik**

Den wichtigsten Faktor der Primärstabilität der Kreuzbandplastik stellt die Fixierung bzw. die Verankerung der Transplantatsehne in dem dafür gefertigten Bohrloch dar. Die Verankerung muss der Belastung während der Rehabilitation bis zur Einheilung der Bandplastik standhalten und die Kreuzbandplastik an ihrer vorgesehenen Lokalisation fixieren. *Lambert* fixierte 1983 erstmals eine Kreuzbandplastik mittels Interferenzschrauben (AO-Spongiosa-Schrauben) aus Titan. Mit dieser Art von Schrauben konnte ein hoher Anpressdruck der Bandplastik in das spongiöse Knochengewebe erreicht werden. Dies wirkt fördernd für ein frühzeitiges Einheilverhalten. 1987 entwickelte *Kurosaka* spezielle Madenschrauben, deren Eigenschaften in puncto Fixierungsfestigkeit und Handhabbarkeit die der AO-Spongiosa-Schrauben übertrafen (WEILER, 2002a). Unter dem Begriff der Interferenzschraube versteht man heute jene Madenschraube. Trotz der guten Ergebnisse bezüglich ossärer Integration und initialer Festigkeit der Bandplastik erwies sich die Tatsache, einen Fremdkörper implantiert zu haben, als problematisch. Das spongiöse Knochengewebe zeigte die Neigung, die Titanschraube knöchern zu ummanteln. Dieser Sachverhalt kann eine Entfernung der Titan-Interferenzschraube bei der Revisionschirurgie erschweren. Um eventuelle Revisionseingriffe zu erleichtern, entwickelte man die resorbierbare Interferenzschraube, die sogenannte „Bioschraube“. Die dafür verwendeten Werkstoffe waren Polymere wie Polyglycolic Acid (PGLA), Poly-L-Lactide Acid (PLLA), Poly-D,L-Lactide Acid (PDLLA), Poly-L-Lactide Acid/Hydroxylapatit (PLLA/HA)

und Poly-L-Lactide Acid/Tricalciumphosphat (PLLA/TCP). Allerdings erreichen die „Bioschrauben“ aus den genannten Materialien nur zum Zeitpunkt „Null“ die Fixierungseigenschaften der Titanschraube und benötigen für ihre Resorption nachweislich mehrere Jahre. Der biochemische Abbau erfolgt über Hydrolyse. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass bestimmte Abbauprodukte aus Polymeren entzündungsfördernd wirken (Mikrokristalle) oder zu Immun- und Fremdkörperreaktionen führen können (Säuren). Diese Eigenschaften können während der Einheilung die biomechanische Stabilität und im weiteren Verlauf das Implantatlager beeinträchtigen (HERTEL und CIERPINSKI, 2004; MAYR, 2007a). *Hertel* stellte bereits 1988 eine Technik vor, die eine „press fit“-Verankerung des autologen Patellasehnentransplantates im Knochen vorsieht (HERTEL und CIERPINSKI, 2004). Auch diese Technik ist nicht unumstritten, da für die gewünschte Stabilität der Verankerung ein ausreichend großer Knochenblock nötig ist. Durch dessen Entnahme wird das tibiale und patellare Knochengewebe massiv geschwächt und ein potentieller ossärer Infektionsherd gesetzt. Ferner ergibt sich aus der hohen Invasivität eine reduzierte Primärstabilität der „press fit“-Verankerung (MUSAHL, 2003).

Alternativ zur Interferenzschrauben-Fixierung kann man die Hamstring-Transplantate auch mittels gelenkferner, extrakortikaler Staples und Flipanker („Endobutton<sup>®</sup>“, „Flipptack<sup>®</sup>“, „Suture Plate<sup>®</sup>“) oder gelenknaher Transfixationssysteme („Transfix<sup>®</sup>“, „Rigid Fix<sup>®</sup>“) verankern. Dadurch wird jedoch die Steifigkeit der Konstruktion beeinträchtigt (SCHEFFLER, 2002). Nur über eine zusätzliche gelenknahe Fixierung (Hybridfixation mit Weichteil-Interferenzschrauben oder Spongiosaplastik) kann dieses Bewegungspotential der Bandplastik verhindert werden (WEILER, 2002a; EICHHORN, 2006).



**Abb. 1:** Beispiele für verschiedene Fixationstechniken (1=Titan-Interferenzschraube, 2=Bio-Interferenzschraube, 3= Bio-Transfix<sup>®</sup>, 4=Rigidfix<sup>®</sup>; Bild: Dreifaltigkeits-Krankenhaus<sup>®</sup>, Köln-Braunsfeld) sowie verschiedene Interferenzschrauben mit dem Durchmesser von 7–10 mm und einer Länge von 20–30 mm (Bild: Stryker<sup>®</sup>, Duisburg, Deutschland)

## 1.6 Grundlagen zum Knochenersatz

Der Grundgedanke der Verwendung von Knochenersatzstoffen ist das Einbringen geeigneter Biomaterialien als Defektauffüllung bei komplexen Knochendefekten (z.B. durch Traumata, Tumorerkrankungen, ossäre Entzündungen, Endoprothetik). Eine andere Option wäre die Verwendung von autogenem oder allogenen Knochen. In der Regel dient hierfür Knochen aus dem

Beckenkamm. Allerdings ist die Menge von autologem Knochenmaterial limitiert. Auch die Implantation von allogenen Knochenmaterial erweist sich als risikoreich. Neben den Infektionsgefahren durch das Hepatitis-Virus oder das HI-Virus können auch die Übertragung von Prionen (Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung) oder Immunreaktionen auftreten (EPPL, 2003). Aus diesen genannten Gründen hat der Einsatz von Biomaterialien als Knochenersatzwerkstoff Bedeutung.

**Tab. 1:** Aufstellung von Werkstoffen, die sich für den synthetischen Knochenersatz eignen (nach BETZ, 2001)

Knochenersatzmaterialien		Werkstoffbeispiel	Formel	Charakteristika
Keramiken	degradierbar	$\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP)	$\beta$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	osteokonduktiv, resorbierbar (siehe <b>Kap. 1.8</b> )
	nicht degradierbar	Hydroxylapatit (HA)	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	osteokonduktiv, integrierbar
Glas-keramiken	degradierbar	GB14	Ca <sub>2</sub> KNa(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , MgKPO <sub>4</sub>	nur für mechanisch unbelastete Bereiche geeignet
	nicht degradierbar	Apatit/Wollastonit	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> /Ca <sub>3</sub> [Si <sub>3</sub> O <sub>9</sub> ]	hohe Druckfestigkeit, partiell integrierbar
Komposite	degradierbar	PLA, PLLA, PLLA/HA	Lactat-Monomer: C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	osteokonduktiv, langsame Biodegradation, azides Milieu bei Resorption
	nicht degradierbar	Hydroxylapatitverstärktes Polyethylen	Ethen-Monomer: C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	partiell osteokonduktiv, hohe mechanische Belastbarkeit
Knochenzemente	degradierbar	Calciumphosphat-Zement	s.o.	hohe Primärstabilität, hohe Belastbarkeit, partiell osteokonduktiv, langfristige biomechanische Schwächung durch physikalische Degradation
	nicht degradierbar	Polymethylmetacrylat-Zement	Monomer: C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	hohe Primärstabilität, hohe Belastbarkeit, sehr schwer revidierbar
Biogläser	degradierbar & nicht degradierbar	anteilig: SiO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> O, CaO, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (anteilige Zusammensetzung variabel)		biokonduktiv, gering belastbar, anteilige Zusammensetzung bestimmt Werkstoffeigenschaften

Der implantierte Knochenersatzwerkstoff muss gewebeverträglich sein (Biokompatibilität), eine besonders feste Verbindung mit dem Knochen eingehen und den lokalisationspezifischen mechanischen Belastungen standhalten (Stabilität). Ferner sollte das verwendete Material als Leitschiene für ein in den Defektraum gerichtetes Wachstum von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und Knochenzellen dienen (Osteokonduktivität). Einige Werkstoffe wie z.B. TCP oder HA können die Bildung von Wachstumsfaktoren wie z.B. *tissue growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *bone morphologic protein* (BMP), *insulinlike growth factor* (IGF), *Tumornekrosefaktor- $\alpha$*  und  $-\beta$  (TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$ ) simulieren (NIEDHART und NIETHARD, 1998). So gelingt die Induktion einer Umwandlung von undifferenzierten, mesenchymalen Vorläuferzellen in Osteoprogenitor-

zellen (Osteoinduktivität). Ein Knochenersatzwerkstoff sollte vollständig von körpereigenen Zellen abbaubar und knöchern ersetzbar sein (Biodegradierbarkeit). In der **Tab. 1** sind synthetische Werkstoffbeispiele aufgeführt, die nach dem heutigen Stand der Wissenschaft für den Knochenersatz verwendet werden. Auf den Werkstoff der Tricalciumphosphate wird aufgrund seiner Relevanz in Bezug auf diese Studie gesondert eingegangen (**Kap. 1.7**).

### **1.7 Tricalciumphosphate**

Das Tricalciumphosphat besteht aus Calcium und Phosphat, die in einem Verhältnis von  $Ca/P = 1,5$  zueinander stehen. Bei den Tricalciumphosphaten werden zwei Formen unterschieden, das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\alpha$ -TCP und  $\beta$ -TCP). Das  $\beta$ -TCP wird in einem Temperaturbereich von 800-1125°C durch Sinterung von Dicalciumphosphat-Anhydrat (DCPA) und  $CaCO_3$  hergestellt. Die Herstellung des  $\alpha$ -TCP erfolgt durch die Erhitzung von  $\beta$ -TCP auf 1125-1400°C.  $\alpha$ -TCP ist die bei Raumtemperatur metastabile Hochtemperaturphase und hat somit eine höhere Löslichkeit als das  $\beta$ -TCP (BANGERT, 2005 und EPPLER, 2003). Lediglich das  $\alpha$ -TCP wird als Calciumphosphat-Zement verwendet, da es in wässrigen Lösungen dazu neigt, sich in das schwerer lösliche Hydroxylapatit umzuwandeln. Beide Formen wurden in vivo bereits in mehreren Studien untersucht. Die osteokonduktive Wirkung wurde bei beiden Formen nachgewiesen und es zeigte sich, dass die zelluläre Reaktion unter implantiertem  $\alpha$ -TCP stärker abläuft als unter  $\beta$ -TCP. Dennoch degradiert implantiertes  $\beta$ -TCP in vivo nachweislich schneller als  $\alpha$ -TCP (GROLMS, 2005 und WEHRHAN et al., 2008). Daher ist das  $\beta$ -TCP als Knochenersatzwerkstoff eher geeignet.

Tricalciumphosphat ist spröde. Die Raumstruktur der TCP-Keramik, wie z.B. die Porengröße, bestimmt im Wesentlichen die Stabilität. Je geringer die Porengröße, desto stabiler die Keramik. Jedoch nimmt mit abnehmender Porengröße, bedingt durch die Eigengröße der an der Biodegradation beteiligten Zellen (mehrkernige Riesenzellen, Phagozyten, Osteoklasten), auch die Biodegradationspotenz ab. Bei ausreichender Porengröße und interkonnektierenden Poren gelangen die Zellen in das Innere der Keramik. Unterschreitet die Porengröße die zellulären Eigengrößen, können die Zellen nicht ins Innere der Keramik eindringen. Die biologische Degradation erfolgt dann von der Oberfläche der Keramik.

### **1.8 Biodegradation**

Der Begriff der Degradation bezeichnet in der Chemie eine stufenweise Zerlegung komplexer Moleküle in deren molekulare Bestandteile. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der zellvermittelten, der lösungsmittelvermittelten und der physikalischen Degradation. Diese Prozesse sind von Materialparametern wie z. B. chemische Zusammensetzung, Kristallstruktur, Kristallgröße, Porosität und präexistenter Gefügedefekte bestimmt. Auch morphologische Ver-

änderungen wie Rissbildungen oder das Abplatzen von Partikeln aufgrund äußerer Kraftwirkung (physikalische Degradation) beeinflussen die Degradation.

Die zellvermittelte Degradation kann entweder über die Phagozytose-Eigenschaften der mehrkernigen Riesenzellen oder die Resorptions-Eigenschaften der Osteoklasten erfolgen. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Es wird aber als sicher betrachtet, dass die verschiedenen Degradationsarten beim Abbau von implantierten Calciumphosphaten parallel ablaufen (BERNSTEIN, 2007).

### **1.9 Schlussfolgerung und Fragestellung für die Studie**

Für die Fixierung von Kreuzbandplastiken ist bis zum heutigen Tage nachweislich noch keine optimale Methode gefunden worden. Die heute Standardmethode stellt die Fixierung mittels „Bioschraube“ dar. Jedoch erreichen diese „Bioschrauben“ nicht die guten Fixierungseigenschaften der Titanschraube. Zudem stellt die Titanschraube einen Fremdkörper dar. Die Neigung des spongiösen Knochengewebes, die Titanschraube knöchern zu ummanteln, kann ihre spätere Entfernung bei der Revisionschirurgie erschweren (vgl. **Kap. 1.5**).

In dieser Studie soll untersucht werden, ob eine Bandplastik mittels eines interkonnektierenden, mikroporösen  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Formkörpers gelenknah „press fit“ fixiert werden kann. Hierfür sollen als Bandplastiken ein mit Knochenblock versehenes Patellasehnentransplantat und ein synovialisiertes Flexorsehnentransplantat betrachtet werden. Ferner gilt es, die verwendeten Bandplastiken histologisch auf Unterschiede bezüglich des Einheilverhaltens und der Langzeitprognose zu untersuchen.

Einen weiteren Untersuchungspunkt stellt die Eignung des verwendeten  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Formkörpers als Knochenersatzwerkstoff dar. Zu diesem Zweck soll das zu untersuchende interkonnektierende, mikroporöse  $\beta$ -Tricalciumphosphat auf sein Degradationsverhalten und die zellulären Reaktionen in dem umliegenden Gewebe hin untersucht werden. Vor dem Hintergrund der Charakteristika von makroporösem  $\beta$ -Tricalciumphosphat (vgl. **Kap. 1.7**) sollen die hier gewonnenen Ergebnisse bewertet werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierversuch**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Für den durchzuführenden Versuch wurde als Versuchstier das Schaf gewählt. Es besitzt dem Menschen vergleichbare Heilungseigenschaften des Bewegungsapparates. Die Schafstibia liegt wie beim Menschen „in der Tragachse des Beines“ (WISSING et al., 1990). In früheren experimentellen orthopädischen und unfallchirurgischen Versuchen hat sich das Schaf als Versuchstier bewährt (BÖHRINGER, 1993; WEILER et al., 2002a-c; HUNT, 2005; PARTALE, 2002) und es wurde belegt, dass die Heilungsgeschwindigkeit bei diesem Tier am ehesten der des Menschen entspricht. Der Versuch kann unter Anwendung von humanmedizinischem Instrumentarium und Implantaten durchgeführt werden (WISSING et al., 1990). Das Versuchsvorhaben wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Mikroporöse Formkörper aus phasenreinem beta-Tricalciumphosphat zur Fixierung der vorderen Kreuzbandplastik und als Knochenersatz“ (in Zusammenarbeit mit der Firma *Synthes*<sup>®</sup>, Liestal, Schweiz) durch das Regierungspräsidium Dessau nachrichtlich Veterinäramt Halle/Saale am 01.03.2005 entsprechend dem Tierversuchsantrag genehmigt (Amtliche Tierversuchsnummer: 42502/2-687 MLU Hal). Dieses Projekt ist Bestandteil der Habilitationsarbeit von H. O. MAYR (2007a).



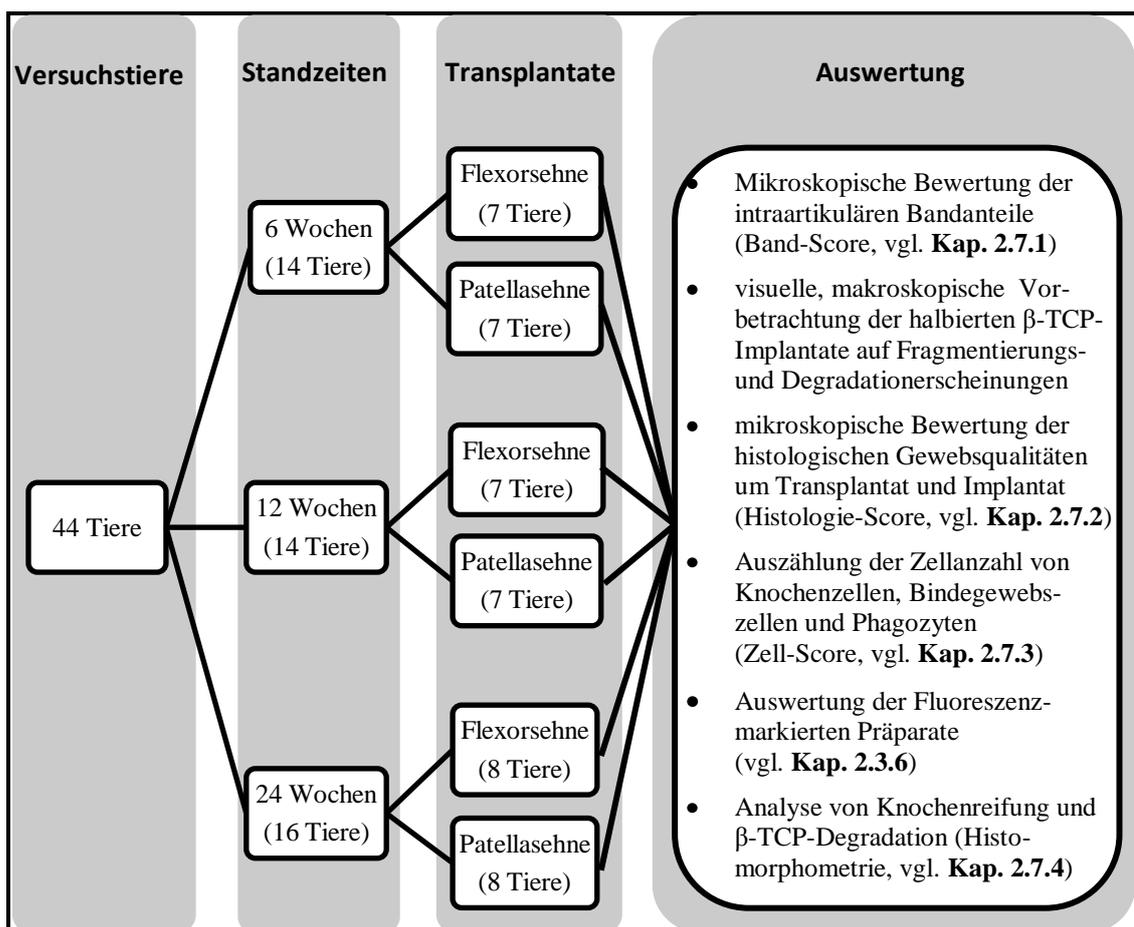
*Abb. 2: Merino-Wollschafe*

#### **2.1.2 Versuchsgruppen und Randomisierung**

Im histologischen Teil des Tierversuchs wurden zwei Operationsmethoden zu jeweils drei postoperativen Zeitpunkten untersucht. Die Versuchstiere wurden dazu in drei Gruppen unterschiedlich langer Standzeiten (6, 12 und 24 Wochen) eingeteilt. Nach Ablauf der jeweiligen Standzeit erfolgte die Tötung. Die Operationsmethoden unterschieden sich in der Wahl des Transplantates. Methode 1 nutzte die ipsilaterale synovialisierten Flexorsehne (siehe **Kap. 2.3.1**), Methode 2 das mittlere ipsilaterale Patellasehndrittel mit proximalem und distalem Knochenblock (siehe **Kap. 2.3.2**). Jede genannte Operationsmethode wurde an 7 Versuchstieren durchgeführt. Somit standen 14 Tiere pro Zeitraum zur Verfügung, sodass bei möglichen Ausfällen mindestens 6 Tiere pro Operationsmethode ausgewertet werden konnten. Während des

Versuches starben 2 Tiere postoperativ durch Aspiration. Diese wurden durch 2 neue Versuchstiere ersetzt. Im weiteren Verlauf des Versuches traten keine weiteren Komplikationen auf. Da keine Veränderung der Methodik erforderlich war, wurden die 2 Versuchstiere aus dem Vorversuch (Standzeit 24 Wochen) in die Auswertung mit einbezogen. Insgesamt wurden 44 Versuchstiere ausgewertet.

Die 44 ausgewachsenen, weiblichen, nicht trächtigen Merino-Wollschafe (Herdbuchtieren) hatten ein Durchschnittsalter von  $44,2 \pm 11,3$  Monaten und ein Durchschnittsgewicht von  $69,4 \pm 7,6$  kg. Die Tiere wurden den genannten zwei Operationsmethoden randomisiert zugeteilt. Die Randomisierung erfolgte im „closed envelope“-Verfahren durch eine weiter nicht beteiligte Person.



**Abb. 3:** Versuchsdesign der Kreuzbandrekonstruktion am Schafmodell (*ohne* Knochenersatz-implantate)

### 2.1.3 Haltung und Fütterung

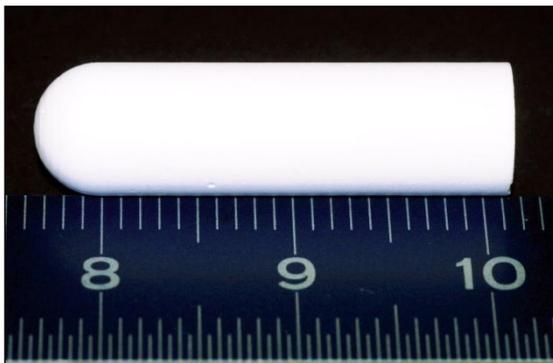
Für die Haltung der Versuchstiere wurden drei eingestreute Tiefstreuboxen in der Größenordnung von 12 bis 24 qm bereitgestellt, so dass jedem Schaf eine Standfläche von ca. 2,5 m<sup>2</sup> zur Verfügung stand. Als Nahrung dienten für die Ballaststoffzufuhr Heu und für die Nährstoffzufuhr Kraftfutter (*H 930 51 denka*<sup>®</sup>/Schaffutter). Zusätzlich wurde pro Stallbox eine Selbst-

tränke mit Leitungswasser als Trinkquelle sowie pro Stall Lecksteine (ohne Kupfer) für die Elektrolytzufuhr zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere wurden zwei Wochen vor dem vorgesehenen Eingriff zum Zwecke der Adaption an das Pflegepersonal und die Räumlichkeiten eingestallt.

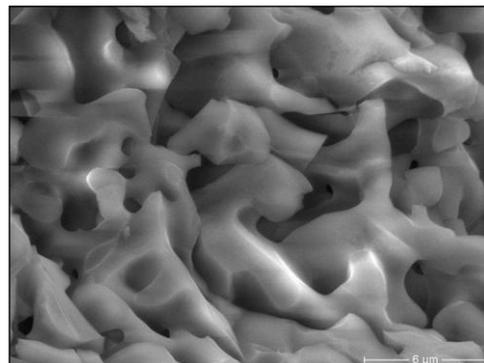
### **2.1.4 Materialspezifikation des Implantats**

Das für diesen Versuch verwendete Implantat ist ein Passzylinder aus einer reinen  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP)-Keramik (vgl. **Kap. 1.6**). Die Reinheit wurde mittels „Environmental Scanning Electron Microscope“ (ESEM) und der Energiedispersiven Röntgenanalytik (EDX) nachgewiesen. Für den Einsatz als Fixierungsmöglichkeit einer vorderen Kreuzbandplastik muss das Material einem maximalen Einpressdruck von 150 N bei einem Durchmesser von 7 mm standhalten (MAYR et al., 2007b). Die erforderliche Implantatstabilität wird bei einer mittleren Porengröße von ca. 5  $\mu$ m erreicht. Die Poren sind interkonnektierend. Das bedeutet, dass im Inneren des Implantates ein durchgehendes Porensystem zu finden ist. Dadurch wird ein hygroskopischer Effekt erreicht.

Der für diesen Versuch verwendete  $\beta$ -TCP-Implantat besitzt einen Durchmesser von 7 mm, eine Gesamtlänge von 25 mm mit einem zylindrischen Anteil von 21,5 mm, eine Porosität von 40%, eine Porengröße von 5  $\mu$ m und einen schwach basischen pH-Wert von ca. 9,5 (**Abb. 4**).



*Abb. 4:  $\beta$ -TCP-Passzylinder*



*Abb. 5:  $\beta$ -TCP und seine Mikroporosität im ESEM (MAYR, 2007a)*

## **2.2 Präoperative Versorgung**

### **2.2.1 Narkose und Medikation**

Die Narkose erfolgte durch einen examinierten Veterinärmediziner und nach einer 12 stündigen präoperativen Nahrungskarenz. Jedem Versuchstier wurde 20 Minuten präoperativ 2 mg/kg KG Atropinsulfat (*Atropin*) und zur Infektionsprophylaxe 1000 mg Ampicillin intramuskulär verabreicht. Nach Ablauf der 20 Minuten injizierte man den Versuchstieren 0,22 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (*Rompun*<sup>®</sup>) sowie 11 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (*Ketanest*<sup>®</sup>) intramuskulär. Unmittelbar nach Wirkungseintritt wurde den Tieren der linke Vorderlauf rasiert und

eine Venenverweilkanüle in der Vena digitalis dorsalis communis platziert. Die Narkostiefe wurde anhand der Auslösbarkeit von Schmerzreflexen, Lid-, Korneal sowie Interdigitalreflexen überprüft. Es wurde bedarfsadaptiert Ketaminhydrochlorid (*Ketanest*<sup>®</sup>) injiziert. Zusätzlich wurden ein endotrachealer Tubus der Größe 9-10 für die Sauerstoffzufuhr sowie eine Magen-Schlundsonde der Größe 12 als Vorbeugung einer Pansenblähung gelegt (BÖHRINGER, 1993). Zur Überprüfung der Vitalparameter diente ein Pulsoxymeter (*Sirecust 1260*, Siemens<sup>®</sup>), dessen Sensor am Ohr des Schafes angebracht wurde. Intraoperativ wurde dem Versuchstier als Volumenersatz isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) intravenös appliziert. Die Sauerstoffapplikation erfolgte über den endotrachealen Tubus. Am Ende der Operation wurde den Versuchstieren zwecks Infektionsprophylaxe erneut 1000 mg Ampicillin intravenös injiziert. Die Narkose wurde über das Absetzen von Ketaminhydrochlorid (*Ketanest*<sup>®</sup>) beendet.

### **2.2.2 Lagerung und Operationseinleitung**

Für den Versuch wurde eine Lagerungsschale zur Befestigung auf dem Operationstisch angefertigt. Das narkotisierte Versuchstier wurde in rechtshalbsseitiger Rückenlage in diese Schale gelegt und dort fixiert. Der Operationstisch wurde um 30° nach kaudal geneigt, um eine restriktive Ventilationsstörung durch Pansendruck zu vermeiden. Unmittelbar nach der Lagerung erfolgten die Rasur des linken Hinterlaufes und die Reinigung der Haut. Die Desinfektion des Operationsgebietes wurde durch mehrfaches Auftragen einer wässrigen 10%igen Polividon-Jod-Lösung (Braunol<sup>®</sup>) erreicht. Auf einem rasierten Areal des Bauches des Versuchstieres wurde die Nullelektrode platziert. Die sterile Abdeckung entsprach aseptischen Bedingungen der humanen Gelenkchirurgie.



*Abb. 6: Merino-Wollschaf in Lagerungsschiene*

## **2.3 Operation**

### **2.3.1 Entnahme des Flexorsehnen transplantates**

Als Flexorsehnen transplantat diente die ipsilaterale Sehne des linken M. flexor digitorum superficialis. Sie ist eine synovialisierte Sehne, die sich histologisch durch intratendinöse Einsprossungen von Synovialsepten von der Patellasehne unterscheidet. Die Sehne wurde über einen paraachillären lateral gelegenen Hautschnitt entnommen. Beim Merino-Wollschaf ist die

Sehne des M. flexor digitorum superficialis von der Sehne des M. gastrocnemius umhüllt. Um an die Tendo musculi flexoris digitorum superficialis zu gelangen, wurde zunächst die Tendo musculi gastrocnemii durch einen longitudinalen Schnitt geteilt.

Die Sehne wurde freipräpariert (**Abb. 7**) und ein etwa 8 cm langer Sehnenabschnitt entnommen, dessen eines Ende mit einem Mersilene-Haltefaden (*Ethibond*<sup>®</sup>) der Stärke 1 durchflochten wurde (**Abb. 8**). Der Durchmesser der Sehnen wurde mit einem Schablonenzylinders auf 7 mm reduziert. Das Transplantat wurde in einer in isotoner Kochsalzlösung getränkten Kompresse feucht gelagert und die Wunde mittels einer fortlaufenden Naht verschlossen. Zum Schluss erfolgte eine gründliche Wundreinigung mit Polividon-Jod (*Braunol*<sup>®</sup>) und Aqua destillata (Aqua dest.). Als Wundabdeckung diente Aluminium-Mikronisat-Silberspray.



**Abb. 7:** Entnahme der Flexorsehne (MAYR, 2007a)



**Abb. 8:** Flexorsehnenplastik mit Mersilene-Haltefaden (MAYR, 2007a)



**Abb. 9:** Entnahme der Patellasehnenplastik



**Abb. 10:** Patellasehnenplastik mit Mersilene-Haltefaden und Schablonenzylinder

### **2.3.2 Entnahme des Patellasehnen transplantates**

Als Patellasehnen transplantat diente das mittlere ipsilaterale Drittel des Ligamentum patellae. Das Transplantat wurde an Patella und Tuberositas tibiae knöchern herausgesägt und von den beiden seitlich anliegenden Patellasehnen schenkeln im Längsverlauf gelöst (**Abb. 9**). Das auf diese Weise gewonnene autogene Transplantat mit proximalem und distalem Knochenblock wurde dann mit Hilfe der Schablone auf den Durchmesser von 7 mm präpariert und an einem

Ende von einem Mersilene-Haltefaden (vgl. **Kap. 2.3.1, Abb. 10**) durchflochten. Die Lagerung bis zur Implantation erfolgte analog dem Flexorsehnentransplantat.

### **2.3.3 Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mittels „press fit“-Transplantatfixierung**

Das Knie wurde über einen parapatellar-medialen Hautschnitt von etwa 15 cm Länge eröffnet. Für den Midvastus-Zugang wurde der Musculus vastus medialis mit Faszie im Faserverlauf geteilt und die darunterliegende Gelenkkapsel mitsamt Patella freigelegt. Für die Schafe der Patellasehnengruppe wurde hier nun das Transplantat entnommen (siehe **Kap. 2.3.2**). Die Arthrotomie erfolgte mittels einer medialen parapatellaren Inzision der Gelenkkapsel. Dann wurde die Patella nach lateral luxiert und das Kniegelenk des Schafhinterlaufes in 90° Flexion gebracht. Somit war die Patella dort fixiert. Im folgenden Vorgehen wurde das Corpus adiposum infrapatellare aus der Gelenkhöhle teilweise entfernt und das vordere Kreuzband sorgfältig freipräpariert. Nach der Entfernung des synovialen Überzuges wurde das vordere Kreuzband an seinem originären Ursprungs- und Ansatzbereich reseziert.

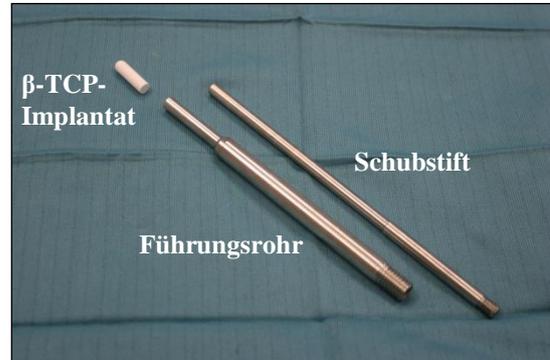
Mit einer Kegelfräse erfolgte eine sparsame Erweiterung der Fossa intercondylaris. Durch den originären Ursprungsbereich des vorderen Kreuzbandes wurde dann jeweils ein Bohrkanal mit einem Durchmesser von 8 mm von der Fossa intercondylaris durch den lateralen Kondylus nach außen angelegt. Der tibiale Bohrkanal erstreckte sich vom Ansatzbereich des vorderen Kreuzbandes auf dem Tibiaplateau senkrecht bis in die Markhöhle. Der Bohrvorgang erfolgte mit einer Drehzahl von < 300 U/min und unter Kühlen mittels Aqua dest., um thermische Schäden zu vermeiden. Anschließend wurde die Gelenkhöhle gespült. Der nächste Schritt bestand in der Implantation der Transplantate in die Bohrkanäle. Das femorale Transplantatende wurde an dem zuvor durchflochtenen Mersilene-Haltefaden (siehe **Kap. 2.3.1**) durch den femoralen Bohrkanal gezogen und das tibiale Transplantatende nach proximal in den tibialen Bohrkanal platziert.

Es folgte die Impaktierung, d. h. das Einpressen des tibialen Anteils der Kreuzbandplastik in den spongiösen Knochen des tibialen Bohrkanal mittels Dilatatoren in 1mm Steigerungen des Durchmessers bis zu 7 mm (**Abb. 11**). Die tibiale Bandplastik wurde dann durch das Einbringen des  $\beta$ -TCP-Passzylinders in den Bohrkanal von intraartikulär fixiert. Zum Einbringen dieses Implantats wurde ein Führungsrohr, in welchem sich das Implantat befand, auf das Bohrloch aufgesetzt. In dieses wurde das  $\beta$ -TCP-Implantat unter Verwendung eines Schubstiftes (**Abb. 12** und **Abb. 13**) hineingepresst. Dadurch, dass das tibiale Transplantatende nun fixiert war, konnte die Bandplastik vorgespannt werden. Für die Vorspannung und Konditionierung wurde auf die Bandplastik unter Verwendung eines Tensiometers, durch manuellen Zug an dem Mersilene-Haltefaden, eine Zugkraft von 90 N ausgeübt und simultan das Kniegelenk 20mal von endgradiger Streckung in endgradige Beugung gebracht. Die Impaktierung des femoralen Anteils der Kreuzbandplastik in den femoralen Bohrkanals sowie die Fixierung durch ein  $\beta$ -TCP-Implantat erfolgte wie zuvor bei dem tibialen Kreuzbandplastikabschnitt. Nach der

Implantation der Kreuzbandplastik wurde die Gelenkhöhle gründlich durch Spülen mit Aqua dest. gereinigt und die Patella durch Streckung des Schafhinterlaufes reponiert. Die Wunde wurde schichtweise mit Einzelheftnähten verschlossen. Für die Hautadaption wurde eine fortlaufende Naht verwendet. Die Wunde wurde anschließend mit Polividon-Jod (*Braunol*<sup>®</sup>) und Aqua dest. gereinigt. Der Wundabdeckung erfolgte über Aluminium-Mikronisat-Silberspray.



**Abb. 11:** Dilatatoren für die Impaktierung (MAYR, 2007)



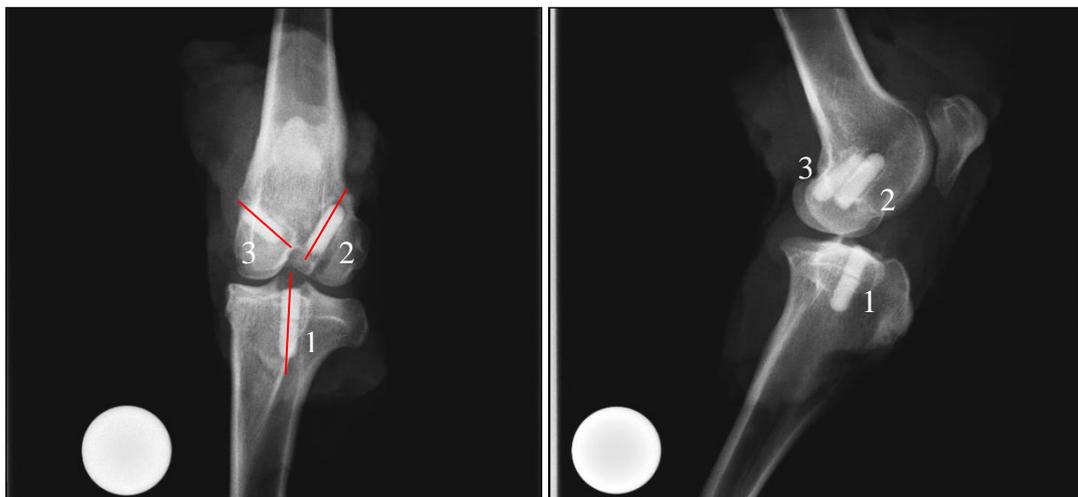
**Abb. 12:** Instrumentarium für das Einbringen des  $\beta$ -TCP-Implantats



**Abb. 13:** Einbringen des Implantats



**Abb. 14:**  $\beta$ -TCP-Implantat für die Beurteilung von  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff im medialen Femurkondylus (MAYR, 2007a)



**Abb. 15:** Röntgenaufnahmen eines operierten linken Hinterlaufes im antero-posterioren (links) und lateralen (rechts) Strahlengang mit den implantierten tibialen (1) und femoralen (2) „press fit“, dem Knochenersatz-Implantat(3) sowie deren Teilungsverlauf (rot)

#### **2.3.4 $\beta$ -TCP-Implantat für die Beurteilung von „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“**

Um das Einheilverhalten des  $\beta$ -TCP-Implantats als Knochenersatz (Resorption) und die Gewebsreaktion des Knochens auf das  $\beta$ -TCP-Implantat (ohne Beeinflussung durch das Sehnentransplantat) besser beurteilen zu können, wurde bei randomisiert zugeweilten Versuchstieren intraoperativ ein zusätzliches  $\beta$ -TCP-Implantat in den medialen femoralen Kondylus eingebracht (siehe **Abb. 14**). Dies geschah durch Anlegen eines etwa 2,5 cm tiefen Bohrkanals mit dem Durchmesser von 7 mm, in den das  $\beta$ -TCP-Implantat unter minimalem Druck platziert werden konnte. Der Verschluss des Periosts erfolgte danach über Einzelknopfnähte.

Um innerhalb dieser Arbeit zwischen den einzelnen  $\beta$ -TCP-Implantaten unterscheiden zu können, werden die Implantate zur Beurteilung von  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff im weiteren schriftlichen Verlauf als „Knochenersatzimplantate“ und die transplantatfixierenden Implantate als „press fit“-Implantate“ bezeichnet.

#### **2.3.5 Postoperative Betreuung**

Die primäre postoperative Betreuung bestand in der analgetischen und antibiotischen Medikation der Versuchstiere. Alle operierten Tiere erhielten standardisiert in den ersten drei postoperativen Tagen 2 g Novaminsulfon (*Novalgine*<sup>®</sup>) und 100 ml Tramadolhydrochlorid (*Tramal*<sup>®</sup>) als analgetische Medikation sowie zwecks Antibiose 1000 mg Ampicillin jeweils intramuskulär injiziert. Zusätzlich erfolgte die regelmäßige Wundkontrolle, um Wundheilungsstörungen oder Wundinfektionen frühzeitig zu erkennen und mit erneutem Auftragen von Aluminium-Mikronisat-Silberspray als Wundverband intervenieren zu können.

Die Entfernung des Nahtmaterials erfolgte am Tag 12 post operationem. Die operierten Tiere wurden mit den nicht operierten Tieren zusammen gehalten. Es bestand also keinerlei Limitierung der Bewegungsfreiheit oder Nahrungszufuhrunterschiede im Vergleich zu den nicht operierten Tieren. Die postoperative Ganganalyse stellt einen Teil der Dissertationsarbeit von *M. Dietrich* (in Vorbereitung) dar und wird hier nicht weiter dargestellt.

#### **2.3.6 Fluoreszenzmarkierung**

In Anlehnung an RAHN (1976) und REICHEL (1998), bei denen die Eigenschaften von Fluorochromen als Indikatoren für neu gebildeten Knochen beschrieben und genutzt wurden, erfolgte an jedem zweiten Versuchstier der 12-Wochen-Gruppe eine Dreifarbmarkierung.

Die Fluorochrome lagern sich dabei bandenförmig in Bereichen des Gewebes an, die stoffwechselaktiv sind bzw. sich im starken Umbau befinden (Knochengewebe). Diese für jedes Fluorochrom farblich charakteristischen Banden (**Tab. 2**) können dann unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden. Als Farblösungen wurden Tetrazyklin, Xylenorange und Calceingrün benutzt. Die Applikation erfolgte subkutan und begann am Tag 10 post operationem mit 20 mg/kg KG Tetrazyklin. Am Tag 20 post operationem erfolgte die Gabe von

60 mg/kg KG und 10 Tage später 6 mg/kg KG Calcein. Die Herstellung der Farblösungen erfolgte am Tag der Applikation. Die Farbstoffmenge wurde in 2%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gelöst, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und steril filtriert. Die Applikationsmenge der Farbstofflösung belief sich auf 1 ml/kg KG (NÖBEL, 2006).

**Tab. 2: Fluoreszenzmarkierung (nach NÖBEL, 2006)**

Farbstoff	Zeitpunkt	Dosis	Farbe
Tetrazyklin	10 Tage post op.	20 mg/kg KG	gelb
Xylenolorange	20 Tage post op.	60 mg/kg KG	orange
Calcein	30 Tage post op.	6 mg/kg KG	grün

#### **2.4 Tötung der Versuchstiere und Präparation des Kniegelenks**

Die schmerzlose Tötung (Euthanasierung) der Versuchstiere erfolgte mittels Injektion von 10 ml Tetracainhydrochlorid (*T61*<sup>®</sup>) in Narkose (siehe **Kap. 2.2.1**). Zuvor wurden die Versuchstiere bezüglich ihres Gangbildes beurteilt sowie ihr Gewicht aufgenommen. Unmittelbar nach der Tötung wurden den Tieren beide Hinterläufe explantiert, indem die Femurköpfe aus den Hüftpfannen gelöst wurden. Die Präparation der Schafshinterläufe beinhaltete das Entfernen des femoralen und tibialen Muskelgewebes unter Belassung der Gelenkkapsel des Knies. Nach dem Röntgen der Kniegelenke (siehe **Abb. 15**) wurden diese, unter Eis gekühlt, zum Ort der biomechanischen Untersuchungen (Firma *Synthes*<sup>®</sup>, Liestal, Schweiz) transportiert. Mit den sterblichen Überresten der Tiere wurde gemäß dem Tierkörperbeseitigungsgesetz der Bundesrepublik Deutschland verfahren.

#### **2.5 Biomechanische Untersuchung**

Die biomechanischen Untersuchungen sind Bestandteil der Dissertationsschrift von *M. Dietrich* (in Vorbereitung) und werden hier nicht näher behandelt. Als Hilfe für das Verständnis bezüglich der Präparatentnahmen für die folgenden histologischen Untersuchungen und deren Auswertung sei erwähnt, dass in den biomechanischen Untersuchungen unter anderem die Zugbelastung der vorderen Kreuzbänder nach vorheriger Abpräparation von Gelenkkapsel, Menisci und des hinteren Kreuzbandes bis zum Zerreißen getestet wurde.

#### **2.6 Herstellung der histologische Präparate**

##### **2.6.1 Kreuzbandpräparate**

Nach der biomechanischen Untersuchung erfolgte die Präparatgewinnung der vorderen Kreuzbänder. Zu diesem Zweck wurden die verbliebenen tibialen und femoralen Kreuzbandanteile abpräpariert. Für jedes Kreuzbandpräparat diente als Vergleichsprobe das Kreuzband des nicht operierten rechten Hinterlaufes desselben Versuchstieres. Die Kreuzbandpräparate wurden getrennt voneinander für eine Dauer von 7 Tagen in 4%iger Formalinlösung für die Paraffineinbettung fixiert.

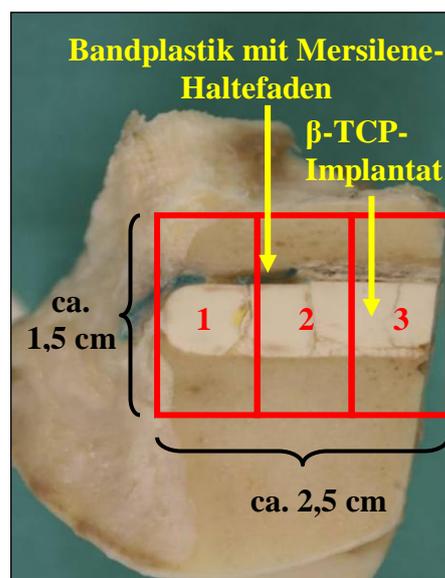
### 2.6.2 Fixierung der $\beta$ -TCP-Präparate

Die histologischen Untersuchungen des implantierten  $\beta$ -TCP-Implantates und des zusätzlichen  $\beta$ -TCP-Implantates als Knochenersatzstoff (siehe **Kap. 2.3.4**) bestand zum einen aus der lichtmikroskopischen und zum anderen aus der morphometrischen Auswertung der Präparate. Hierfür wurden die femoralen und die tibialen Dübel mittels eines Diamantsägebandes (*Exakt*<sup>®</sup>-Trennschleifsystem – Makro, **Abb. 16**) der Stärke 0,1 mm im Längsverlauf median geteilt. Unmittelbar nach der Teilung erfolgte eine visuelle Vorbetrachtung. Auf diese Weise wurden die beiden Präparathälften auf makroskopisch erkennbare Fragmentierungs-, Degradationserscheinungen des  $\beta$ -TCPs und auf grobe Auffälligkeiten innerhalb des Transplantat- oder Knochengewebes untersucht.

Die für die lichtmikroskopische Auswertung bestimmte Hälfte des Implantates wurde dann in gleich große Abschnitte gedrittelt (**Abb. 17**), sodass man drei Knochenblöcke, die das  $\beta$ -TCP-Implantat und die jeweiligen Bandplastiken enthielten, zur Verfügung hatte. Die für die Morphometrie vorgesehene Hälfte wurde nicht weiter präpariert. Die so hergestellten Präparate, mit Ausnahme der für die Morphometrie bestimmten Hälften der fluoreszenzmarkierten Tiere, wurden ebenfalls 7 Tage mit 4%iger Formalinlösung fixiert. Die Präparate der fluoreszenzmarkierten Tiere wurden zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe mit 70%igem Ethanol fixiert.



**Abb. 16:** *Exakt*<sup>®</sup>-Trennschleifsystem



**Abb. 17:** Schablone für das Aussägen der Knochenblöcke (1 = apikales Drittel, 2 = mittleres Drittel, 3 = gelenknahes Drittel)

### 2.6.3 Entkalkung der $\beta$ -TCP-Präparate

Die hergestellten Knochenblöcke (mit  $\beta$ -TCP-Implantat und die jeweiligen Bandplastiken) mussten für die Gewinnung von Dünnschnitten und für die Immunhistochemie entkalkt werden. Nach der Fixierung wurden die Proben zur Entfernung des Fixierungsmittels

60 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die anschließende Entkalkung erfolgte mit einer auf 37°C temperierten Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (siehe **Tab. 3**). Dieser Stoff entzieht aufgrund seiner höheren Affinität dem Knochen das Calcium, wodurch das Präparat am Mikrotom schneidbar wird. Der pH-Wert der Entkalkungslösung wurde auf 7,4 eingestellt. Eine vollständige Entkalkung war bei täglicher Erneuerung des Entkalkungsmediums nach 4-6 Wochen erreicht. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet.

**Tab. 3: Zusammensetzung der Entkalkungslösung**

700 g EDTA
4830 ml Aqua dest.
65 g NaOH
pH = 7,4

#### **2.6.4 Paraffin-Einbettung**

Die Kreuzbandpräparate wurden nach 7-tägiger Fixierung in 4% Formalin 60 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Dieser Spülvorgang erfolgte bei den Knochenblöcken nach deren Entkalkung. Es schloss sich die Paraffin-Einbettung mittels eines Gewebe-Einbett-Automaten (Typ *Microm*<sup>®</sup> *LX120/300P*, Heidelberg) über eine ansteigende Alkoholreihe (Entwässerung), Xylolersatz (Entfettung) und eines 3-stufigen Paraffinbades bei 60°C an. Das darauf folgende Ausbetten der Proben zu Paraffinblöcken erfolgte manuell mittels dafür vorgefertigter Ausbettformen und auf 60°C erwärmten, flüssigen Paraffins.

#### **2.6.5 Schneiden der $\beta$ -TCP-Präparate für die Histologie**

Die in Paraffinblöcke eingebetteten Präparate wurden am Mikrotom (*Microm*<sup>®</sup> *HM340E*, Heidelberg) geschnitten. Für die Kreuzbänder wurde eine Schnittdicke von 4  $\mu$ m, für die entkalkten Knochenblockpräparate von 10  $\mu$ m gewählt. Die histologischen Schnitte wurden auf Objektträgern (Typ *SuperFrost*<sup>®</sup> *Plus*, Firma *Menzel-Gläser*<sup>®</sup>) aufgezogen und gefärbt. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Giemsa- und die Hämalaun-Eosin-Färbemethode gewählt. Die Giemsa-Färbung zeichnet sich durch gute Farbkontraste „zwischen Zellen und der Interzellulärsubstanz der Weich- und Hartgewebe“ (ROMEIS, 1989, S.557) aus und erlaubt auch eine Unterscheidung der Blutzellen. Mit der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) lassen sich Zellkerne blau anfärben, während das restliche Gewebe sich in verschiedenen Rot-Tonabstufungen darstellen lässt (ROMEIS, 1989). Die gewebsspezifische Beschreibung der Farbdarstellung der verwendeten Färbungen ist der **Tab. 4** zu entnehmen.

**Tab. 4: farbliche Darstellung der Gewebestrukturen der verwendeten Färbemethoden**

<b>Färbung</b>	<b>Osteo- blasten</b>	<b>Osteo- klasten</b>	<b>Osteoid/ Bindegewebe</b>	<b>alter Knochen</b>	<b>neu gebildeter Knochen</b>
<b>Giemsa</b>	blau	blau	hellblau	zartrosa	rosa
<b>HE</b>	rotbraun	rotbraun	rot	rot	hellrot
<b>Goldner</b>	rotbraun	orange	rotorange	grün	hellgrün

### **2.6.6 Immunhistologie der $\beta$ -TCP-Präparate**

Exemplarische Paraffinpräparate dienen dem enzymhistochemischen Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP-Färbung), die verschiedene Hydrolyseprozesse in Osteoklasten katalysiert. Auf diese Weise kann man Osteoklasten und osteoklastenähnliche Riesenzellen farblich markieren und unter dem Lichtmikroskop darstellen (TRAP-positiv). Makrophagen hingegen sind TRAP-negativ.

Die TRAP-Färbung erfolgte mittels der Azofarbstoff-Kupplungsmethode nach BARKA und ANDERSON (1963). Für diese Methode wurden die Präparate entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Danach erfolgte eine einstündige, lichtgeschützte Inkubation der Präparate bei 37°C in einem sauren Medium (pH=5), das Natriumnitrit, Parasosanilin und als Substrat für die Kupplungsreaktion Naphtol-AS-BI enthielt. Da die TRAP eine besonders hohe Stabilität besitzt und Fixierungs- und Entkalkungsprozesse dieses Enzym nicht inaktivieren, kann das Naphtol-AS-BI enzymatisch hydrolysiert werden. Die Kupplungsreaktion erfolgt dann zwischen dem freigesetzten Naphtol-AS-BI und einem Diazoniumsalz, was das Entstehen eines wasserunlöslichen Azofarbstoffes zur Folge hat. Dieser Azofarbstoff färbt die Zellen, die TRAP exprimieren, weinrot an (BLEIER, 2003). Um angrenzende Gewebestrukturen beurteilen zu können, wurden die Präparate mit Hämatoxylin gegengefärbt.

### **2.6.7 Dünnschliffpräparate für Histologie und Histomorphometrie**

An den für die Paraffineinbettung genutzten gegenüberliegenden femoralen und tibialen Hälften wurde das Verfahren der „Trenn-Dünnschliff-Technik“ nach *Donath* durchgeführt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, Präparate ohne Entfernung der Implantate für eine histologische und histomorphometrische Analyse insbesondere der Grenzfläche zwischen Implantat und Knochen herzustellen.

Für dieses Verfahren wurden die zu untersuchenden Präparate in luftdicht verschließbaren Einweggläsern in einem Kunststoffmedium (Methylmethacrylat) eingebettet. Die Entwässerung und Entfettung erfolgte ähnlich der Paraffineinbettung stufenweise durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylolersatz (*Roticlear*<sup>®</sup>), um Schrumpfungen und Zerreißen der Präparate zu vermeiden. Die Kunststoffeinhüllung gliederte sich in drei Schritte:

Im ersten Schritt wurden die Proben mit einer Basiskunststofflösung bestehend aus 9 Teilen des dünnflüssigen Monomers Methylmethacrylat (MMA) und einem Teil des Weichmachers (Di-butylphthalat) infiltriert. In den beiden weiteren Schritten wurden dann der Basislösung je 1 g bzw. 3 g eines Polymerisationsstarters (Benzoylperoxid) beigemischt. Die Polymerisation von MMA stellt eine exotherme Reaktion dar, bei der in kurzer Zeit eine große Wärmemenge frei wird. Zur Ableitung der Reaktionswärme und um die Entstehung von Luftblasen innerhalb des späteren Kunststoffblockes zu vermeiden, wurden die Glasgefäße während dieses Vorgangs in

einem auf 27° C temperierten Wasserbad gekühlt. Nach dem Aushärten des MMAs wurden die entstanden Kunststoffblöcke aus den Einbettgläsern gelöst. Von den Proben wurden parallel zur Längsrichtung des  $\beta$ -TCP-Implantates mit einem Diamantsägeband (*Exakt*<sup>®</sup>-Tennschleifsystem-Makro; Stärke 0,1 mm) zwei bis drei ca. 0,8 mm dicke Scheiben abgetrennt. Um thermische Effekte zu vermeiden, wurde eine permanente Kühlung durch isotone Flüssigkeit durchgeführt. Die abgetrennten Scheiben wurden dann auf einen Plexiglas-Objektträger geklebt (*Technovit*<sup>®</sup> 7210VLC Kulzer: Exakt) und mittels eines Schleifgerätes (*Exakt*<sup>®</sup>-Mikroschleifsystem) auf eine Stärke von ca. 0,1 mm reduziert.

Der erste Schliff des Präparates wurde für die Histomorphometrie genutzt. Als Oberflächenfärbung wurde für die Histomorphometrie die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (Goldner-Färbung) genutzt, welche eine gute Differenzierung zwischen Knochenmatrixes verschiedener Verkalkungsstadien und dem Weichgewebe erlaubt. In der „Experimentellen Orthopädie“ hat sich die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung bezüglich der histomorphometrischen bildanalytischen Auswertung bewährt und gilt dort als Standardverfahren. Die gewebsspezifischen Färbungen sind der **Tab. 4** zu entnehmen.

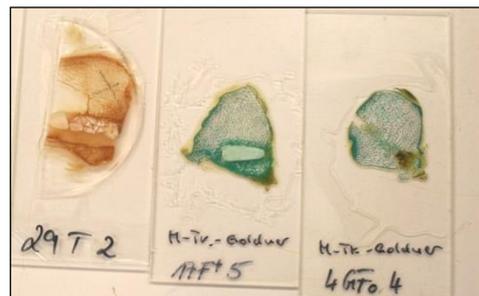
Die restlichen Schliffe wurden für die histologische Auswertung einer Giemsa-Färbung unterzogen (vgl. **Kap. 2.6.5**). Vereinzelte, ausgewählte Dünnschliffpräparate jeder Standzeit- und Transplantatgruppe wurden zusätzlich exemplarisch mikroradiologisch unter dem ESEM und dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht.



**Abb. 18:** Sägen der MMA-Blöcke



**Abb. 19:** *Exakt*<sup>®</sup>-Mikroschleifsystem



**Abb. 20:** Dünnschliffpräparate mit und ohne Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

## **2.7 Quantitative und qualitative Auswertung der histologischen Präparate**

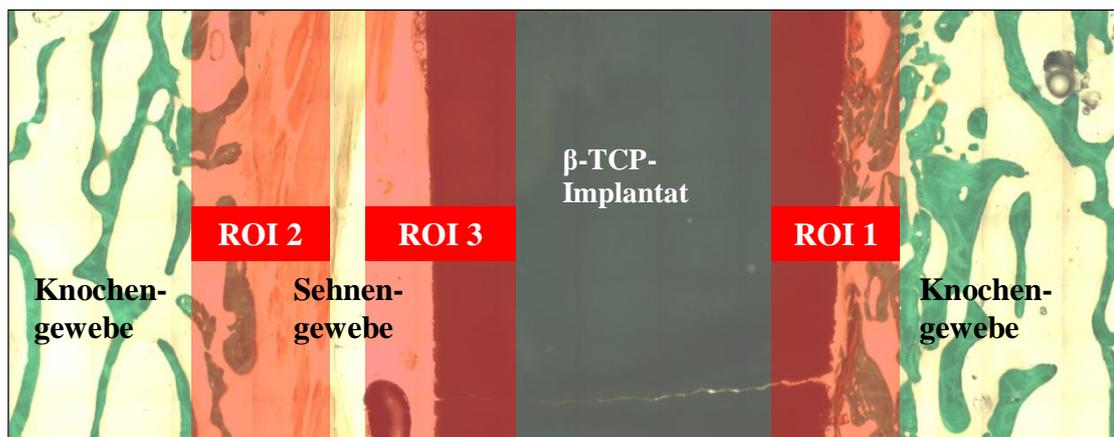
Die Auswertung der Präparate erfolgte durch zwei Personen, die unabhängig voneinander begutachteten und bewerteten. Die Mittelwerte der Bewertungen beider Gutachter wurden für die histologische Analyse herangezogen. Für die Auswertung wurden die Paraffinpräparate des mittleren Drittels herangezogen (siehe **Kap. 2.3.6, Abb. 16**).

Die lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte an zwei Forschungsmikroskopen der Firma Olympus® (*Vanox AH3* und *Bx51*) mit Objektiven der 4-, 8-, 10-, 20 und 40fachen Vergrößerung. Die Vergrößerung des *BX51* unterscheidet sich von der des *Vanox AH3* um den Faktor 0,8. Dieser sich im Ergebnis widerspiegelnde Unterschied wurde rechnerisch behoben.

Für die Auswertung des Histologie-Scores (**Kap. 2.7.2**), des Zell-Scores (**Kap. 2.7.3**) und der Histomorphometrie (**Kap. 2.7.4**) wurden drei „Regions of Interest“ (ROI) festgelegt, die Übergangszonen darstellten (**Abb. 21**).

- ROI 1: Knochen ↔  $\beta$ -TCP-Implantat
- ROI 2: Sehne ↔ Knochen
- ROI 3: Sehne ↔  $\beta$ -TCP-Implantat

Die einzelnen Scores sind im Anhang abgebildet.



**Abb. 21:** Lokalisation der „Regions of Interest“ (ROI)

### **2.7.1 Band-Score**

In Zusammenarbeit mit *Prof. Dr. med. A. Nerlich* (Chefarzt der *Institute für Pathologie* der Kliniken *München-Bogenhausen* und *München-Schwabing*) wurde ein Score entwickelt, der die Qualität der intraartikulären Kreuzbandpräparate (**Kap. 2.6.1**) möglichst genau beschreibt. Als zu beurteilende Strukturen wurden gewählt:

#### **1. Zelluläre Morphologie und Organisation**

In diesem Punkt wurden quantitativ die zelluläre Zusammensetzung (Fibrozyten-Fibroblasten-Verhältnis), die Entzündungsreaktion (Lymphozyten, Histozyten, Mastzellen, Granulozyten, Makrophagen) und die Vaskularisierung beurteilt. Allen Strukturen wurde ein

Punktwert von 0 - 3 zugeteilt. Der Punktwert 3 charakterisiert dabei den Normalzustand und der Wert 0 stellt die stärkste Veränderung dar. Im Verlauf der mikroskopischen Auswertung wiesen einige Präparate beider Transplantate Gewebeeigenschaften auf, die innerhalb des Band-Scores zwei unterschiedliche Punktwerte charakterisieren. Für die weitere statistische Verarbeitung wurden die Mittelwerte aus den jeweiligen Punktwertpaaren genutzt.

## **2. Fibroblasten- und Fibrozytenanzahl**

Für die Ermittlung der Fibroblasten- und Fibrozytenanzahl wurde in das Okular ein in 100 Quadrate (10 x 10 Quadrate) unterteiltes Zählgitter integriert und in 10facher Vergrößerung diese Zellen an fünf verschiedenen Lokalisationen ausgezählt. Dieser Arbeitsschritt der Auswertung der intraartikulär gelegenen Transplantatanteile entspricht in der Durchführung dem der Auswertung des Zell-Scores (vgl. **Kap. 2.7.3**).

## **3. Zellfreie Areale (Nekroseareale)**

Die Ermittlung des Nekroseausmaßes erfolgte parallel zur Ermittlung der Fibroblasten- und Fibrozytenanzahl. An jeder der fünf auszuwertenden Lokalisationen wurde hierfür die Anzahl der zellfreien Teilquadrate ausgezählt. Innerhalb des Band-Scores wurde das Nekroseausmaß in 10%-Stufen angegeben (z.B. keine zellfreien Quadrate = 100% Vitalität; 40 - 49 zellfreie Quadrate = 50% Vitalität; 90 - 100 zellfreie Quadrate = 0% Vitalität).

In Anlehnung an UNTERHAUSER (2004) erfolgte zusätzlich die Zuordnung der Präparate zu einem von vier Transplantat-Umbauprozessen. Die unauffälligen und gesunden Präparate wurden dem Punkt „Umbau nicht erkennbar“ zugeteilt. Die Zuteilung der anderen Präparate erfolgte wie folgt:

- **Initiale Phase**

Zu dieser Gruppe zählten alle Präparate, in denen Nekrosen und Degradation vorherrschen. Diese Phase ist durch Hämatombildung, Granulationsgewebe und Entzündungszellen gekennzeichnet. Durch Mediatorenfreisetzung werden Vorläuferzellen im umgebenden Gebiet zur Differenzierung und Organisation der Vaskularisierung und Fibroblasten angeregt.

- **Revitalisierungsphase**

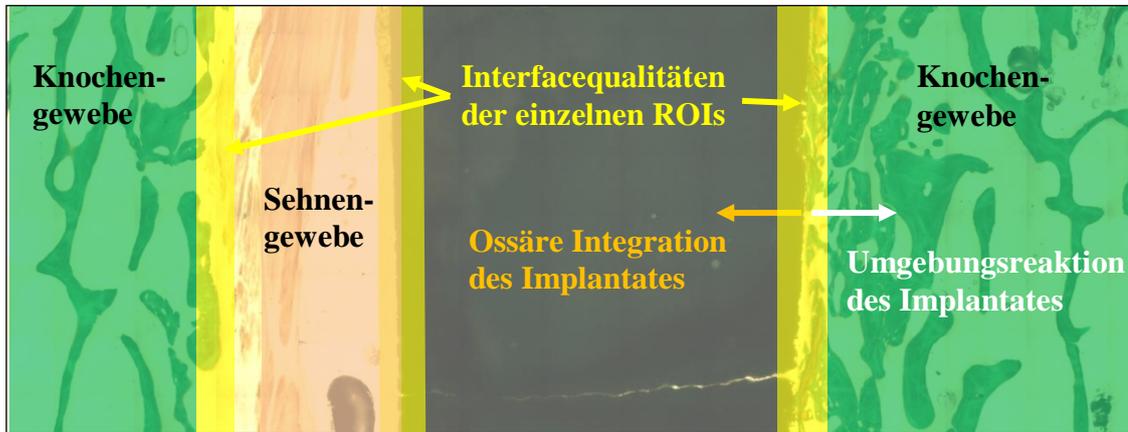
Dieser Phase wurden die Präparate zugeordnet, in denen eine zunehmende zentralgerichtete Revaskularisierung nachgewiesen werden konnte und gefäßreiches Bindegewebe das avitale Transplantat ersetzte. In dieser Phase ist die straffe Organisation des ursprünglichen Gewebes nicht mehr gegeben und das Gewebe ist biomechanisch am geringsten belastbar. Diese Phase beginnt 8 Wochen post operationem und geht fließend in die Remodellingphase über.

- **Remodellingphase**

In der Remodellingphase wird das Kollagengerüst des Transplantates durch ständigen Auf- und Abbau über Fibroblasten an die biomechanischen Anforderungen angepasst. Zusätzlich

entstehen Myofibroblasten, zu deren Eigenschaften sowohl Kontraktionsfähigkeit als auch Kollagenbiosynthese zählen. Die Remodellingphase kann bis zu zwei Jahre andauern.

Der Band-Score ist im Anhang abgebildet (**Kap. 7, Anhang II**).



**Abb. 22:** Auswertungsrelevante Strukturen im Beispiel eines Dünnschliffpräparates, Verlaufsrichtung der „Ossären Integration des Implantates“ und der „Umgebungsreaktion des Implantates“

### **2.7.2. Histologie-Score**

Für die histologische Auswertung wurde in Anlehnung an JANSEN et al. (1994) und DHERT et al. (1998) ein Score entwickelt, mit dessen Hilfe die Präparate mit  $\beta$ -TCP-Implantat sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden konnten. Hierfür mussten auswertungsrelevante Gewebestrukturen definiert werden, die sich in den drei ROIs befanden (vgl. **Abb. 21**). Für jede Gewebestruktur wurden Scorepunkte erstellt, die deren Charakterisierung ermöglichte. Da in jedem Präparat die Gewebestrukturen parallel vorlagen, wurde deren anteilige Verteilung für die zu bewertenden Scorepunkte über die gesamte Beurteilungszone prozentual angegeben. Die Summe eines jeden Scorepunktes ergab 100%.

Für jeden Scorepunkt, der das Knochengewebe betraf, bedeutete dies, dass zwischen lamellärem und dem osteoblastisch oder osteoklastisch überwiegendem Knochen unterschieden werden konnte. Ferner wurde danach unterschieden, ob Knorpelgewebe vorhanden war oder eine Entzündung vorherrschte. Das Gewebe der Kreuzbandplastik wurde unterteilt in straffes Bindegewebe, lockeres Granulationsgewebe oder Nekrose. Es konnte aber auch schon eine Um-differenzierung in Knochengewebe oder hyalinen Knorpel erfolgt sein. Zusätzlich erfolgte die Bewertung der „Interfaces“ (Grenz-zonen) und deren Gewebsqualitäten, die sich zwischen den versuchsrelevanten Strukturen gebildet hatten. Der Histologie-Score ist im Anhang abgebildet (**Kap. 7, Anhang I**).

### **2.7.3 Zell-Score**

Innerhalb des Zell-Scores wurden für jede ROI pro Präparat fünf Areale ausgezählt. Das Auszählen erfolgte in 10facher Vergrößerung und mit einem in das Okular integrierten, in 100 Quadrate (10 x 10 Quadrate) unterteilten Zählgitter. Mit Hilfe dieses Zählgitters konnten Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten, Fibrozyten, Fibroblasten, Chondrozyten und Lymphozyten quantitativ erfasst werden. Für das Auszählen wurde das Zählgitter derart platziert, dass die jeweilige Grenzzone das Gesamtzählgitter in zwei gleich große Hälften teilte. Jede ROI eines Präparates wurde an fünf verschiedenen Lokalisationen ausgezählt. Der Zell-Score ist im Anhang abgebildet (**Kap. 7, Anhang III**).

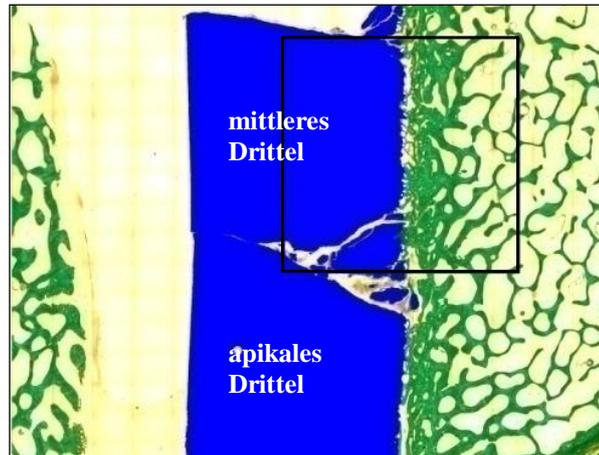
### **2.7.4 Histomorphometrie**

Mit der Histomorphometrie erfolgte eine quantitative Beurteilung der Dünnschliffpräparate, die Masson-Trichrom-Goldner gefärbt wurden. Die Digitalisierung der Präparate erfolgte über ein separates Lichtmikroskop (Typ *Axioplan*, Firma *Carl Zeiss Vision*<sup>®</sup> GmbH, Deutschland) mit Scantisch (Firma *Merzhäuser*<sup>®</sup>, Wetzlar, Deutschland) und Videoaufsatz, welches mit einem Personalcomputer (PC) verbunden war. Von einem vollautomatischen Bildanalysesystem (*KS 300*, Firma *Carl Zeiss Vision*<sup>®</sup> GmbH, Deutschland) koordiniert, kann eine digitale Kopie des Dünnschliffpräparates angefertigt werden. Um eine möglichst hohe Qualität der Kopie zu erreichen, wurde diese Kopie des Präparates aus mehreren Einzelaufnahmen der 100fachen Vergrößerung zusammengesetzt. Hierfür wurde zu Beginn der Aufnahme über die manuelle Steuerung des Scantisches ein Startpunkt festgelegt und über die Anzahl der Einzelaufnahmen in x- und y-Richtung die Größe des zu digitalisierenden Präparatebereiches definiert. Über den *RGB*-Echtfarbmodus erfolgten eine manuelle Farbanpassung, sowie eine Regelung der Farbintensität und Farbsättigung. Für die Einzelaufnahmen wurde der Scantisch über das Bildanalysesystem gesteuert. Damit innerhalb der Nachbearbeitung und Auswertung keine Größenunterschiede entstehen konnten, galten für alle Präparate dieselben Größenparameter. Auf diese Weise entstand für jedes Dünnschliffpräparat eine digitale Kopie, die aus 600 Einzelbildern zusammengesetzt war und eine Ausgabegröße von 7460 x 8400 Pixel besaß.

In der Nachbearbeitung (*Adobe*<sup>®</sup> *Photoshop*) wurde jedes digitale Abbild einer automatischen Farbkorrektur unterzogen. So konnten Artefakte über das Graduieren der Grünkurve vermindert werden. Zusätzlich wurde das  $\beta$ -TCP-Implantat dunkelblau und Sehne hellblau angefärbt. Das Färben dieser Strukturen erfolgte mit der Absicht, die Zuordnungsfehler während der Auswertung durch Anheben der Farbkontraste zu minimieren.

Die quantitative Auswertung der Strukturen erfolgte ebenfalls über das Bildanalysesystem *KS 300* (Firma *Carl Zeiss Vision*<sup>®</sup> GmbH, Deutschland). Als Vorlage diente ein auf diesen Versuch modifiziertes, in Zusammenarbeit mit der Firma *Carl Zeiss Vision*<sup>®</sup> GmbH erstelltes Makro. Dieses ermöglicht die Trennung verschiedener Gewebsstrukturen anhand ihrer

Färbungen (siehe **Tab. 4**, Goldner) und kann diese miteinander in Relation setzen. In die Software war eine Korrekturfunktion integriert, über die ergebnisverfälschende Farbartefakte vermieden werden konnten. Als Messbereich wurde ein 555 x 555 Pixel (entspricht 7 x 7 mm) großes Areal ausgewählt. Mit mikroskopischer Unterstützung wurde das Messquadrat innerhalb der digitalen Kopie so platziert, dass die jeweiligen Grenzzonen das Quadrat in zwei gleich große Hälften teilte (**Abb. 23**). Für die „ROI I“ und „ROI II“ war die Grenzzone der ursprüngliche Bohrkanal und für die „ROI III“ die ursprüngliche Implantatgrenze, die dem Sehnen-  
transplantat anliegt.



**Abb. 23:** Lage des Quadrates (7x7mm) für die quantitative Erfassung der histomorphometrischen Messparameter innerhalb der ROI Knochen/Implantat

Über das Programm *KS300* wurden die zu messenden Strukturen über die Zuweisung bestimmter charakteristischer Farbtöne markiert, die denen der histologischen Färbung (**Tab. 4**) entsprachen und durch die computergesteuerte Farbkorrektur intensiviert worden waren. Im ersten Arbeitsschritt wurde das mineralisierte Knochengewebe, im zweiten Arbeitsschritt das Osteoid und im dritten Arbeitsschritt das  $\beta$ -TCP zugewiesen. Jede der beiden untersuchenden Personen wertete jedes Areal zweimal aus.

Für diese Untersuchung wurden in Anlehnung an PARFITT (1988) folgende Parameter ausgemessen:

- 1. Prozentualer Anteil des mineralisierten Knochengewebes im definierten Messfeld (Os%)**
- 2. Prozentualer Anteil des Osteoids am mineralisierten Knochengewebe (Osteoid%)**
- 3. Prozentualer Anteil des  $\beta$ -TCPs innerhalb des definierten Messfeldes (TCP%)**

Bei korrekter Platzierung des Messquadrates lassen sich anhand dieser Parameter zu jeder Standzeit die Reife des Knochengewebes und die Resorption des  $\beta$ -TCPs bestimmen.

Unter der Knochenreife versteht man den Mineralisierungsgrad des Knochens. Dieser berechnet sich per definitionem aus dem Verhältnis von verkalktem (mineralisiertem) Knochengewebe

und einer nicht verkalkten Knochenmatrix, dem Osteoid. Bei reifem Knochen ist der Osteoidanteil minimal, während bei im Umbau befindlichem (unreifem) Knochen ein hoher Anteil messbar ist.

Mit Berechnung des Quotienten aus dem prozentualen Osteoidanteil und dem prozentualen Knochenanteil (Osteoid% / Os%) kann umgekehrt proportional die Knochenreifung dargestellt werden. Für die Objektivierung der Resorption wurde der mittlere Messwert des  $\beta$ -TCPs (TCP%) zweier T<sub>0</sub>-Präparate als 100% und mit den Messwerten der Präparate in Relation gesetzt. Ferner kann über den Quotienten aus dem prozentualen Knochen und der Resorptionsmenge (Os% / Resorptionsmenge) die Quantität des knöchernen Ersatzes des resorbierten  $\beta$ -TCPs errechnet werden.

## **2.8 Statistik**

Die Ergebnisse der histologischen und histomorphometrischen Auswertungen wurden in einer Excel-Tabelle (*Microsoft® Office*) zusammengetragen und über das Statistikprogramm *SPSS für Windows Version 12.0.1.314* (SPSS Deutschland GmbH, München) analysiert. Grafisch wurden die Ergebnisse als Balkendiagramme mit Angabe der Standardabweichungen dargestellt. Eine Normalverteilung war im Kolmogoroff-Smirnow-Test nicht nachweisbar.

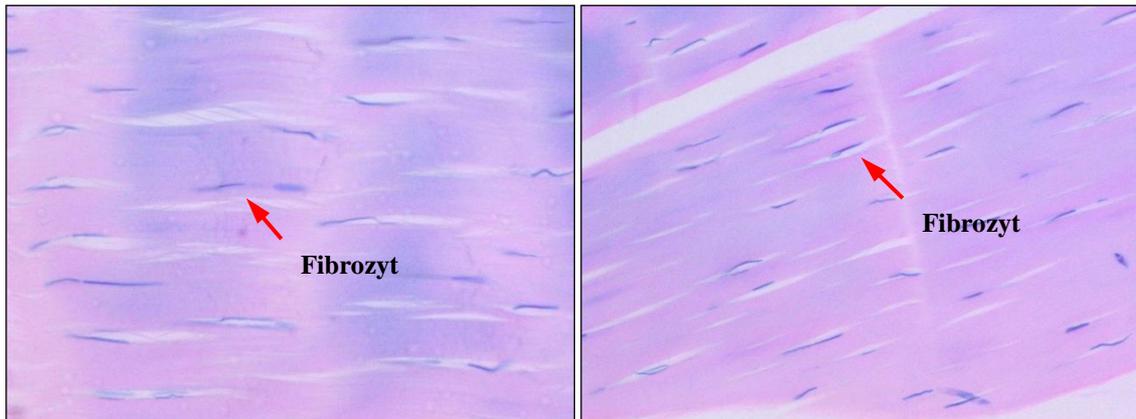
In der statistischen Auswertung wurden die beiden Transplantatgruppen (Flexorsehne vs. Patellarsehne) zu den jeweiligen Standzeiten (6, 12 und 24 Wochen) miteinander verglichen. Die in dieser Auswertung analysierten Daten sind unabhängige Parameter. Mittels eines globalen H-Tests (Kruskal-Wallis-Test) wurde überprüft, ob sich die Rangwerte der beiden Transplantatgruppen untereinander von ihrem gemeinsamen Median unterscheiden (CHRISTIAN und LUDWIG-MAYERHOFER, 2005). Zeigte die statistische Auswertung der Rangwerte einen signifikanten Unterschied zwischen den Transplantatgruppen, so erfolgte an den betreffenden unabhängigen Parametern über den Mann-Whitney-U-Test die abschließende statistische Analyse der Messwerte.

Bei nicht eindeutiger Kinetik der Ergebnisse wurde in vereinzelten Fällen (z.B. Zell-Score) zusätzlich die Veränderung der betreffenden Parameter im zeitlichen Verlauf statistisch ausgewertet. In diesen Fällen stellen diese Daten abhängige Parameter dar. Die statistische Auswertung erfolgte daher durch den Wilcoxon-Test.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p = 0,05$  festgelegt. Werte von  $p > 0,05$  wurden in den Tabellen durch „nicht signifikant“ (n. s.) ersetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mikroskopische Auswertung der intraartikulären Kreuzbandpräparate

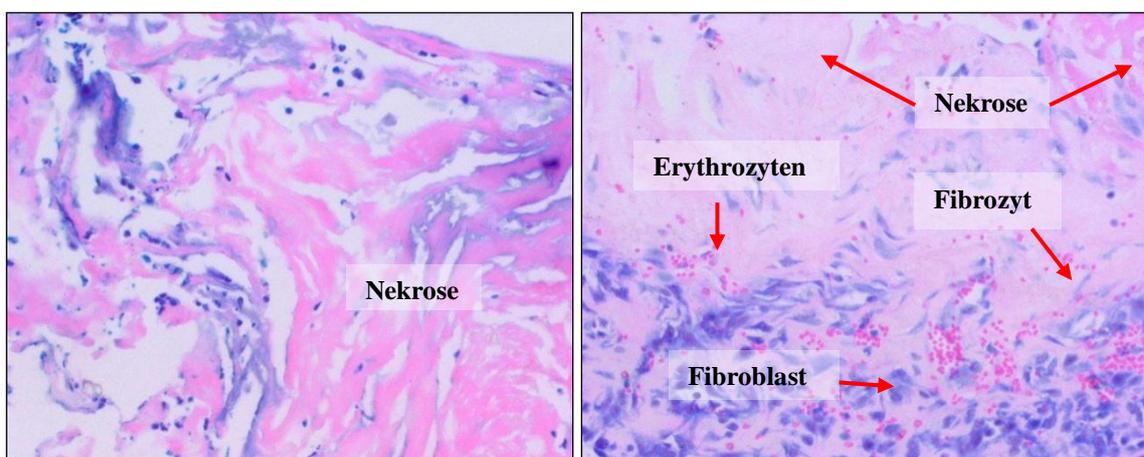


**Abb. 24:** Das zelluläre Bild (Giemsa) einer gesunden Flexorsehne (links, 125x) und einer gesunden Patellarsehne (rechts, 62,5x) zeigt in straffes Bindegewebe eingebettete Fibrozyten.

##### 3.1.1 Standzeit 6 Wochen

Bei der mikroskopischen Betrachtung der intraartikulären Kreuzbandtransplantate (siehe **Kap. 2.6.1**) zeigten sich in der Mehrheit beider Transplantatarten nach 6 Wochen Standzeit intraligamentär ein hoher Fibroblastenanteil und ein geringer Fibrozytenanteil. In den Flexorsehnenpräparaten konnten nach 6 Wochen Standzeit signifikant mehr Fibroblasten gezählt werden als in den Patellarsehnenpräparaten ( $p_{\text{Fibroblasten [6 Wochen]}} = 0,04$ ). Bezüglich der Fibrozytenanzahl fanden sich keinen Unterschiede. Ferner waren vereinzelte oberflächennahe Gefäßlumina zu finden. Zellulär dominierten Lymphozyten und Makrophagen.

Beide Transplantate ließen ausgedehnte zellfreie Areale als Hinweis auf die Nekrose erkennen. Ein Unterschied zwischen den Transplantaten war nicht nachweisbar.

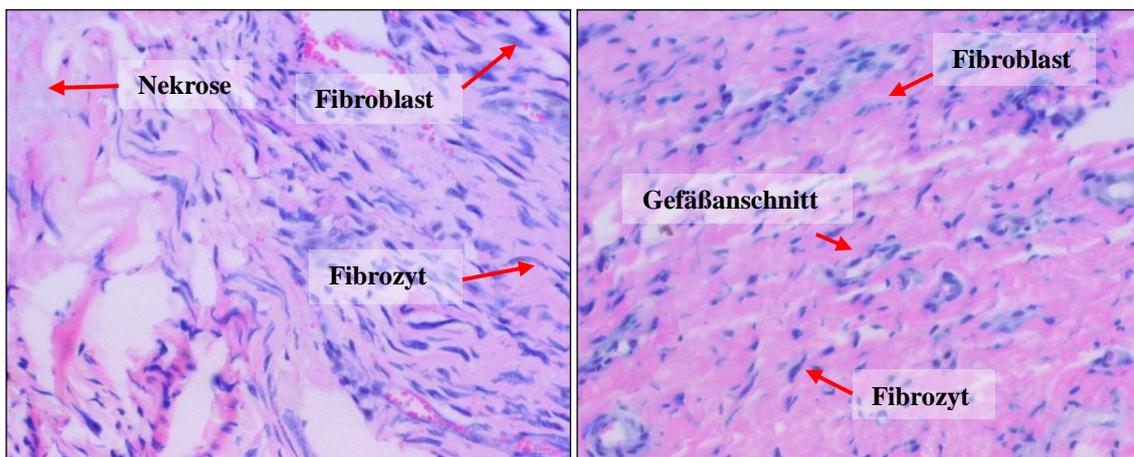


**Abb. 25:** Das zelluläre Bild der intraartikulären Transplantatanteile (Giemsa, 62,5x) einer Flexorsehne (links) und einer Patellarsehne (rechts) ist nach 6 Wochen durch große Nekroseareale geprägt und in den Randbereichen finden sich zahlreiche Fibroblasten, Granulozyten sowie Gefäßsprossungen.

### 3.1.2 Standzeit 12 Wochen

Nach 12 Wochen war das histologische Bild geprägt von einer weiter fortschreitenden Revaskularisierung und Revitalisierung der Transplantate. Die Zahl der Fibroblasten und Fibrozyten waren gegenüber den Präparaten mit 6 Wochen Standzeit angestiegen. Innerhalb der Flexorsehnenpräparate fanden sich deutlich mehr Fibroblasten als in den Patellasehnenpräparaten. Dieser Unterschied war hoch signifikant ( $p_{\text{Fibroblasten [12 Wochen]}} = 0,009$ ). Bezüglich der Fibrozyten zeigten sich keine Unterschiede. Ferner ließen sich Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen nachweisen. Auch Gefäße waren verstärkt zu verzeichnen.

In dem Zeitraum von 6 Auf 12 Wochen reduzierte sich das Nekroseausmaß bei beiden Transplantaten. Diese Reduktion verlief bei den Patellasehnentransplantaten deutlich. Nach 12 Wochen war das Nekroseausmaß bei den Flexorsehnenpräparaten mehr als viermal so groß wie das der Patellasehnenpräparate. Auch dieser Unterschied war hoch signifikant ( $p_{\text{Nekrose [12 Wochen]}} = 0,002$ ).



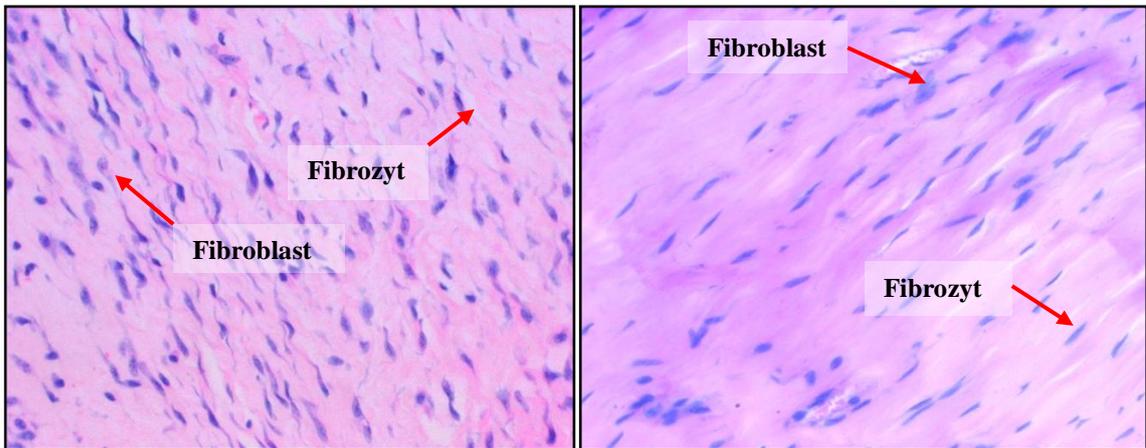
**Abb. 26:** Im zellulären Bild der intraartikulären Transplantatanteile (Giemsa, 62,5x) einer Flexorsehne (links) und einer Patellasehne (rechts) sind nach 12 Wochen die Größe der Nekroseareale sowie das Auftreten von Fibroblasten und Granulozyten rückläufig.

### 3.1.3 Standzeit 24 Wochen

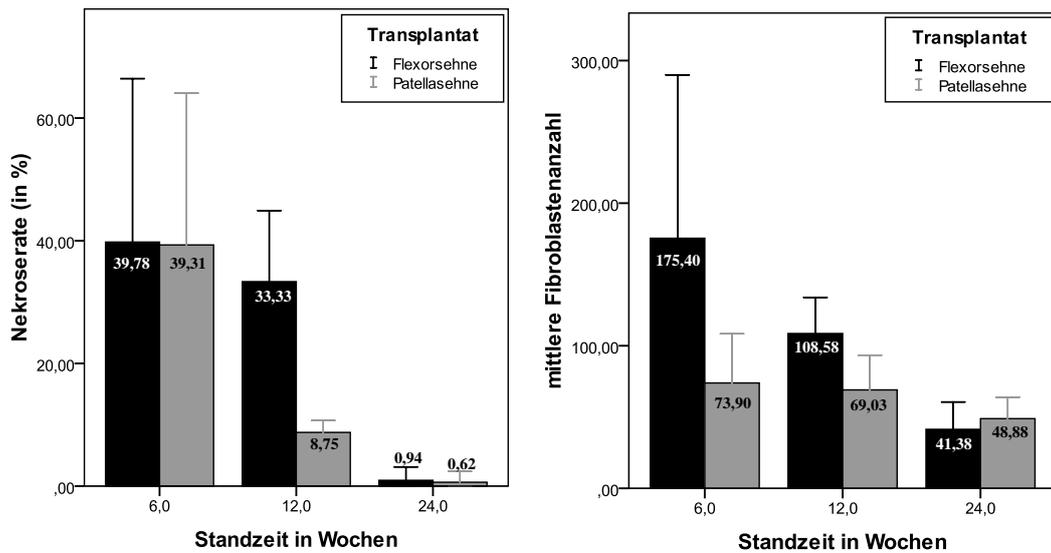
24 Wochen post operationem zeigte sich in beiden Transplantaten eine durch Fibrozyten dominierte Zell-Morphologie mit leicht erhöhter bis geringer Fibroblastendichte. Lymphozyten, Phagozyten und Gefäßlumina waren nur noch selten zu finden. Die Anzahl der Fibroblasten hatte sich weiter verringert, die Anzahl der Fibrozyten nicht nachweislich verändert. Ferner konnte eine zunehmende Längsorientierung der Kollagenbündel beobachtet werden.

Bezüglich der Nekroseareale zeigten sich beide Transplantate nach 24 Wochen Standzeit nahezu nekrosefrei. Das Nekroseausmaß belief sich zu diesem Zeitpunkt auf weniger als 1%.

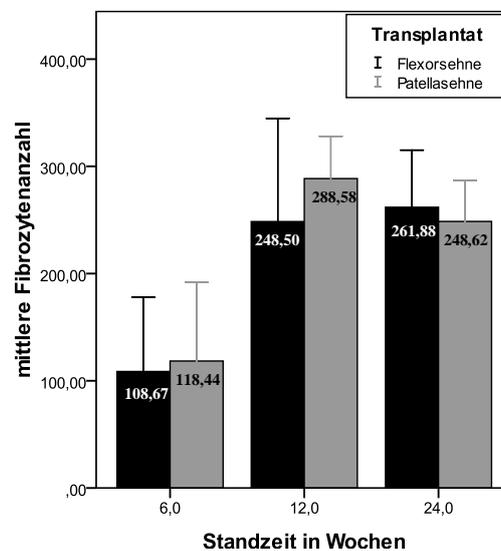
Nach 24 Wochen Standzeit konnten keine Unterschiede zwischen den Transplantaten nachgewiesen werden.



**Abb. 27:** Im zellulären Bild der intraartikulären Transplantatanteile (Giemsa, 62,5x) einer Flexorsehne (links) und einer Patellarsehne (rechts) überwiegen nach 24 Wochen die Fibrozyten bei vereinzelt auftretenden Fibroblasten.



**Abb. 28:** Zeitliche Entwicklung der Nekrose rate (links) und der Fibroblastenzahl (rechts) der intraartikulär gelegenen Sehnen transplantatanteile



**Abb. 29:** Zeitliche Entwicklung der Fibrozytenzahl der intraartikulär gelegenen Sehnen transplantate

**Tab. 5:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Band-Scores im zeitlichen Verlauf

	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexor- vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
Nekroserate (in %)	6 Wochen	39,78 ± 26,6	39,31 ± 24,8	n. s.
	12 Wochen	33,33 ± 11,6	8,75 ± 1,9	p = 0,002
	24 Wochen	0,94 ± 2,2	0,62 ± 1,8	n. s.
Fibroblasten- anzahl	6 Wochen	175,40 ± 114,6	73,90 ± 34,5	p = 0,04
	12 Wochen	108,58 ± 25,4	69,03 ± 24,4	p = 0,009
	24 Wochen	41,38 ± 19,2	48,88 ± 15,1	n. s.
Fibrozyten- anzahl	6 Wochen	108,67 ± 69,5	118,44 ± 73,5	n. s.
	12 Wochen	248,50 ± 96,3	288,58 ± 39,5	n. s.
	24 Wochen	261,88 ± 53,3	248,62 ± 38,3	n. s.

### **3.2 Visuelle, makroskopische Vorbetrachtung der Präparate im zeitlichen Verlauf**

#### **3.2.1 Makroskopische Beurteilung der ROI Knochen/Implantat**

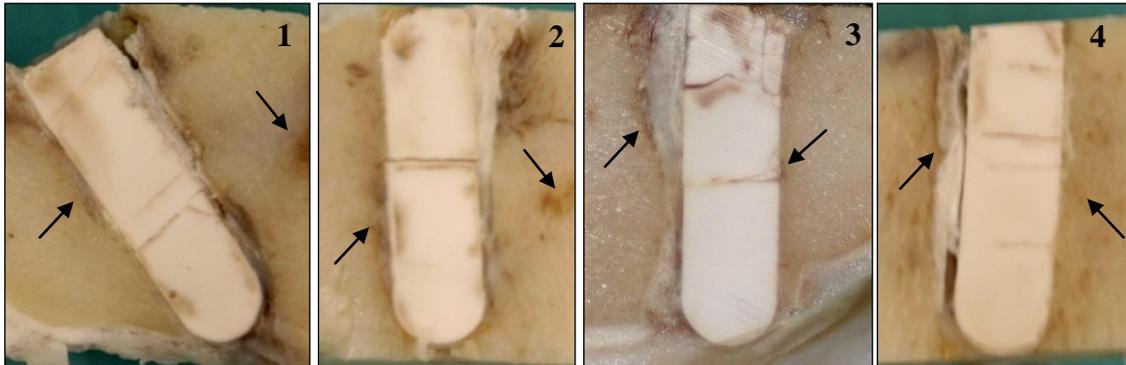
6 Wochen post implantationem waren die trans- und implantierten Strukturen innerhalb der Präparathälften makroskopisch abgrenzbar. Das umliegende spongiöse Knochengewebe und die knöcherne Grenzzone des ursprünglichen Bohrkanals wiesen vereinzelte Hämatomresiduen auf. Diese Hämatomresiduen sind in der **Abb. 30** durch Pfeile gekennzeichnet. Die Mehrheit der  $\beta$ -TCP-Implantate zeigten nach 6 Wochen Fragmentierungserscheinungen. Nach 12 Wochen Standzeit war eine Degradation der  $\beta$ -TCP-Implantate erkennbar. Die tibialen Implantate wiesen eine im Vergleich zu den femoralen stärkere Degradation auf.  $\beta$ -TCP-Implantate mit ausgeprägter Fragmentierung waren stärker degradiert. Die im tibialen Markraum gelegenen Implantatanteile der Präparate ließen eine geringere Degradation erkennen als die intra-spongiösen Anteile (**Abb. 31**). Das Knochengewebe erschien an der Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat kompakter als in der umliegenden Spongiosa.

24 Wochen post operationem war die femorale Degradation makroskopisch sicher zu erkennen. Der tibiale Degradationsvorsprung gegenüber den femoralen Implantaten zeigte sich nach dieser Standzeit deutlich ausgeprägter. Auch nach 24 Wochen Standzeit wiesen die im Markraum gelegenen Implantatanteile einzelner tibialer Präparate eine geringere Degradation auf als die intraspongiösen Anteile (**Abb. 32**).

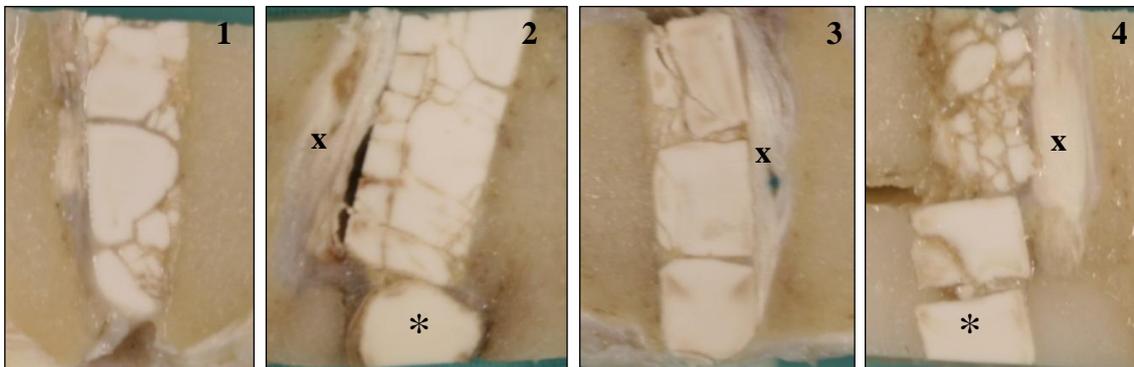
#### **3.2.2 Makroskopische Beurteilung der ROI Knochen/Sehne**

Nach 6 Wochen Standzeit zeigten einige Präparate der Flexorsehnengruppe eine semizirkuläre Einscheidung der Implantate durch das Transplantat. Dieses Erscheinungsbild war am stärksten an den gelenknahen Dritteln der Implantate ausgeprägt. Knochenblöcke verhindern das Auf-fasern der Transplantatenden. Die Knochenblöcke der Patellasehnen waren nur noch vereinzelt lokalisierbar. Hämatomresiduen machten die Strukturen abgrenzbar. Nach 12 Wochen fanden sich keine Hämatomresiduen mehr. Bei beiden Operationsmethoden war das Sehnen-transplantat

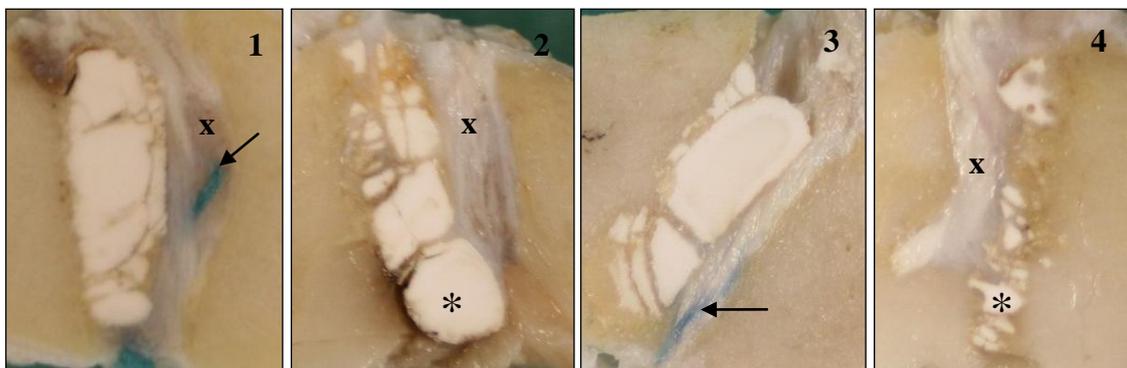
als solches zweifelsfrei identifizierbar, wirkte jedoch verbreitert. Im Intervall von 12 auf 24 Wochen Standzeit waren makroskopisch keine weiteren Veränderungen des Erscheinungsbildes eruierbar (**Abb. 31 & Abb. 32**).



**Abb. 30:** Makroskopischer Eindruck der femoralen (1&3) und tibialen (2&4) Präparate mit Flexorsehnen- (1&2) sowie Patellarsehnen- (3&4) Transplantat nach 6 Wochen Standzeit; Der Bohrkanal und das spongiöse Knochengewebe zeigen Residuen eines Hämatoms (Pfeil). Das  $\beta$ -TCP-Implantat weist Spuren der physikalischen Degradation (Risse und Fragmentierung) auf.



**Abb. 31:** Makroskopischer Eindruck der femoralen (1&3) und tibialen (2&4) Präparate mit Flexorsehnen- (1&2) sowie Patellarsehnen- (3&4) Transplantat nach 12 Wochen Standzeit; Der intramedulläre Implantatanteil weist im Vergleich zum intraossärem Anteil geringere Degradation auf (\*). Die Transplantate erscheinen verbreitert (x).



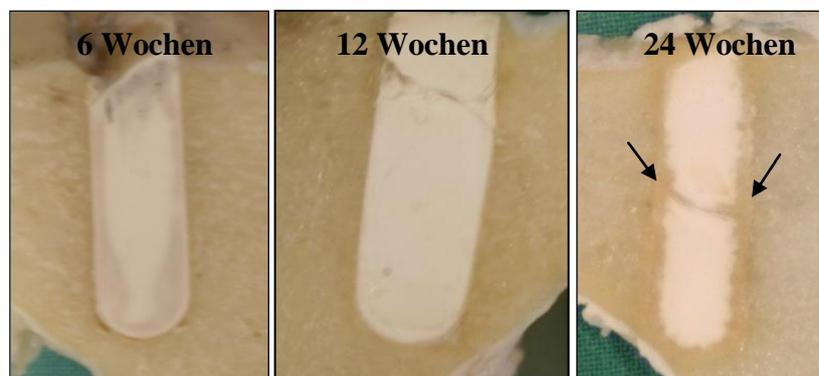
**Abb. 32:** Makroskopischer Eindruck der femoralen (1&3) und tibialen (2&4) Präparate mit Flexorsehnen- (1&2) sowie Patellarsehnen- (3&4) Transplantat nach 24 Wochen Standzeit; Vereinzelt intramedulläre Implantatanteile weisen auch nach 24 Wochen noch geringere Degradation auf (\*). Im Bereich des mittleren und apikalen Drittel sind vereinzelt die Mersilene-Haltefäden (Pfeile) vom Zeitpunkt der Operation innerhalb der weiterhin verbreiterten Transplantate (x) zu finden. Die Verbreiterung erscheint prominenter als nach 12 Wochen.

### **3.2.3 Makroskopische Beurteilung der ROI Sehne/Implantat**

In der ROI Sehne/Implantat konnte makroskopisch bei den Präparaten beider Transplantate nach 6 Wochen Standzeit keine Gewebsveränderung und Degradationserscheinungen des  $\beta$ -TCPs nachgewiesen werden. Die Mehrheit der  $\beta$ -TCP-Implantate zeigte Fragmentierungserscheinungen. Abhängig von der Fragmentierungsintensität fielen nach 12 Wochen vereinzelt leichte Degradationsspuren auf. Bei stark fragmentierten  $\beta$ -TCP-Implantaten war 24 Wochen post operationem makroskopisch Knochengewebe zwischen Transplantat und Implantat zu finden.

### **3.2.4 Makroskopische Beurteilung des „ $\beta$ -TCPs als Knochenersatzstoff“**

Die Knochenersatzimplantate zeigten im Vergleich zu den „press fit“-Implantaten für die jeweilige Standzeit eine deutlich geringere Fragmentierungsrate. Erste Anzeichen einer Degradation waren nach 12 Wochen erkennbar. Die Präparate wiesen an der Knochen/Implantat-Grenzfläche eine Verdichtung der Spongiosa auf. In **Abb. 33** ist diese Verdichtung bei dem Präparat nach 24 Wochen Standzeit deutlich zu erkennen (Pfeil).

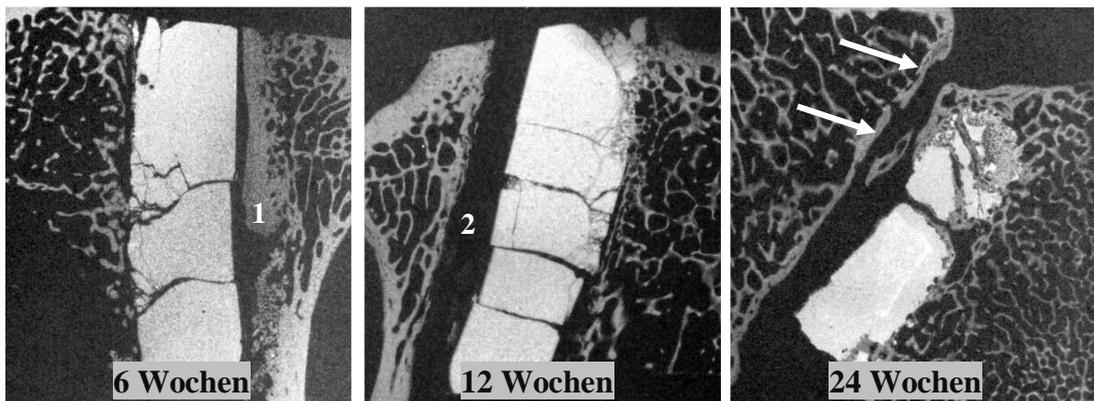


**Abb. 33:** Makroskopischer Eindruck der Knochenersatz-Implantate zeigt im zeitlichen Verlauf eine zunehmende Verdichtung der Spongiosa (Pfeil)

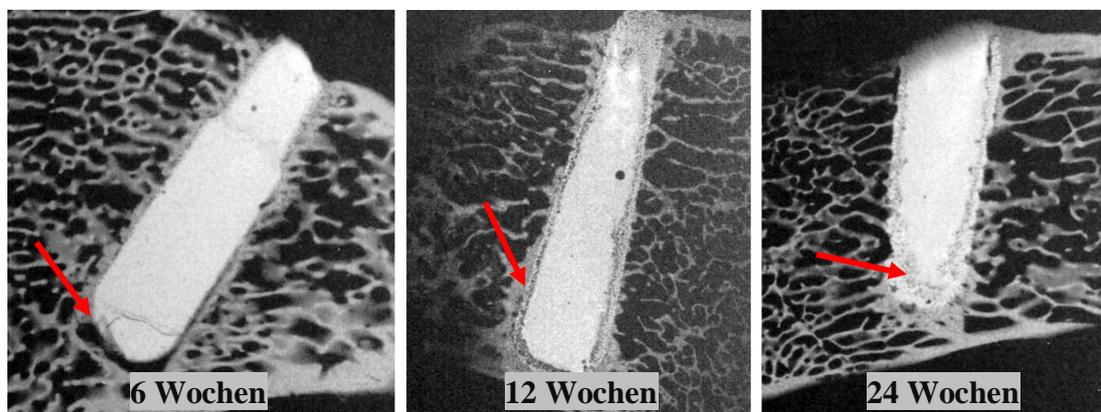
### **3.3 Mikroradiographie**

Die Befunde der makroskopischen Beurteilung konnten in der mikroradiographischen Untersuchung bestätigt werden. Die Grenzonen waren deutlich abgrenzbar. In der Mikroradiographie wies das  $\beta$ -TCP-Implantat bereits nach 6 Wochen über den weiteren Versuchsverlauf progrediente knöcherne Integrationsspuren auf. Die knöcherne Integration zeigte sich in einer Veränderung der Grauwerte an der Grenzfläche. Die Transplantate konnten in der Mikroradiographie nicht dargestellt werden. Der Knochenblock der Patellasehnentransplantate war bei einem Großteil der Präparate nach 24 Wochen vollständig in den Wirtsknochen eingewachsen. An der Grenzzone Knochen/Sehne zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine Verdichtung des

knöchernen Gewebes. Diese Verdichtung stellt sich in den mikroradiographischen Bildern als sekundäre Kortikalis dar (**Abb. 34**, Pfeile).



**Abb. 34:** Mikroradiographischer Eindruck der „press fit“- $\beta$ -TCP-Implantate am Beispiel der tibialen Präparate beider Transplantatarten; Der Knochenblock der Patellasehne (1) ist nach 6 Wochen deutlich lokalisierbar und das Sehnentransplantat innerhalb des Bohrkanals ist nicht darstellbar (2). Nach 24 Wochen hat sich an der Grenzzone Knochen/Sehne eine sekundäre Kortikalis (Pfeil) gebildet.



**Abb. 35:** An den mikroradiographischen Aufnahmen der „Knochenersatz- $\beta$ -TCP-Implantate“ können die Degradationsfortschritte im zeitlichen Verlauf beobachtet werden (Pfeile) [MAYR, 2007a]

### **3.4 Histologische Auswertung der $\beta$ -TCP-Implantat-Präparate (Histologie-Score)**

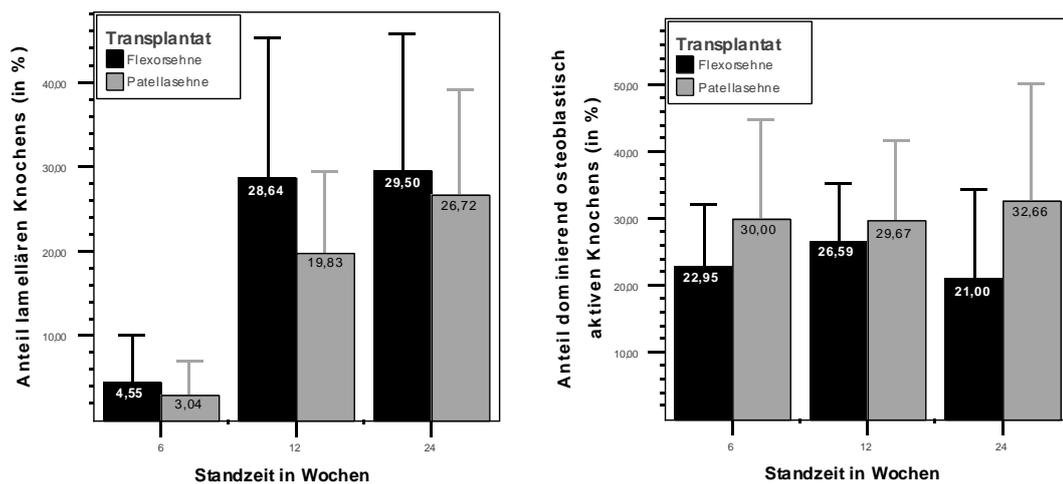
In der Auswertung des Histologie-Scores ergab sich zwischen den Befunden der Untersuchenden eine mittlere Abweichung von  $9,57 \pm 10,38\%$ .

#### **3.4.1 Histologische Auswertung der ROI Knochen/Implantat**

Bei beiden Transplantatgruppen war eine progrediente Zunahme des in das  $\beta$ -TCP einwachsenden Knochengewebes nachweisbar. Der prozentuale Anteil des lamellären Knochens stieg von 6 auf 12 Wochen deutlich an (**Abb. 36** [links]). Die Flexorsehnenpräparate erreichten im Vergleich zu den Patellasehnenpräparaten höhere Werte. Der Unterschied zwischen den beiden Transplantaten war nicht signifikant ( $p_{[12 \text{ Wochen}]} = 0,14$ ). Nach 24 Wochen bestand kein Unterschied mehr.

Beide Transplantatgruppen zeigten über den gesamten Versuchszeitraum konstante Werte bezüglich des osteoblastisch aktiven Knochengewebes (**Abb. 36** [rechts]). Nach 24 Wochen Standzeit konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Transplantaten nachgewiesen werden ( $p_{[24 \text{ Wochen}]} = 0,03$ ).

Zu allen Standzeiten war eine phagozytäre Reaktion ohne eindeutige Kinetik erkennbar. Innerhalb des physikalisch degradierten  $\beta$ -TCPs befand sich lockeres Granulations- und Fasergewebe, welches nach 6 Wochen Standzeit in beiden Gruppen etwa die Hälfte des neu gebildeten Gewebes einnahm. Nach 12 Wochen verringerte sich der Anteil an Bindegewebe. Der Rückgang war in der Flexorsehnengruppe deutlicher. Dieser Unterschied war nicht signifikant ( $p_{[12 \text{ Wochen}]} = 0,07$ ).



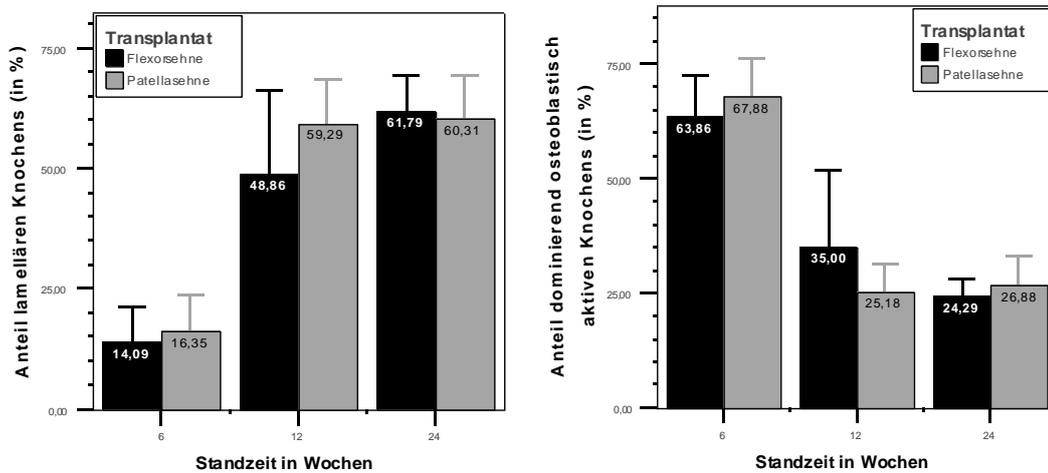
**Abb. 36:** Zeitlicher Verlauf des in das  $\beta$ -TCP einwachsenden Anteils „lamellären Knochens“ (links; MAYR, 2007a) und „dominierend osteoblastisch aktiven Knochens“ (rechts) der ROI Knochen/Implantat

**Tab. 6:** Mittelwerte mit Standardabweichung und  $p$ -Werte des Histologie-Scores für das in das  $\beta$ -TCP einwachsende Knochengewebe in der ROI Knochen/Implantat

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
lamellärer Knochen (in %)	6 Wochen	4,55 ± 5,5	3,04 ± 3,9	n. s.
	12 Wochen	28,64 ± 16,5	19,83 ± 9,5	n. s.
	24 Wochen	29,50 ± 16,2	26,72 ± 12,5	n. s.
dominierend osteoblastisch aktiver Knochen (in %)	6 Wochen	22,95 ± 9,0	30,00 ± 14,7	n. s.
	12 Wochen	26,59 ± 8,6	29,67 ± 12,1	n. s.
	24 Wochen	21,00 ± 13,4	32,66 ± 17,6	p = 0,03

Nach 6 Wochen fand sich in der Umgebung des ursprünglichen Bohrkanals überwiegend osteoblastisch aktives Knochengewebe. Ab der 12. postoperativen Woche überwog das lamelläre Knochengewebe. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Flexorsehnenpräparate gegenüber den Patellasehnenpräparaten weniger lamelläres und mehr osteoblastisches Knochengewebe. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (**Abb. 37**;  $p_{\text{lamellärer Knochen [12 Wochen]}} = 0,06$ ;  $p_{\text{osteoblastisch aktiver Knochen [12 Wochen]}} = 0,08$ ) und nach 24 Wochen nicht mehr nachweisbar. In allen

Präparaten fanden sich in der Umgebung des Bohrkanals vereinzelt lockeres zellreiches Bindegewebe mit Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen. Nach 6 Wochen traten diese Entzündungszeichen innerhalb der Flexorsehnenpräparate deutlicher auf. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p_{\text{lockeres Bindegewebe [6 Wochen]}} = 0,06$ ).



**Abb. 37:** Zeitlicher Verlauf des Anteils „lamellären Knochens“ (links; MAYR, 2007a) und „dominierend osteoblastisch aktiven Knochens“ (rechts) in der Umgebung des Bohrkanals der ROI Knochen/Implantat

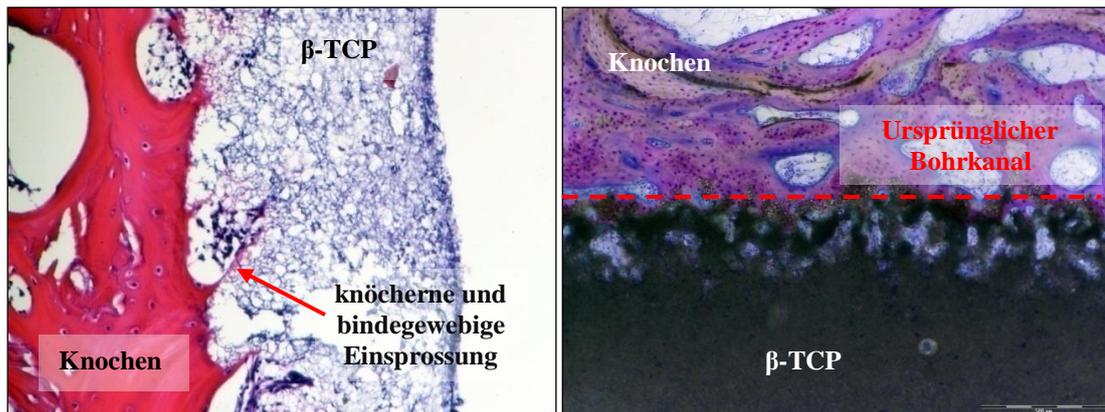
**Tab. 7:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Histologie-Scores im zeitlichen Verlauf für die Umgebung des Bohrkanals in der ROI Knochen/Implantat

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
lamellärer Knochen (in %)	6 Wochen	4,55 ± 5,5	3,04 ± 3,9	n. s.
	12 Wochen	28,64 ± 16,5	19,83 ± 9,5	n. s.
	24 Wochen	29,50 ± 16,2	26,72 ± 12,5	n. s.
dominierend osteoblastisch aktiver Knochen (in %)	6 Wochen	22,95 ± 9,0	30,00 ± 14,7	n. s.
	12 Wochen	26,59 ± 8,6	29,67 ± 12,1	n. s.
	24 Wochen	21,00 ± 13,4	32,66 ± 17,6	n. s.

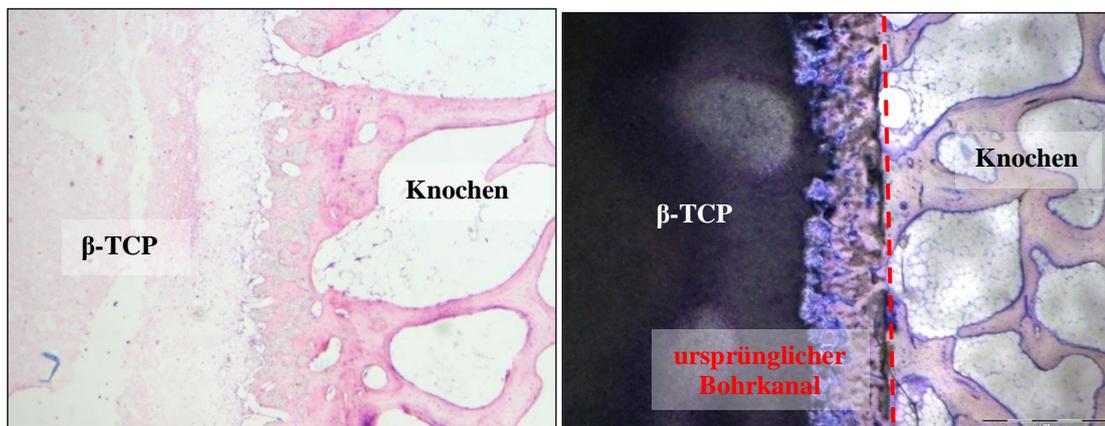
Am Knochen-Implantat-Interface war bei den Patellasehnenpräparaten nach 6 Wochen Standzeit ein etwa 54%iger direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat nachweisbar. Die Flexorsehnenpräparate zeigten zu diesem Zeitpunkt einen etwa 36%igen direkten Kontakt. Dieser Unterschied erwies sich als nicht signifikant ( $p_{\text{direkter Kontakt [6 Wochen]}} = 0,08$ ). Nach 12 Wochen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Sehnenpräparaten mehr festgestellt werden. Im Intervall von 12 auf 24 Wochen nahmen die anteiligen Werte des „direkten Knochen-Implantat-Kontaktes“ nicht mehr zu (**Abb. 41** [links]).

Lockeres Bindegewebe zeigte sich am Interface 6 Wochen post operationem zu  $42,50 \pm 27,9$  % in den Flexorsehnenpräparaten und zu  $26,35 \pm 27,9$  % in den Patellasehnenpräparaten. Im Zeitraum auf 12 Wochen waren die Anteile in den Flexorsehnen  $16,14 \pm 10,0$  % und in den Patellasehnen auf  $1,43 \pm 9,4$  % abgesunken. Der Unterschied war zu keiner der genannten Standzeiten signifikant ( $p_{\text{lockeres Bindegewebe [6 Wochen]}} = 0,13$ ;  $p_{\text{lockeres Bindegewebe [12 Wochen]}} = 0,16$ ). Die im Interface

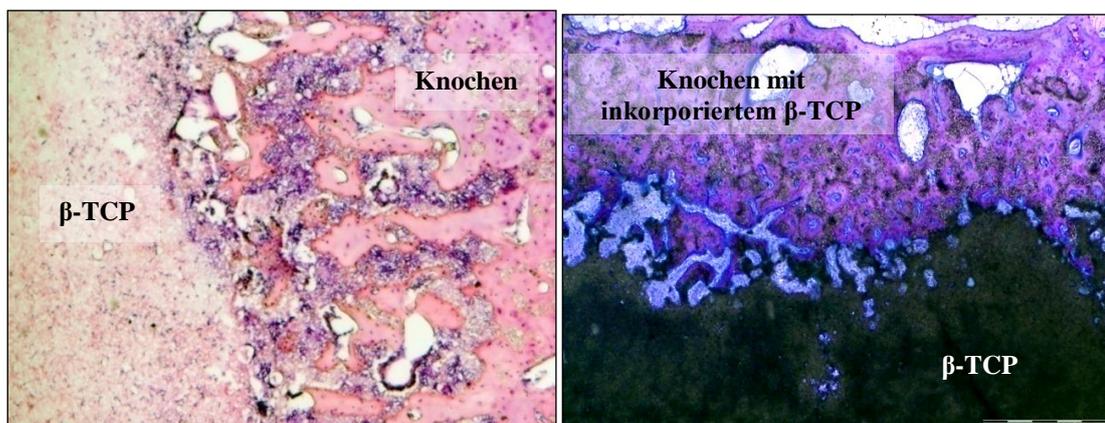
der ROI Knochen/Implantat aufgetretenen zellulären Entzündungszeichen betragen weniger als 10% der Grenzzone in beiden Transplantatgruppen. Im Zeitraum von 6 auf 12 Wochen Standzeit war die stärkste Veränderungen der Interface-Morphologie zu eruieren.



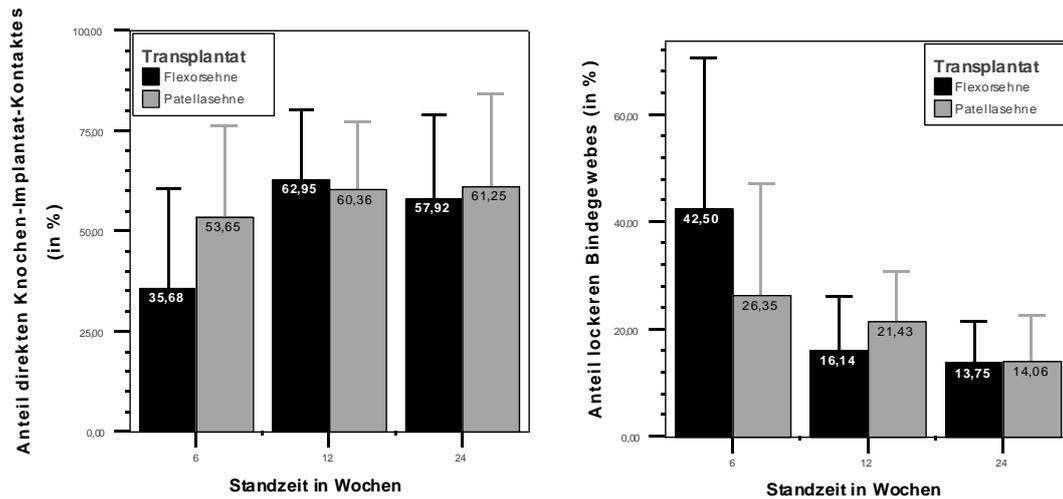
**Abb. 38:** Das mikroskopische Bild der ROI Knochen/Implantat nach 6 Wochen Standzeit zeigt in den entkalkten Präparaten (links; HE, 31,25x) knöcherne und bindegewebige Einsprossungen in das Innere des Implantates. Auf der Oberfläche des  $\beta$ -TCPs in den unentkalkten Dünnschliff-Präparates (rechts; Giemsa, 31,25x) sind Degradationsspuren erkennbar.



**Abb. 39:** Das mikroskopische Bild der ROI Knochen/Implantat nach 12 Wochen Standzeit zeigt in den entkalkten (links; Giemsa, 12,5x) und den unentkalkten Dünnschliff-Präparaten (rechts; Giemsa, 12,5x) eine progrediente Degradation des  $\beta$ -TCPs.



**Abb. 40:** Das mikroskopische Bild der ROI Knochen/Implantat nach 24 Wochen Standzeit zeigt in den entkalkten (links; Giemsa 31,25x) und den unentkalkten Dünnschliff-Präparates (rechts; Giemsa, 12,5x) von Knochen inkorporierte  $\beta$ -TCP-Fragmente



**Abb. 41:** Zeitlicher Verlauf des Anteils „direkten Knochen-Implantat-Kontaktes“ (links) und des „lockeren Bindegewebes“ (rechts) innerhalb des Interfaces der ROI Knochen/Implantat

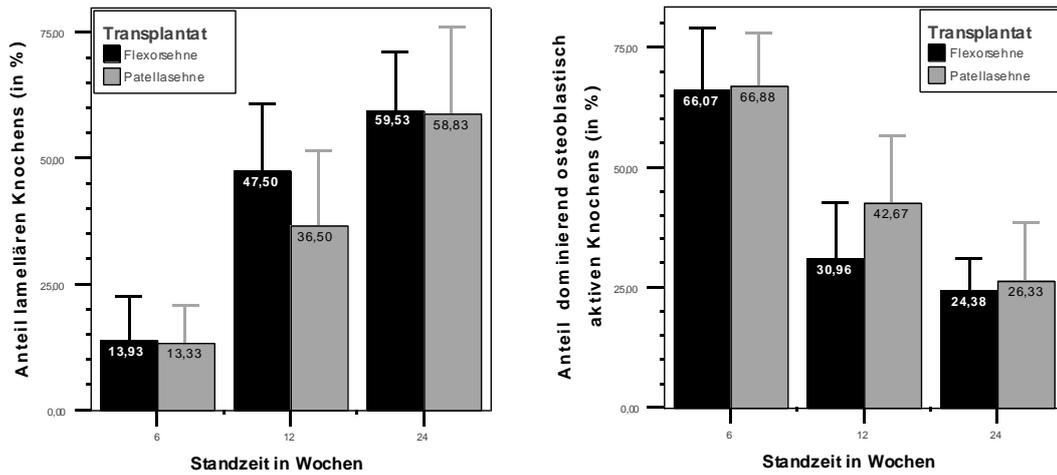
**Tab. 8:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Histologie-Scores im zeitlichen Verlauf für das Interface der ROI Knochen/Implantat

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
Direkter Knochen-Implantat- Kontakt (in %)	6 Wochen	35,68 ± 22,9	53,65 ± 22,3	p = 0,08
	12 Wochen	62,95 ± 17,2	60,36 ± 16,6	n. s.
	24 Wochen	57,92 ± 20,8	61,25 ± 22,8	n. s.
lockeres Bindegewebe (in %)	6 Wochen	42,50 ± 27,9	26,35 ± 20,8	n. s.
	12 Wochen	16,14 ± 10,0	21,43 ± 9,2	n. s.
	24 Wochen	13,75 ± 7,8	14,06 ± 8,6	n. s.

### 3.4.2 Histologische Auswertung der ROI Knochen/Sehne

In der ROI Knochen/Sehne überwog 6 Wochen post operationem bei beiden Transplantaten mit mehr als 60 % der „osteoblastisch aktive Knochen“. Im weiteren Verlauf erfuhr der mittlere Anteil des „lamellären Knochen“ einen deutlichen Zuwachs und der des „osteoblastisch aktiver Knochen“ eine deutliche Reduktion (**Abb. 42**). Nach 12 Wochen Standzeit zeigten die Flexorsehnenpräparate mehr „lamellären Knochen“ und weniger „osteoblastisch aktiven Knochen“ als die Patellasehnenpräparate. Der Unterschied war für den „lamellären Knochen“ nicht signifikant ( $p_{\text{lamellärer Knochen [12 Wochen]}} = 0,06$ ). Für den „osteoblastisch aktiven Knochen“ war der Unterschied signifikant ( $p_{\text{osteoblastisch aktiver Knochen [12 Wochen]}} = 0,02$ ). Nach 24 Wochen waren keine Unterschiede zwischen den Transplantaten nachweisbar.

Des Weiteren konnte in den Präparaten beider Transplantate in der ROI Knochen/Sehne ein über den Versuchszeitraum konstanter und geringer Anteil an „Knorpel-Faser-Calli“ eruiert werden. Ebenfalls traten im geringen Maße „zelluläre Entzündungszeichen“ auf. Unterschiede waren diesbezüglich nicht zu erkennen.



**Abb. 42:** Zeitlicher Verlauf des Anteils „lamellären Knochens“ (links; MAYR, 2007a) und des Anteils „dominierend osteoblastisch aktiven Knochens“ (rechts) des knöchernen Anteils in der ROI Knochen/Sehne

**Tab. 9:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Histologie-Scores im zeitlichen Verlauf für die ossären Anteile der ROI Knochen/Sehne

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
lamellärer Knochen (in %)	6 Wochen	13,93 ± 8,4	13,33 ± 7,5	n. s.
	12 Wochen	47,50 ± 13,3	36,50 ± 14,8	n. s.
	24 Wochen	59,53 ± 11,5	58,83 ± 17,2	n. s.
dominierend osteoblastisch aktiver Knochen (in %)	6 Wochen	66,07 ± 12,9	66,88 ± 11,2	n. s.
	12 Wochen	30,96 ± 11,7	42,67 ± 13,9	p = 0,02
	24 Wochen	24,38 ± 6,6	26,33 ± 12,2	n. s.

Die qualitative Auswertung des Sehnenanteils innerhalb der ROI Knochen/Sehne zeigte konstante Werte „dominierend osteoblastisch aktiven Knochens“ und „hyalinen Knorpels oder Faserknorpels“. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Transplantaten nachgewiesen werden.

Im Mittel waren  $65,00 \pm 22,6\%$  der Flexorsehnen-Transplantate und  $35,19 \pm 26,0\%$  der Patellasehnen nach 6 Wochen nekrotisch. Auch nach 12 Wochen lag der mittlere Nekroseanteil der Flexorsehnen mit  $44,09 \pm 33,6\%$  mehr als doppelt so hoch wie der der Patellasehnen mit  $20,50 \pm 25,9\%$ . Der Unterschied war zu beiden genannten Standzeiten signifikant ( $p_{\text{Nekrose [6 Wochen]}} = 0,003$ ;  $p_{\text{Nekrose [12 Wochen]}} = 0,04$ ). Nach 24 Wochen Standzeit war kein Unterschied mehr nachweisbar. Über den Versuchsverlauf erfuhren beide Transplantate eine Reduktion des Nekroseumfangs (Abb. 43 [rechts]).

Nach 6 Wochen Standzeit konnte bei den Patellasehnen-Transplantaten im Mittel  $33,65 \pm 21,5\%$  des Transplantates als Sehnen- oder Sehnenähnliches Gewebe mit Längsausrichtung der Kollagenbündel und vereinzelt Fibrozyten (straffes kollagenes Bindegewebe) identifiziert werden. Bei den Flexorsehnen-Transplantaten belief sich dieser Wert auf  $19,23 \pm 20,8\%$ . Dieser Unterschied war signifikant ( $p_{\text{straffes Bindegewebe [6 Wochen]}} = 0,03$ ). Über den weiteren Versuchsverlauf stiegen diese

Werte bei beiden Transplantaten an. Nach 12 und 24 Wochen Standzeit gab es keinen Unterschied zwischen den Transplantaten mehr (Abb. 43 [links]). Lockeres, zellreiches Bindegewebe mit Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen traten in dem Sehnenanteil der ROI Knochen/Sehne bei beiden Transplantaten nur in geringem Ausmaß auf.

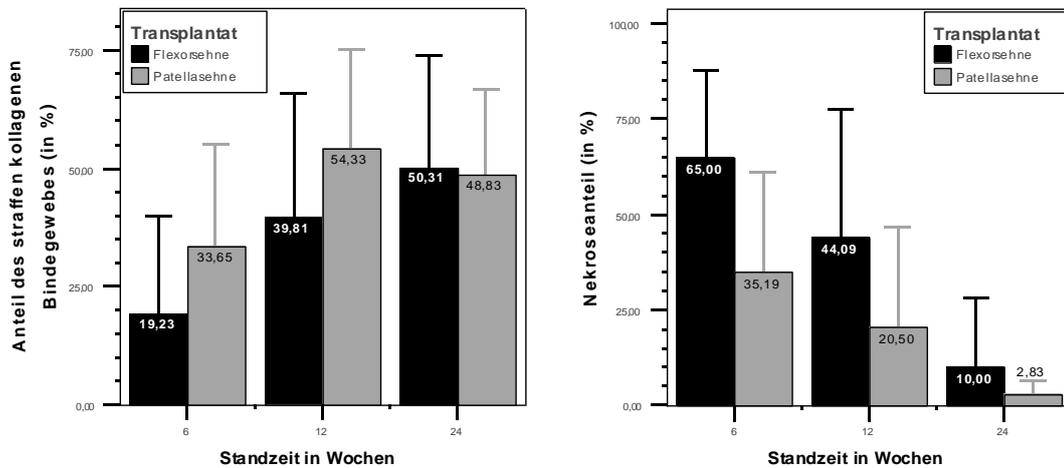


Abb. 43: Zeitlicher Verlauf des Anteils des „straffen kollagenen Bindegewebes“ (links) und des „Nekroseanteils“ (rechts) des Sehnen transplantates in der ROI Knochen/Sehne

Tab. 10: Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Histologie-Scores im zeitlichen Verlauf für die sehnenanteile der ROI Knochen/Sehne

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
straffes kollagenes Bindegewebes (in %)	6 Wochen	19,23 ± 20,8	33,65 ± 21,5	p = 0,03
	12 Wochen	39,81 ± 26,3	54,33 ± 20,9	n. s.
	24 Wochen	50,31 ± 23,6	48,83 ± 17,9	n. s.
Nekrose (in %)	6 Wochen	65,00 ± 22,6	35,19 ± 26,0	p = 0,003
	12 Wochen	44,09 ± 33,6	20,50 ± 25,9	p = 0,04
	24 Wochen	10,00 ± 18,1	2,83 ± 3,8	n. s.

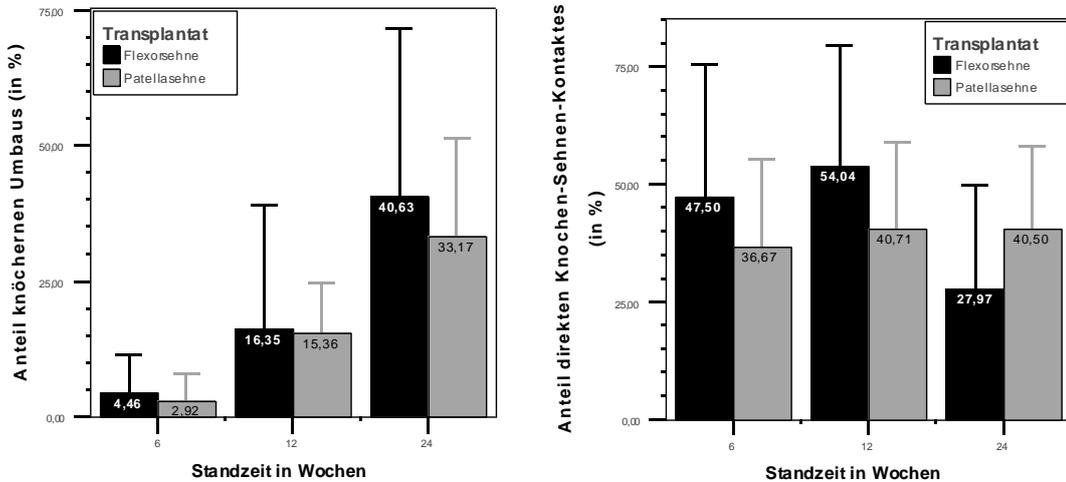
Innerhalb des Interfaces war über den Versuchszeitraum eine deutliche Zunahme des mittleren Anteils des „knöchernen Umbaus“ zu erkennen. Dieser Zuwachs erfolgte bei beiden Transplantaten in gleicher Intensität. Den größten Zuwachs erfuhren die Werte in dem Zeitraum von 12 auf 24 Wochen Standzeit (Abb. 44 [links]).

Nach 24 Wochen wiesen die Flexorsehnenpräparate anteilig weniger „direkten Knochen-Sehnen-Kontakt“ auf als die Patellasehnenpräparate. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p_{\text{direkter Kontakt [24 Wochen]}} = 0,06$ ; Abb. 44 [rechts]). Ferner konnte über den gesamten zeitlichen Verlauf ein konstant bestehender Anteil einer bindegewebigen Zwischenschicht innerhalb des Interfaces beobachtet werden.

Die dem Wirtsknochen anliegenden Knochenblöcke der Patellasehnen transplantate waren mit Abschluss der 12. Woche ossär integriert. Der mittlere „Anteil lamellären Knochens“ stieg von 6 auf 12 Wochen auf einen mehr als doppelt so hohen Wert an. Parallel hierzu sank im gleichen Zeitraum der mittlere „Anteil des dominierend osteoblastisch aktivierten Knochens“. Die

mittleren Werte beider Anteile zeigten keine Veränderung in dem Zeitraum von 12 auf 24 Wochen Standzeit.

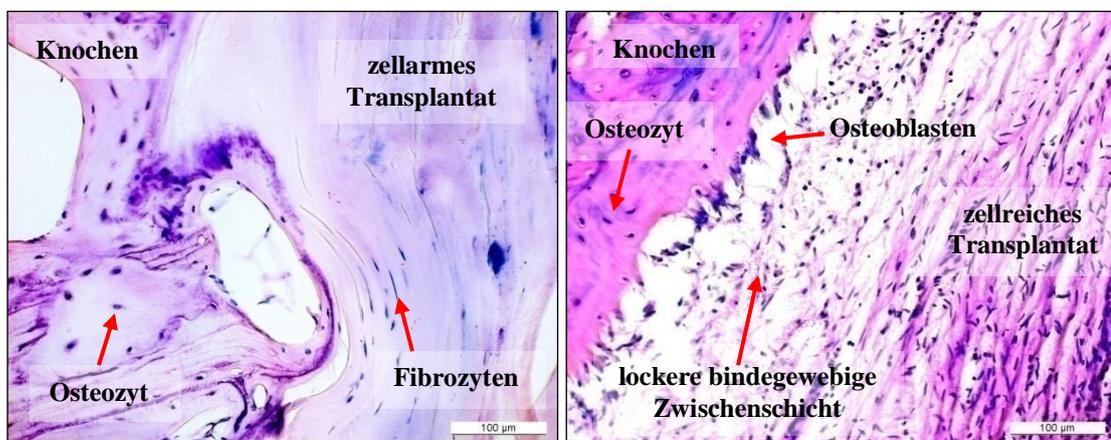
An der Sehnen-Knochen-Übergangszone zeigten sich über den gesamten Versuchszeitraum konstante Werte für „osteoblastisch und/oder osteoklastisch aktiven Knochen“.



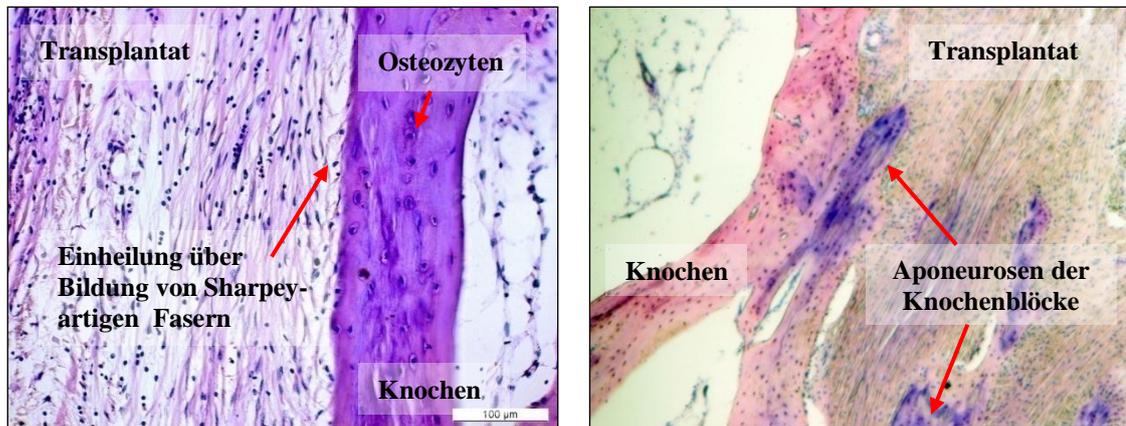
**Abb. 44:** Zeitlicher Verlauf des Anteils „knöchernen Umbaus“ (links; MAYR, 2007a) und des Anteils „direkten Knochen-Sehnen-Kontaktes“ (rechts) innerhalb des Interfaces der ROI Knochen/Sehne

**Tab. 11:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Histologie-Scores im zeitlichen Verlauf für das Interface der ROI Knochen/Sehne

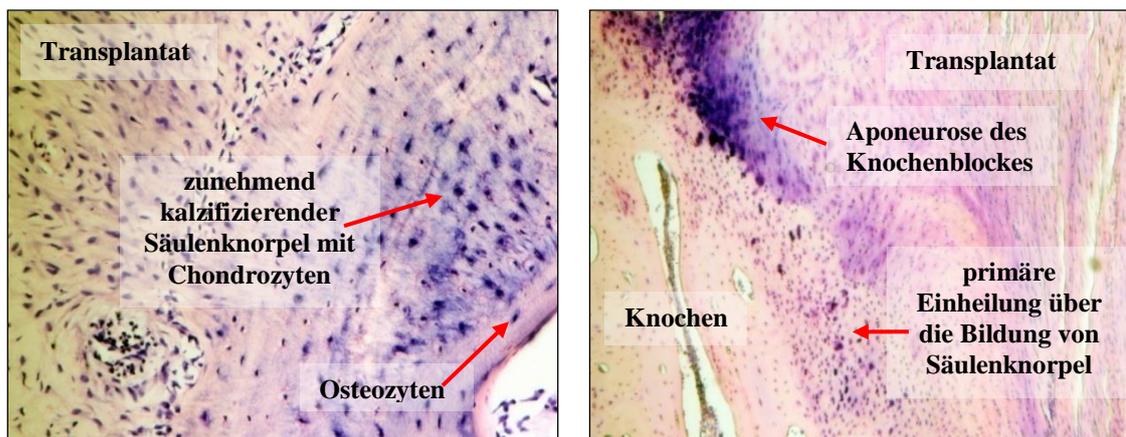
Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellarsehne)
		Flexorsehne	Patellarsehne	
Knöcherner Umbau (in %)	6 Wochen	4,46 ± 6,7	2,92 ± 4,9	n. s.
	12 Wochen	16,35 ± 22,6	15,36 ± 9,3	n. s.
	24 Wochen	40,63 ± 30,9	33,17 ± 18,2	n. s.
Direkter Kontakt Sehne-Knochen (in %)	6 Wochen	47,50 ± 28,0	36,67 ± 18,7	n. s.
	12 Wochen	54,04 ± 25,5	40,71 ± 18,2	n. s.
	24 Wochen	27,97 ± 21,7	40,50 ± 17,6	n. s.



**Abb. 45:** Das mikroskopische Bild der ROI Knochen/Sehne nach 6 Wochen Standzeit zeigt ein zellarmes Flexorsehnenpräparat (links; Giemsa, 62,5x; MAYR, 2007a). Das Patellarsehnenpräparat (rechts; HE, 62,5x) erweist sich nach 6 Wochen als zellreicher. Ferner zeichnet sich aufgrund des fehlenden direkten Knochen-Sehnen-Kontaktes (Zwischenschicht aus lockerem Bindegewebe) die beginnende sekundäre Einheilung des Transplantates ab.



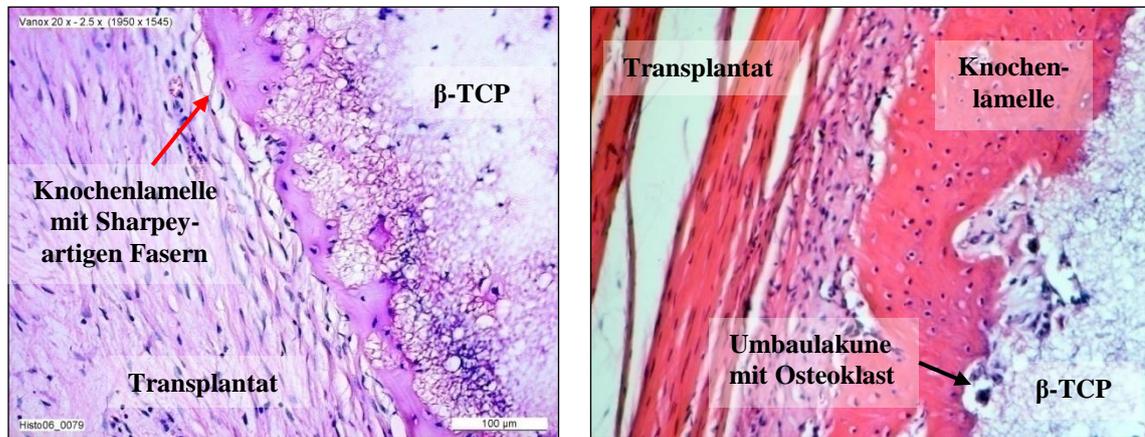
**Abb. 46:** Das mikroskopische Bild der ROI Knochen/Sehne nach 12 Wochen Standzeit zeigt am Beispiel eines Flexorsehnenpräparates (links; Giemsa, 62,5x) die sekundäre Einheilung des Transplantates über die Bildung von Sharpey-artigen Fasern. Die Knochenblöcke der Patellasehnenpräparate (rechts; Giemsa, 31,25x) werden knöchern integriert und sind teilweise nur durch den Knorpelanteil ihrer Aponeurosen abgrenzbar.



**Abb. 47:** Das mikroskopische Bild der ROI Knochen/Sehne nach 24 Wochen Standzeit zeigt am Beispiel eines Flexorsehnenpräparates (links; Giemsa 62,5x) die primäre Einheilung des Transplantates über die Bildung von Säulenknorpel und dessen spätere Kalzifizierung. Die Knochenblöcke der Patellasehnenpräparate (rechts; Giemsa, 31,25x) werden knöchern integriert und sind nur durch den Knorpelanteil ihrer Aponeurosen abgrenzbar. Die Einheilung der Patellasehnenanteile ohne Knochenblock erfolgt analog zu den Flexorsehnen-transplantaten.

### 3.4.3 Histologische Auswertung der ROI Sehne/Implantat

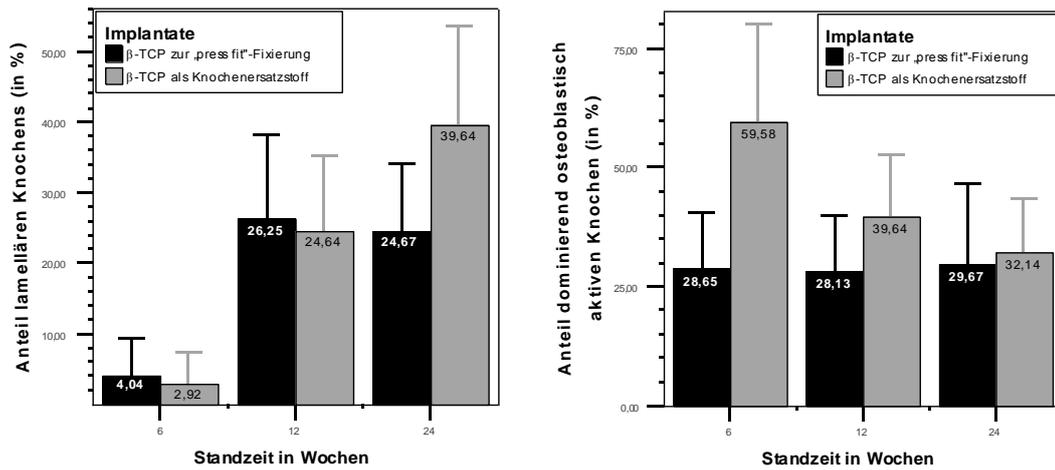
Das Interface der ROI Sehne/Implantat zeigt bei beiden Transplantaten eine Zunahme des Anteils an Umbaulakunen mit Osteoblasten und/oder Osteoklasten an deren Oberfläche. Auf diese Weise entstanden nach 12 Wochen Standzeit Knochenlamellen zwischen  $\beta$ -TCP-Implantat und der Transplantatsehne, die über Bindegewebsfasern vom Sharpey-Typ mit dem Transplantat in Verbindung standen (**Abb. 48**). Die Anteile bindegewebiger Zwischenschichten und zellulärer Entzündungszeichen innerhalb des Interfaces fielen bei beiden Transplantaten gering aus. Morphologisch konnten keine Unterschiede festgestellt werden.



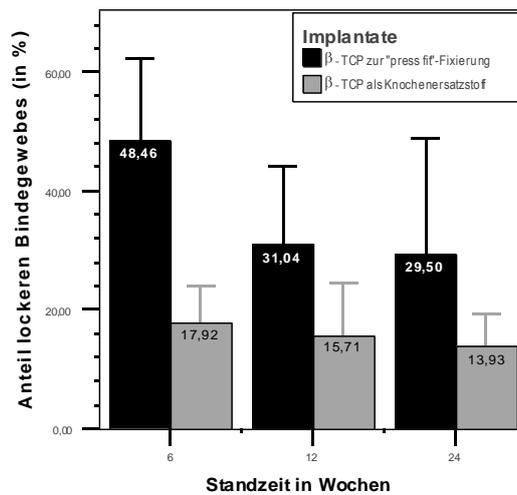
**Abb. 48:** Das mikroskopische Bild der ROI Sehne/Implantat nach 12 Wochen (links; Giemsa, 62,5x) und 24 Wochen Standzeit (rechts; HE, 62,5x; MAYR 2007a) zeigt eine progrediente Knochenlamellenbildung an der Grenzzone.

#### 3.4.4 Histologische Auswertung „ $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung“ vs. „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“

Im Inneren beider Implantate war im zeitlichen Verlauf eine Zunahme lamellären Knochens zu beobachten. Die größte Zunahme erfolgte im Zeitraum von 6 auf 12 Wochen Standzeit. Nach 24 Wochen fand sich im „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“ mehr lamellärer Knochen als im „ $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung“. Dieser Unterschied war signifikant (Abb. 49 [links];  $p_{\text{lamellärer Knochen [24 Wochen]}} = 0,02$ ). In den „Knochenersatz-Präparaten“ fand sich zu allen Standzeit ein konstanter Anteil „osteoblastisch aktiven Knochens“. Die „press fit“-Präparate zeigten nach 6 Wochen deutlich mehr „osteoblastisch aktiven Knochens“. Dieser Unterschied war signifikant ( $p_{\text{osteoblastisch aktiver Knochen [6 Wochen]}} = 0,01$ ). Nach 12 Wochen war er nicht mehr signifikant ( $p_{\text{osteoblastisch aktiver Knochen [12 Wochen]}} = 0,07$ ). Nach 24 Wochen konnte kein Unterschied mehr nachgewiesen werden (Abb. 49 [rechts]). Beim „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“ trat innerhalb des Implantates über den gesamten Versuchsverlauf ein konstanter Anteil „lockeren Bindegewebes“ auf (Abb. 50). Die „press fit“-Präparate zeigten zu allen Standzeiten deutlich mehr „lockeres Bindegewebe“, dessen Anteil über den gesamten Versuchsverlauf kontinuierlich abnahm. Dieser Unterschied war zu allen drei Standzeiten signifikant ( $p_{\text{lockeres Bindegewebe [6 Wochen]}} < 0,001$ ;  $p_{\text{lockeres Bindegewebe [12 Wochen]}} = 0,01$ ;  $p_{\text{lockeres Bindegewebe [24 Wochen]}} = 0,02$ ).



**Abb. 49:** Zeitlicher Verlauf des in das  $\beta$ -TCP einwachsenden Anteils „lamellären Knochens“ (links) und „dominierend osteoblastisch aktiven Knochens“ (rechts) der ROI Knochen/Implantat bei dem Vergleich  $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung vs.  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff

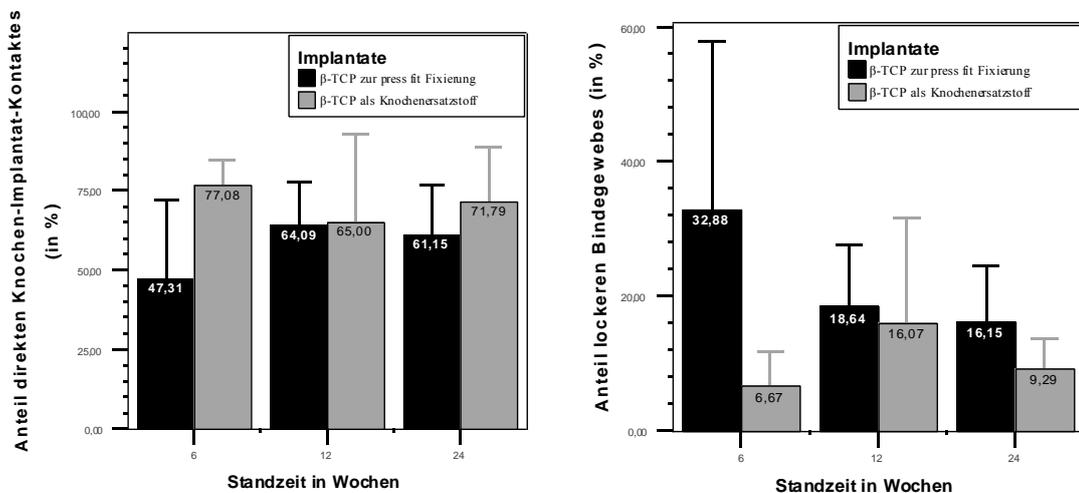


**Abb. 50:** Zeitlicher Verlauf des Anteils „lockeren Bindegewebes“ der ossären Integration in der ROI Knochen/Implantat bei dem Vergleich  $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung vs.  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff

**Tab. 12:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Histologie-Scores im zeitlichen Verlauf für die ossäre Integration des Implantates in der ROI Knochen/Implantat im Vergleich  $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung eines Sehnenstransplantates vs.  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff

Anteile	Standzeit	$\beta$ -TCP-Implantat		p-Wert („press fit“ vs. Knochenersatz)
		„press fit“-Fixierung	Knochenersatzstoff	
lamellärer Knochen (in %)	6 Wochen	4,04 ± 5,3	2,92 ± 4,6	n. s.
	12 Wochen	26,25 ± 12,0	24,64 ± 10,7	n. s.
	24 Wochen	24,67 ± 9,5	39,64 ± 14,0	p = 0,02
dominierend osteoblastisch aktiver Knochen (in %)	6 Wochen	28,65 ± 12,1	59,58 ± 20,5	p = 0,01
	12 Wochen	28,13 ± 11,9	39,64 ± 13,2	n. s.
	24 Wochen	29,67 ± 17,1	32,14 ± 11,4	n. s.
lockeres Bindegewebe (in %)	6 Wochen	48,46 ± 13,8	17,92 ± 6,0	p < 0,001
	12 Wochen	31,04 ± 13,1	15,71 ± 8,9	p = 0,01
	24 Wochen	29,50 ± 19,2	13,93 ± 5,4	p = 0,02

In der Umgebung des ursprünglichen Bohrkanals zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Befunden der „press fit“-Präparate und der „Knochenersatz-Präparate“ (vgl. **Kap. 3.2.1**). Mit Ausnahme des Anteils „direkten Knochen-Implantat-Kontaktes“ und des Anteils „lockeren Bindegewebes“ waren keine Unterschiede zwischen den „press fit“- und den „Knochenersatz-Präparaten“ festzustellen. 6 Wochen post operationem konnte in den Knochenersatz-Präparaten signifikant mehr „direkter Knochen-Implantat-Kontakt“ als in den „press fit“-Implantaten gefunden werden ( $p_{\text{direkter Kontakt [6 Wochen]}} = 0,01$ ). Dieser Anteil war bei beiden Implantatgruppen über den gesamten Versuchsverlauf weitgehend konstant und zeigte nach 12 sowie nach 24 Wochen keine Unterschiede mehr (**Abb. 51** [links]). Ferner fand sich nach 6 Wochen Standzeit im Interface der „press fit“-Präparate hoch signifikant mehr „lockeres Bindegewebe“ als bei den „Knochenersatz-Präparaten“ ( $p_{\text{lockeres Bindegewebe [6 Wochen]}} = 0,001$ ). In den „press fit“-Präparaten sank im weiteren zeitlichen Verlauf der Anteil des „lockeren Bindegewebes“. In den „Knochenersatz-Präparaten“ blieb er weitgehend konstant. Nach 24 Wochen war dieser Unterschied noch nachweisbar ( $p_{\text{lockeres Bindegewebe [24 Wochen]}} = 0,05$ ; **Abb. 51** [rechts]).



**Abb. 51:** Zeitlicher Verlauf des Anteils „direkten Knochen-Implantat-Kontaktes“ (links) und „lockeren Bindegewebes“ (rechts) innerhalb des Interfaces der ROI Knochen/Implantat bei dem Vergleich  $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung vs.  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff

**Tab. 13:** Mittelwerte mit Standardabweichung und  $p$ -Werte des Histologie-Scores im zeitlichen Verlauf für das Interface der ROI Knochen/Implantat im Vergleich  $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung eines Sehnentransplantates vs.  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff

Anteile	Standzeit	$\beta$ -TCP-Implantat		p-Wert („press fit“ vs. Knochenersatz)
		„press fit“-Fixierung	Knochenersatz	
Direkter Knochen-Implantat-Kontakt (in %)	6 Wochen	47,31 $\pm$ 24,6	77,08 $\pm$ 7,5	p=0,01
	12 Wochen	64,07 $\pm$ 13,6	65,00 $\pm$ 28,1	n. s.
	24 Wochen	61,15 $\pm$ 15,7	71,79 $\pm$ 16,7	n. s.
lockeres Bindegewebe (in %)	6 Wochen	32,88 $\pm$ 24,8	6,67 $\pm$ 5,2	p=0,001
	12 Wochen	18,64 $\pm$ 9,9	16,07 $\pm$ 15,5	n. s.
	24 Wochen	16,15 $\pm$ 8,3	9,29 $\pm$ 4,5	p=0,05

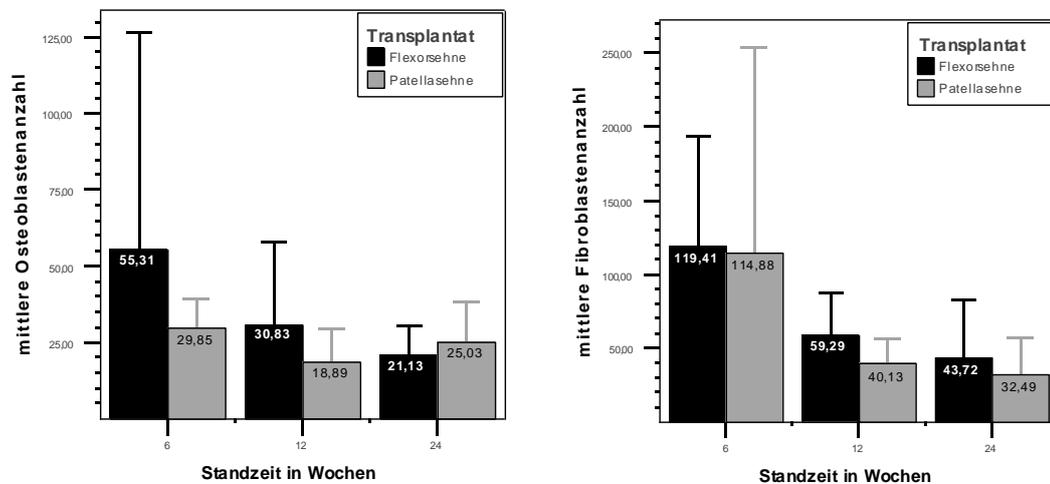
### 3.5 Histologische Quantifizierung der Zellarten innerhalb der „press fit“-Präparate (Zell-Score)

In der Auswertung des Ratings ergab sich zwischen den Befunden der Untersuchenden eine mittlere Abweichung von  $5,67 \pm 8,78 \%$ .

#### 3.5.1 Zell-Score der ROI Knochen/Implantat

Über den gesamten Versuchsverlauf konnte bei beiden Transplantatgruppen eine konstante Osteozyten- und Osteoklastenzahl gezählt werden. Unterschiede zeigten sich nicht.

Die mittlere Osteoblastenzahl nahm innerhalb des Untersuchungszeitraumes ab. Nach 12 Wochen Standzeit zeigten die Patellasehnenpräparate im Mittel eine geringere Osteoblastenzahl als die Flexorsehnenpräparate (**Abb. 52** [links]). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ( $p_{\text{Osteoblasten [12 Wochen]}} = 0,09$ ). 24 Wochen post operationem zeigten beide Transplantate vergleichbare Werte.



**Abb. 52:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Zellanzahl der Osteoblasten (links) und Fibroblasten (rechts) innerhalb der ROI Knochen/Implantat

**Tab. 14:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Zell-Scores im zeitlichen Verlauf für die ROI Knochen/Implantat

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
Osteoblasten	6 Wochen	55,31 ± 71,6	29,85 ± 9,1	n. s.
	12 Wochen	30,83 ± 27,1	18,89 ± 10,3	n. s.
	24 Wochen	21,13 ± 9,3	25,03 ± 13,4	n. s.
Fibroblasten	6 Wochen	119,41 ± 74,4	114,88 ± 138,9	n. s.
	12 Wochen	59,29 ± 27,7	40,14 ± 15,7	p = 0,02
	24 Wochen	43,72 ± 38,7	32,49 ± 24,1	n. s.

Die zeitliche Entwicklung der mittleren Zellanzahl von Fibrozyten und Fibroblasten verlief vergleichbar der der Osteoblasten (**Abb. 52** [rechts]). Nach 12 Wochen Standzeit wiesen die Patellasehnenpräparate gegenüber den Flexorsehnenpräparaten eine um etwa ein Drittel geringere mittlere Fibroblastenzahl auf. Dieser nach 12 Wochen nachweisbare signifikante

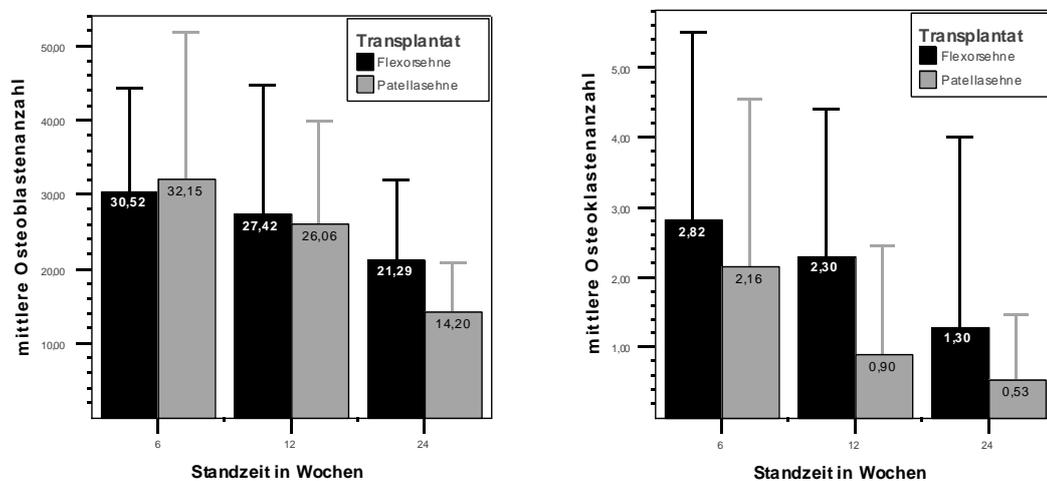
Unterschied ( $p_{\text{Fibroblasten [12 Wochen]}} = 0,02$ ) konnte jedoch nach 24 Wochen nicht mehr nachgewiesen werden. Bezüglich der Fibrozytenanzahl zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Transplantaten.

### 3.5.2 Zell-Score der ROI Knochen/Sehne

Über den gesamten Versuchszeitraum war für die mittlere Osteozytenanzahl in beiden Transplantatgruppen eine kontinuierliche Zunahme zu verzeichnen. Es bestand kein Unterschied zwischen den beiden Transplantaten.

Die mittlere Anzahl der Osteoblasten sank im zeitlichen Verlauf bei beiden Gruppen und zeigte keine Unterschiede nach 6 und 12 Wochen Standzeit (**Abb. 53** [links]). Nach 24 Wochen konnte in den Patellasehnenpräparaten eine signifikant geringere mittlere Osteoblastenanzahl gezählt werden als in den Flexorsehnenpräparaten ( $p_{\text{Osteoblasten [24 Wochen]}} = 0,05$ ).

Über den gesamten Versuchszeitraum war in der ROI Knochen/Sehne beider Transplantatgruppen eine konstante geringe Osteoklastenanzahl zu finden (**Abb. 53** [rechts]). Ein Unterschied war statistisch nicht nachweisbar.

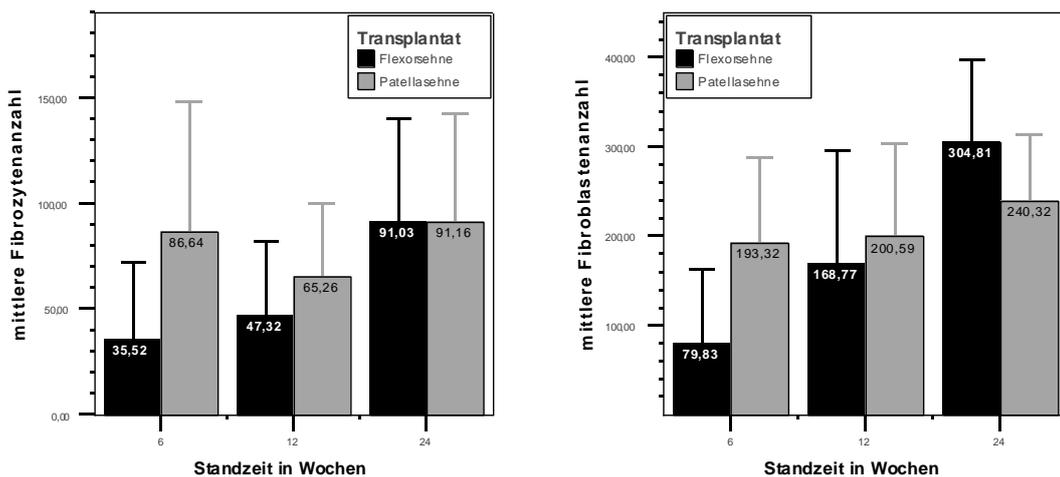


**Abb. 53:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Zellanzahl der Osteoblasten (links) und Osteoklasten (rechts) innerhalb der ROI Knochen/Sehne

**Tab. 15:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Zell-Scores im zeitlichen Verlauf für die ROI Knochen/Sehne

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
Osteoblasten	6 Wochen	30,51 ± 13,9	32,15 ± 19,7	n. s.
	12 Wochen	27,42 ± 17,4	26,06 ± 13,7	n. s.
	24 Wochen	21,29 ± 10,6	14,20 ± 6,7	p = 0,05
Osteoklasten	6 Wochen	2,82 ± 2,7	2,16 ± 2,4	n. s.
	12 Wochen	2,30 ± 2,1	0,90 ± 1,6	p=0,004
	24 Wochen	1,30 ± 2,7	0,53 ± 0,9	n. s.

Die Präparate der Patellasehnentransplantate zeigten bezüglich der Fibrozyten- und Fibroblasten über den Versuchsverlauf konstante Werte. In den Flexorsehnenpräparaten erfuhr sowohl die mittlere Fibrozyten- als auch die mittlere Fibroblastenanzahl im Versuchszeitraum einen Zuwachs. Nach 6 Wochen Standzeit waren in den Flexorsehnenpräparaten sowohl die mittlere Fibrozytenanzahl als auch die mittlere Fibroblastenanzahl mehr als doppelt so hoch wie in den Patellasehnenpräparaten. Diese Unterschiede waren hoch signifikant ( $p_{\text{Fibrozyten [6 Wochen]}} = 0,01$ ;  $p_{\text{Fibroblasten [6 Wochen]}} = 0,01$ ). Nach 12 Wochen Standzeit zeigten beide Transplantate keine Unterschiede bezüglich der mittleren Fibrozyten- und Fibroblastenanzahl. 24 Wochen post operationem konnte lediglich eine signifikant höhere mittlere Fibroblastenanzahl der Patellasehnenpräparate nachgewiesen werden ( $p_{\text{Fibroblasten [24 Wochen]}} = 0,05$ ; **Abb. 54** [rechts]).



**Abb. 54:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Zellanzahl der Fibrozyten (links) und Fibroblasten (rechts) innerhalb der ROI Knochen/Sehne

**Tab. 16:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Zell-Scores im zeitlichen Verlauf für die ROI Knochen/Sehne

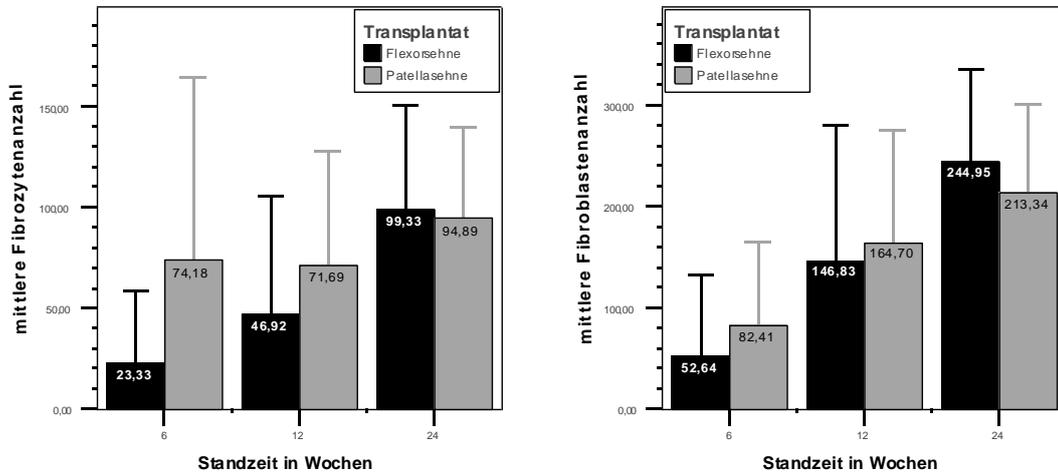
Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
Fibrozyten	6 Wochen	35,52 ± 36,7	86,64 ± 61,1	p = 0,01
	12 Wochen	47,32 ± 34,8	65,26 ± 34,6	n. s.
	24 Wochen	91,03 ± 49,3	91,16 ± 50,9	n. s.
Fibroblasten	6 Wochen	79,83 ± 83,7	193,32 ± 94,1	p = 0,01
	12 Wochen	168,77 ± 126,5	200,59 ± 103,4	n. s.
	24 Wochen	304,81 ± 92,8	240,32 ± 72,6	p = 0,05

### 3.5.3 Zell-Score der ROI Sehne/Implantat

In der ROI Sehne/Implantat war eine konstante und geringe Anzahl Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten nachweisbar. Ein Unterschied zwischen den Transplantatgruppen bezüglich dieser Zellarten bestand zu keinem Zeitpunkt.

Mit Ausnahme der mittlere Fibrozytenanzahl der Patellasehnennguppe stiegen Fibrozyten- und Fibroblastenanzahl in beiden Transplantatgruppen über den gesamten Versuchszeitraum an

(**Abb. 55**). Die Fibrozytenanzahl der Patellasehnen erwies sich in diesem Zeitraum als konstant. Unterschiede waren lediglich nach 24 Wochen bezüglich der Fibrozytenanzahl nachweisbar. Nach dieser Standzeit wiesen die Flexorsehnenpräparate im Mittel eine geringfügig signifikant höhere Fibrozytenanzahl auf als die Patellasehnenpräparate ( $p_{\text{Fibrozyten [24 Wochen]}} = 0,02$ ).



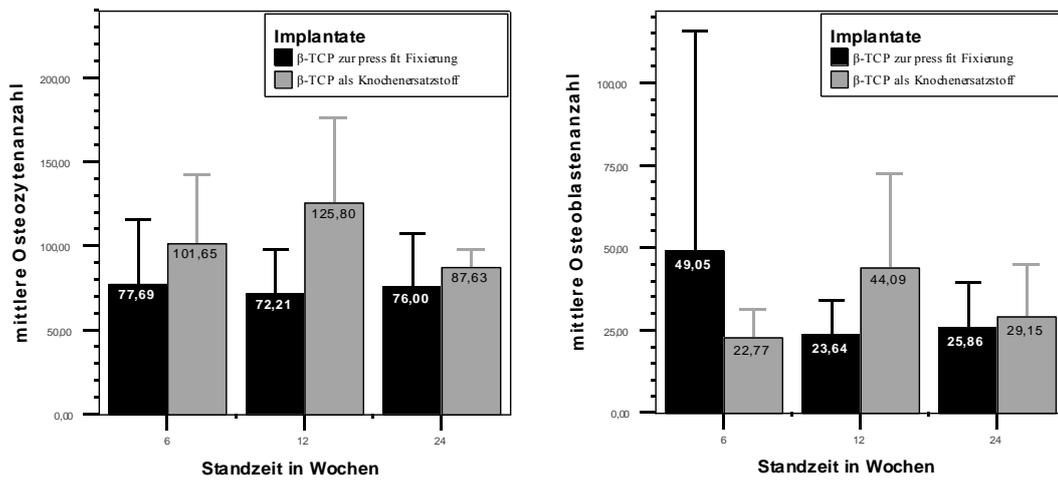
**Abb. 55:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Zellanzahl der Fibrozyten (links) und Fibroblasten (rechts) innerhalb der ROI Sehne/Implantat

**Tab. 17:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Zell-Scores im zeitlichen Verlauf für die ROI Sehne/Implantat

Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
Fibrozyten	6 Wochen	23,33 ± 35,0	74,18 ± 89,9	n. s.
	12 Wochen	46,92 ± 58,3	71,69 ± 55,8	n. s.
	24 Wochen	99,33 ± 51,2	94,89 ± 44,4	p = 0,02
Fibroblasten	6 Wochen	52,64 ± 74,4	82,41 ± 82,3	n. s.
	12 Wochen	146,83 ± 133,7	164,70 ± 109,5	n. s.
	24 Wochen	244,95 ± 91,1	213,34 ± 87,9	n. s.

### 3.5.4 Zell-Score „ $\beta$ -TCP zur „press fit“-Fixierung“ vs. „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“

Die „press fit“-Implantate verzeichneten über den gesamten Versuchszeitraum eine konstante mittlere Osteozyten- und Osteoblastenanzahl (**Abb. 56**). Mit Ausnahme der 12 Wochen-Präparate zeigten sich keine Unterschiede. In den Präparaten „Knochenersatzpräparaten“ stieg die Osteozyten- und Osteoblastenanzahl im Zeitraum von 6 auf 12 Wochen an und sank im weiteren Verlauf wieder ab. Im Mittel konnten nach 12 Wochen Standzeit in den Knochenersatzpräparaten mehr Osteozyten und Osteoblasten gezählt werden als in den „press fit“-Präparaten. Dieser Unterschied war für die Osteozyten hoch signifikant und für die Osteoblasten nicht signifikant ( $p_{\text{Osteozyten [12 Wochen]}} = 0,004$ ;  $p_{\text{Osteoblasten [12 Wochen]}} = 0,09$ ). Die Osteoblasten-, die Fibrozyten-, die Fibroblasten- und die Riesenzellanzahl vom Osteoklastentyp erwiesen sich im Verlauf als konstant und zeigten keine Unterschiede.



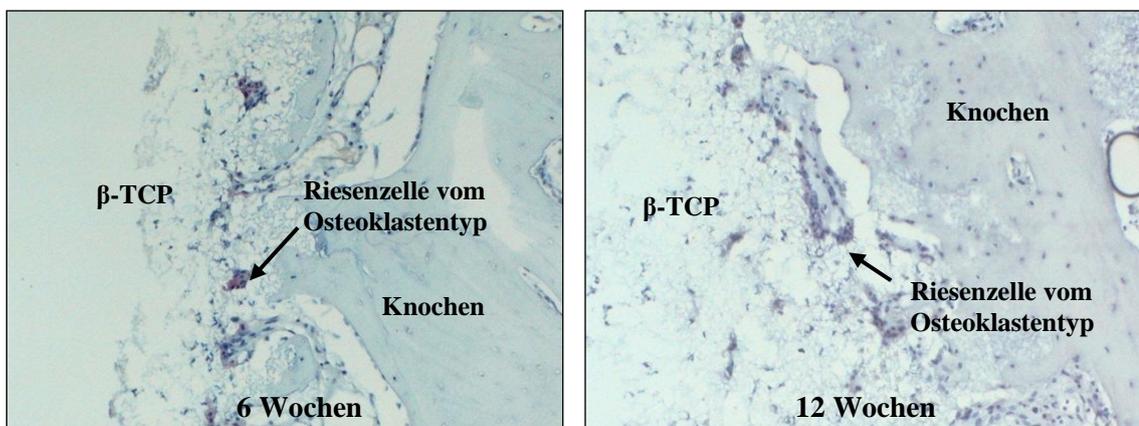
**Abb. 56:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Zellanzahl der „Osteozyten“ (links) und „Osteoblasten“ (rechts) innerhalb der ROI Sehne/Implantat im Vergleich „β-TCP als „press fit“-Fixierung“ vs. „β-TCP als Knochenersatzstoff“

**Tab. 18:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte des Zell-Scores im zeitlichen Verlauf für den Vergleich „β-TCP zur „press fit“-Fixierung“ vs. β-TCP als Knochenersatzstoff“

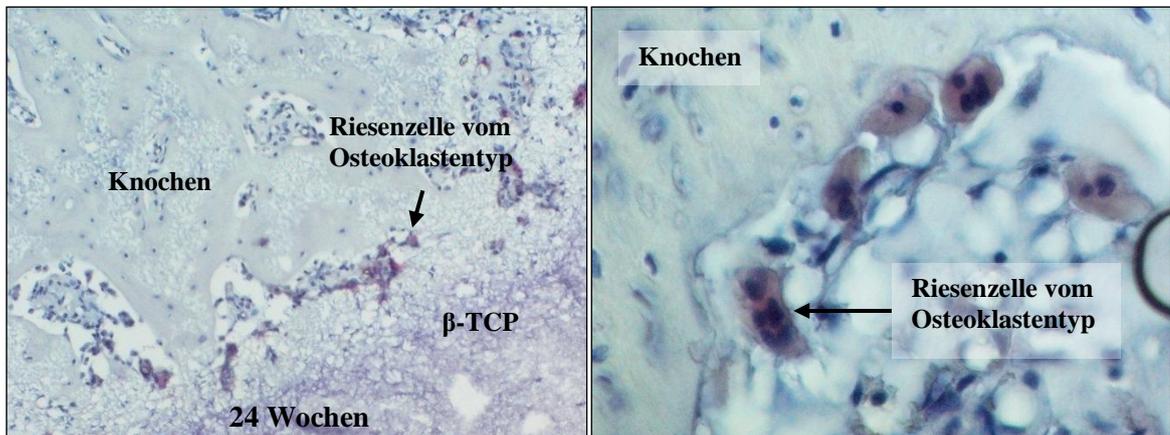
Anteile	Standzeit	Transplantat		p-Wert („press fit“ vs. Knochenersatz)
		β-TCP zur „press fit“-Fixierung	β-TCP als Knochenersatzstoff	
Osteozyten	6 Wochen	77,69 ± 38,6	101,65 ± 41,4	n. s.
	12 Wochen	72,21 ± 25,9	125,80 ± 50,8	p=0,004
	24 Wochen	76,00 ± 32,0	87,63 ± 10,0	n. s.
Osteoblasten	6 Wochen	49,05 ± 66,4	22,77 ± 8,7	n. s.
	12 Wochen	23,64 ± 10,4	44,09 ± 28,2	n. s.
	24 Wochen	25,86 ± 13,5	29,15 ± 15,8	n. s.

### 3.6 Auswertung der immunhistochemisch gefärbten β-TCP- Präparate

In allen Präparaten konnten zu jedem Zeitpunkt innerhalb der Grenzzonen aller drei ROIs Riesenzellen vom Osteoklastentyp nachgewiesen werden (Abb. 57 & 58).



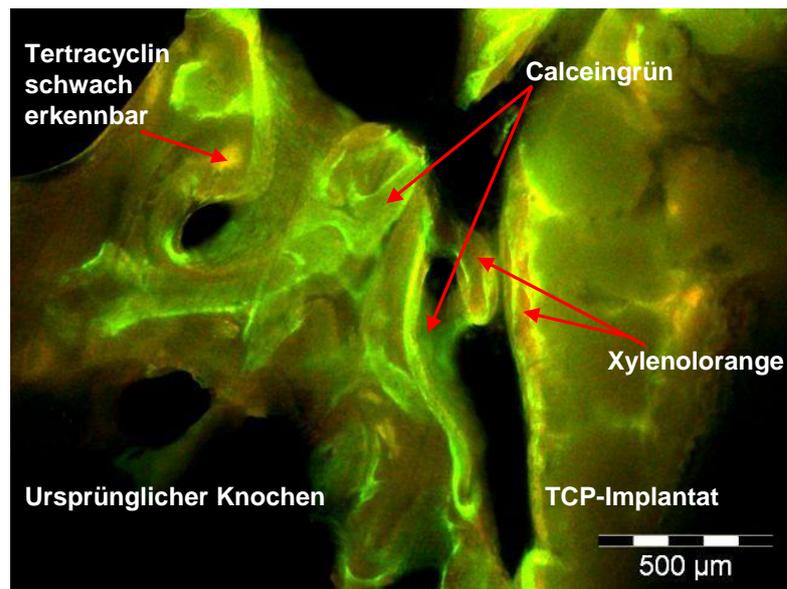
**Abb. 57:** Eindruck der TRAP-gefärbten mehrkernigen Riesenzellen vom Osteoklastentyp (rötlich) am Beispiel der Grenzzone Knochen/Implantat nach 6 (links; 62,5x) und 12 Wochen (rechts; 62,5x) Standzeit, es konnten zu allen Standzeiten eine annähernd gleichbleibende Zahl an Riesenzellen vom Osteoklastentyp gefunden werden.



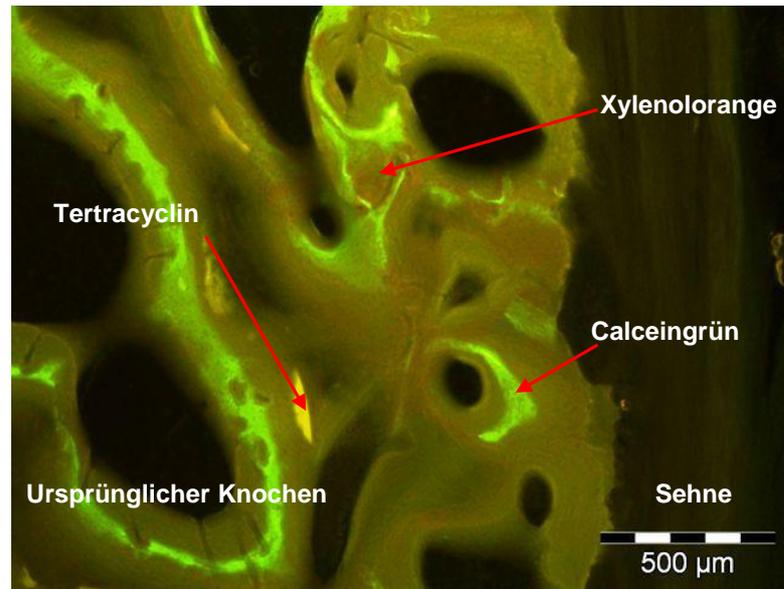
**Abb. 58:** Eindruck der TRAP-gefärbten mehrkernigen Riesenzellen vom Osteoklastentyp (rötlich) am Beispiel der Grenzzone Knochen/Implantat nach 24 Wochen (links; 62,5x) und in der Vergrößerung (rechts; 500x), es konnten zu allen Standzeiten eine annähernd gleichbleibende Zahl an Riesenzellen vom Osteoklastentyp gefunden werden.

### 3.7 Auswertung der fluoreszenzmarkierten Dünnschliffpräparate

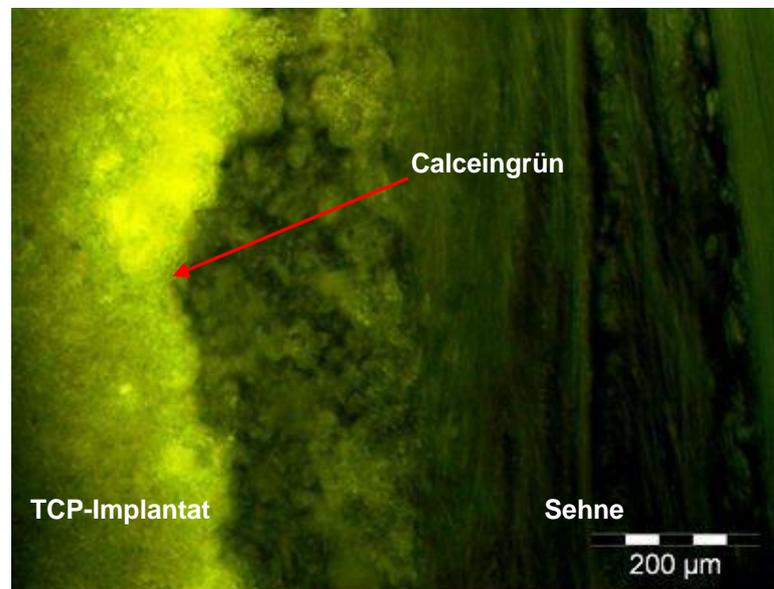
Die farbliche Anordnung der Fluoreszenz-Farbbanden der markierten Dünnschliffpräparate zeigte, dass die Knochenneubildung vom Wirtsknochen in Richtung des  $\beta$ -TCPs (ROI Knochen/Implantat, **Abb. 59**) und des Transplantates (ROI Knochen/Sehne, **Abb. 60**) verläuft. Auch in der ROI Sehne/Implantat (**Abb. 61**) konnte eine geringe Knochenneubildung nachgewiesen werden.



**Abb. 59:** Fluoreszenzmikroskopischer Befund der ROI Knochen/Implantat mit einer sehr schwer nachweisbaren Tetracyclin-Bande (am 10. Tag markiert) sowie gut erkennbarer Xylenolorange- (am 20. Tag markiert) und Calceingrün-Bande (am 30. Tag markiert); die Banden zeigen ein in das  $\beta$ -TCP gerichtetes Knochenwachstum [MAYR, 2007a].



**Abb. 60:** Fluoreszenzmikroskopischer Befund der ROI Knochen/Sehne mit einer gut nachweisbaren Tetracyclin-Bande (am 10. Tag markiert) sowie Xylenolorange- (am 20. Tag markiert) und Calceingrün-Bande (am 30. Tag markiert); die Banden zeigen ein vom Wirtsknochen ausgehendes, transplantatgerichtetes Knochenwachstum [MAYR, 2007a].

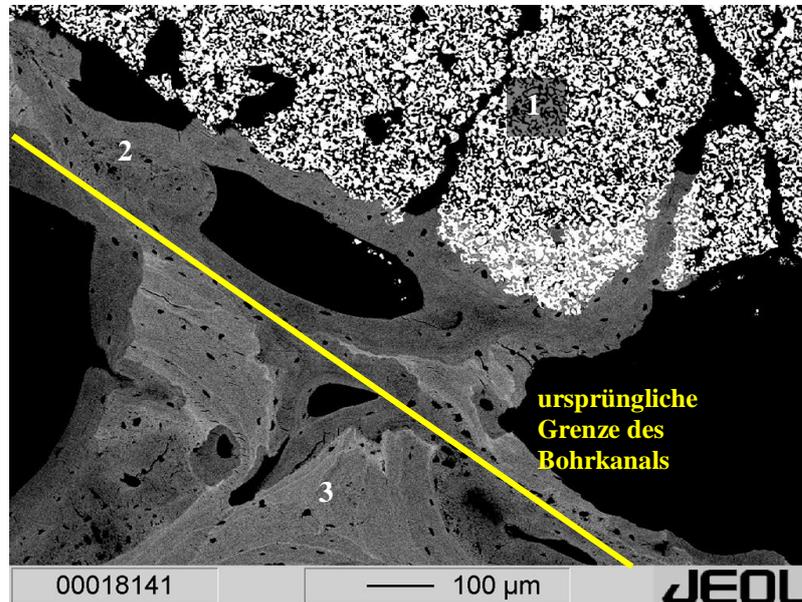


**Abb. 61:** Fluoreszenzmikroskopischer Befund der ROI Knochen/Implantat mit spärlicher Calceingrün-Bande; diese Bande weist auf eine sehr geringe Knochenneubildung in der ROI Knochen/Implantat hin [MAYR, 2007a].

### 3.8 Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (**Abb. 62 & 63**) bestätigten einen direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat. Eine trennende Bindegewebsschicht zeigte sich in diesen Aufnahmen nicht. Randständig waren  $\beta$ -TCP-Partikel vollständig in den Knochen integriert. Zentral des Implantates fand sich nach 12 Wochen kein Knochengewebe. Das Knochengewebe wächst über die durch physikalische Degradation entstandenen  $\beta$ -TCP-Defekte

in das Implantat ein. In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen war durch die Verteilung der Grauwerte deutlich die Reifung des Knochens erkennbar. Älterer Knochen stellt sich in der Rasterelektronenmikroskopie heller dar als neu gebildeter. Durch die Verteilung der Grauwerte war es möglich, 12 Wochen post operationem den ursprünglichen Bohrkanal zu lokalisieren und die Wachstumsrichtung des Knochens zu erkennen. Der Knochen wächst ausgehend vom Wirtsknochen nach innen auf das Implantat zu.



*Abb. 62:* An der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme der ROI Knochen/Implantat kann man den älteren, stärker kalzifizierten Knochen (3), den neu entstandenen, weniger kalzifiziertem, auf das  $\beta$ -TCP zuwachsenden Knochen (2), den ursprünglichen Bohrkanal (gelb) und das  $\beta$ -TCP (1) erkennen.

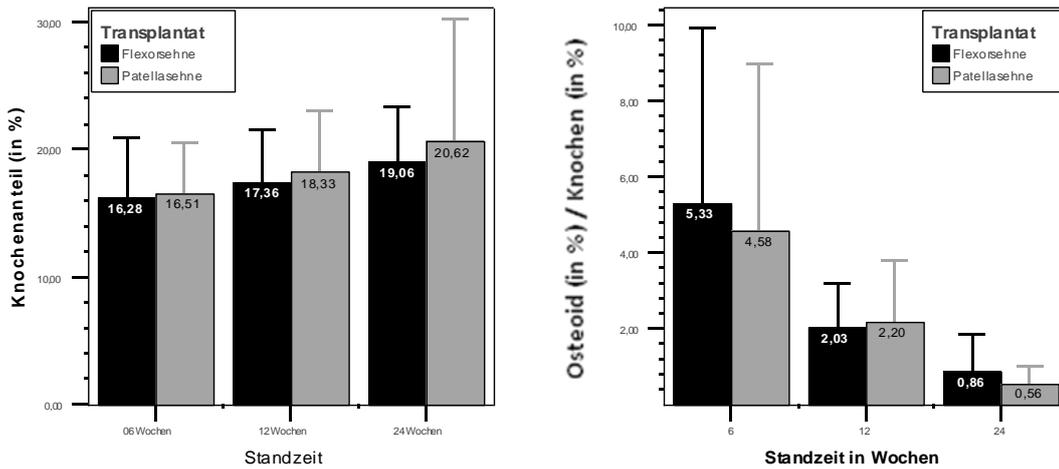
### **3.9 Auswertung der Histomorphometrie**

In der Auswertung der Histomorphometrie ergab sich zwischen den Befunden der Untersuchenden eine mittlere Abweichung von  $3,5 \pm 4,00$  %.

#### **3.9.1 Histomorphometrische Auswertung der ROI Knochen/Implantat**

Über den gesamten Versuchszeitraum war in der ROI Knochen/Implantat ein kontinuierlicher Zuwachs des Knochengewebes zu beobachten (Abb. 64 [links]). Unterschiede zwischen den Transplantaten konnten nicht nachgewiesen werden. Der Osteoidanteil sank bei beiden Transplantaten im zeitlichen Verlauf des Versuches. Die stärkste Reduktion des Osteoids erfuhren die Präparate im Zeitraum von 6 auf 12 Wochen Standzeit. Unterschiede zeigten sich nicht.

Der Wert des Quotienten aus prozentuaem Osteoid und Knochen (Osteoid% / Os%) verringerte sich im zeitlichen Verlauf bei beiden Transplantaten. Dies bedeutet, dass umgekehrt proportional zur zeitlichen Entwicklung dieses Quotienten das Knochengewebe zunehmend mineralisiert und somit reifer wird (Abb. 64 [rechts]). Ein Unterschied zwischen den Transplantaten war nicht nachweisbar.



**Abb. 64:** Darstellung des Knochenanteils (links) und des Mineralisierungsgrades (rechts) im zeitlichen Verlauf in der ROI Knochen/Implantat

**Tab. 19:** Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte der histomorphometrischen Auswertung im zeitlichen Verlauf für die ROI Knochen/Implantat

Anteile	Standzeit	Transplantat		p Wert (Flexorsehne vs. Patellasehne)
		Flexorsehne	Patellasehne	
Knochen (in %)	6 Wochen	16,28 ± 4,6	16,51 ± 4,0	n. s.
	12 Wochen	17,36 ± 4,1	18,33 ± 4,7	n. s.
	24 Wochen	19,06 ± 4,3	20,62 ± 9,6	n. s.
Mineralisie- rungsgrad	6 Wochen	5,33 ± 4,6	4,58 ± 4,4	n. s.
	12 Wochen	2,03 ± 1,2	2,20 ± 1,6	n. s.
	24 Wochen	0,86 ± 1,0	0,56 ± 0,4	n. s.

### 3.9.2 Histomorphometrische Auswertung der ROI Knochen/Sehne

Die Befunde der histomorphometrischen Parameter in der ROI Knochen/Sehne waren mit denen der ROI Knochen/Implantat vergleichbar (vgl. **Kap. 3.9.1**). In der ROI Knochen/Sehne zeigten sich keine histomorphometrischen Unterschiede zwischen den Transplantaten.

### 3.9.3 Histomorphometrische Auswertung der ROI Sehne/Implantat

In der ROI Sehne/Implantat zeigte sich in Bezug auf das Knochengewebe kein einheitlicher zeitlicher Verlauf. Der zeitliche Verlauf des Osteoidanteils und der Knochenreifung innerhalb der ROI Sehne/Implantat entsprach dem der ROI Knochen/Implantat (vgl. **Kap. 3.9.1**).

### 3.9.4 Histomorphometrische Auswertung „β-TCP zur „press fit“-Fixierung“ vs. „β-TCP als Knochenersatzstoff“

Zwischen den Transplantaten konnten bezüglich der Histomorphometrie keine Unterschiede nachgewiesen werden (vgl. **Kap. 3.9.1-4**). Daher wurden für den histomorphometrischen Vergleich zwischen dem „β-TCP als Knochenersatzstoff“ und dem „β-TCP zur „press fit“-Fixierung“ die femoralen „press fit“-Präparate beider Transplantatgruppen zusammengefasst. Die zeitliche Entwicklung des Knochenanteils, des Osteoidanteils und der Knochenreifung ver-

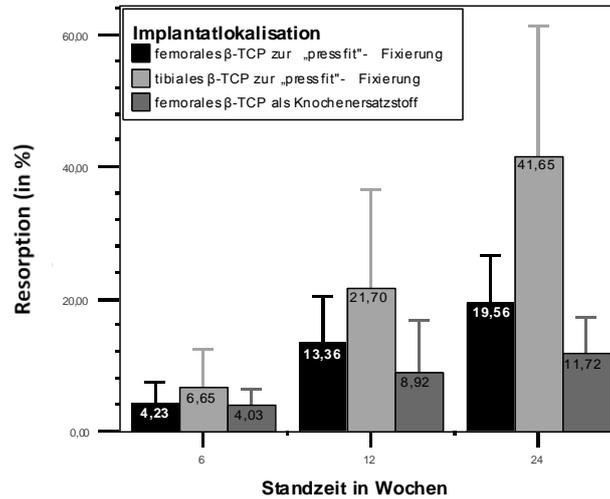
lief bei beiden Implantatgruppen gleich und war mit der der ROI Knochen/Implantat vergleichbar (vgl. **Kap. 3.9.1**). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

### **3.10 Resorption des $\beta$ -TCPs**

Die statistische Auswertung der Resorption des  $\beta$ -TCPs ergab zwischen den Flexor- und Patellasehnen keine Unterschiede, sodass für die Beurteilung der Resorptionsgeschwindigkeit die beiden Transplantatgruppen zusammengefasst betrachtet werden konnten. Über den gesamten Versuchszeitraum konnte bei allen Präparaten ein progredienter Abbau des  $\beta$ -TCPs beobachtet werden (**Abb. 65**). Hierbei stellten sich zwischen den tibialen „press fit“-Implantaten, den femoralen „press fit“-Implantaten und den femoralen Knochenersatz-Implantaten Unterschiede bezüglich der Resorptionsgeschwindigkeit dar.

Die tibialen Implantate wurden über den gesamten Versuchszeitraum deutlich stärker resorbiert als die femoralen „press fit“-Präparate. Nach 24 Wochen Standzeit war dieser Unterschied hoch signifikant ( $p_{\text{Resorption tibial vs. femoral [24 Wochen]}} = 0,002$ ). Zu diesem Zeitpunkt war in den tibialen Präparaten mit  $41,65 \pm 19,8$  % mehr als doppelt soviel  $\beta$ -TCPs resorbiert wie in den femoralen mit  $19,56 \pm 7,1$  %. Ferner zeigte der direkte Vergleich, dass im Versuchsverlauf die femoralen „press fit“-Implantate deutlich stärker abgebaut wurden als die Knochenersatz-Präparate. 12 Wochen post operationem erwies sich der Unterschied als nicht signifikant und nach 24 Wochen als signifikant ( $p_{\text{Resorption „press fit“ vs. Knochenersatz [12 Wochen]}} = 0,07$ ;  $p_{\text{Resorption „press fit“ vs. Knochenersatz [24 Wochen]}} = 0,04$ ).

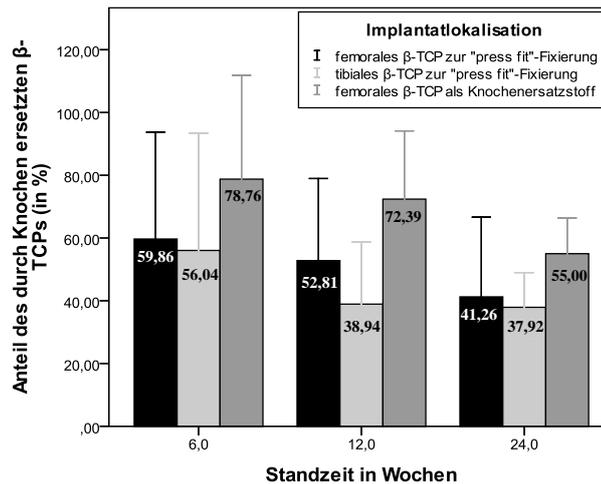
Bei den Präparaten der „press fit“-Fixierung und den Präparaten des Knochenersatzes wurde im Versuchsverlauf das resorbierte  $\beta$ -TCP durch Knochengewebe ersetzt (**Abb. 66**). Nach 6 Wochen erwies sich bei den tibialen „press fit“-Präparaten  $56,04 \pm 37,4$  %, bei den femoralen „press fit“-Präparaten  $59,86 \pm 34,0$  % und bei den Knochenersatz-Präparaten  $78,76 \pm 33,1$  % des  $\beta$ -TCPs durch Faserknochen ersetzt. Auch wenn sich graphisch ein Unterschied zwischen den beiden femoralen Implantaten („press fit“-Implantat vs. Knochenersatz-Implantat) darstellt, so konnte dieser statistisch nicht nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf des Versuches bildete sich bei beiden Gruppen zunehmend eine trabekuläre Struktur des Knochens und somit eine Abnahme der Knochenmenge. Nach 12 Wochen war von den femoralen Knochenersatz-Implantaten mit  $72,39 \pm 21,9$  % signifikant mehr  $\beta$ -TCP durch Knochengewebe ersetzt als von den femoralen „press fit“-Implantaten ( $p_{\text{Resorption „press fit“ vs. Knochenersatz [12 Wochen]}} = 0,05$ ). Zwischen den „press fit“-Implantaten fand sich zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied. Nach 24 Wochen war von dem resorbierten  $\beta$ -TCP der tibialen „press fit“-Implantate  $37,92 \pm 11,1$  %, dem der femoralen „press fit“-Implantate  $41,26 \pm 25,4$  % und dem der Knochenersatzimplantate  $55,00 \pm 11,4$  % knöchern ersetzt. Unterschiede konnten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden.



**Abb. 65:** Zeitlicher Verlauf der Resorption der  $\beta$ -TCP-Implantate zur „press fit“-Fixierung und als Knochenersatzstoff

**Tab. 20:** Zeitlicher Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte der histomorphometrisch ermittelten Resorptionsrate des  $\beta$ -TCPs

Standzeit	Resorption des $\beta$ -TCP-Implantates (in %)			p-Wert	
	Femur („press fit“-Implantat)	Tibia („press fit“-Implantat)	Knochenersatzstoff (femoral)	Femur vs. Tibia	femorale „press fit“-Fixierung vs. Knochenersatzstoff (femoral)
6 Wochen	4,23 $\pm$ 3,2	6,65 $\pm$ 5,7	4,03 $\pm$ 2,2	n. s.	n. s.
12 Wochen	13,35 $\pm$ 7,1	21,70 $\pm$ 14,7	8,92 $\pm$ 7,9	n. s.	n. s.
24 Wochen	19,56 $\pm$ 7,1	41,65 $\pm$ 19,8	11,72 $\pm$ 5,6	p < 0,01	p = 0,04



**Abb. 66:** Zeitlicher Verlauf des Knochens, der das resorbierte  $\beta$ -TCP ersetzt

**Tab. 20:** Zeitlicher Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung und p-Werte für den Anteil des durch Knochen ersetzten, resorbierten  $\beta$ -TCPs

Standzeit	Anteil des durch Knochen ersetzten resorbierten $\beta$ -TCPs (in %)			p-Wert	
	Femur („press fit“-Implantat)	Tibia („press fit“-Implantat)	Knochenersatzstoff (femoral)	Femur vs. Tibia	femorale „press fit“-Fixierung vs. Knochenersatzstoff (femoral)
6 Wochen	59,86 $\pm$ 34,0	56,04 $\pm$ 37,4	78,76 $\pm$ 33,1	n. s.	n. s.
12 Wochen	52,81 $\pm$ 26,1	38,94 $\pm$ 19,8	72,39 $\pm$ 21,9	n. s.	n. s.
24 Wochen	41,26 $\pm$ 25,4	37,92 $\pm$ 11,1	55,00 $\pm$ 11,4	n. s.	n. s.

## **4 Diskussion**

Seit circa einem halben Jahrhundert beschäftigen sich multiple Forschungsprojekte mit der Optimierung der Transplantatwahl und der Fixierung der vorderen Kreuzbandplastik. Als autologes Sehnentransplantat wird heutzutage die synovialisierte Flexorsehne und das mit Knochenblock versehene mittlere Patellasehnedrittel genutzt. Zur Fixierung der genutzten Sehnentransplantate werden resorbierbare Interferenzschrauben („Bioschrauben“) verwendet. Diese „Bioschrauben“ erreichen jedoch langfristig nicht die Fixierungseigenschaften der früher verwendeten Titan-Interferenzschrauben und können durch Hydrolysevorgänge zu Osteolysen und Entzündungsreaktionen im knöchernen Bohrkanal führen (PARTALE, 2003; HERTEL und CIERPINSKI, 2004; MAYR, 2007a; BANZHAF, 2007).

Das Ziel des Projektes „Mikroporöse Formkörper aus phasenreinem beta-Tricalciumphosphat zur Fixierung der vorderen Kreuzbandplastik und als Knochenersatz“ (MAYR, 2007a; MAYR et al., 2009) in Zusammenarbeit mit der Firma *Synthes*<sup>®</sup>, Liestal, Schweiz) bestand in der Untersuchung, ob eine suffiziente „press fit“-Fixierung einer Kreuzbandplastik mittels eines mikroporösen  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Passzylinders mit interkonnektierenden Poren möglich ist und wie sich das Material als Knochenersatz über den Heilungszeitraum verhält.

In der heutigen Chirurgie ist die Verwendung von  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) als Knochenersatzstoff keine Neuheit. In der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, der Wirbelsäulenchirurgie sowie in der operativen Traumatologie und Orthopädie findet  $\beta$ -TCP beispielsweise in Form von Granula oder „*rigid wedge*“-Formkörper Anwendung (MUSCHIK, 2001; VAN HEMERT, 2004; MAYR, 2007a). Jedoch beläuft sich die Porengröße dieser  $\beta$ -TCP-Formkörper auf 100 – 500  $\mu\text{m}$ . Der von uns genutzte  $\beta$ -TCP-Formkörper besitzt eine Porengröße von lediglich 5  $\mu\text{m}$ .

Die vorliegende Arbeit ist ein Bestandteil dieses Projektes und beschäftigt sich mit der Fragestellung, wie sich die Integrationsprozesse des  $\beta$ -TCP-Implantates histologisch darstellen und inwieweit sich die beiden verwendeten autologen Sehnentransplantate (Flexorsehne vs. Patellasehne) unter der genutzten Fixierungsmethode histologisch und histomorphometrisch bezüglich deren Einheilverhaltens unterscheiden.

Ferner erfolgte die histologische Analyse des verwendeten  $\beta$ -TCP-Passzylinders hinsichtlich seiner Eignung als Knochenersatzstoff. Zu diesem Zweck wurde ein  $\beta$ -TCP-Implantat in das spongiose Knochengewebe des medialen Femurkondylus implantiert.

### **4.1 Methodenkritik**

Der für diesen Versuch gewählte Stichprobenumfang orientierte sich streng an ethischen Auflagen. Daher wurde die Mindestanzahl an Versuchstieren gewählt, die für die erforderliche statistische Teststärke (*Power*) benötigt wird. Folglich stand für diesen Versuch ein relativ kleiner Stichprobenumfang zur Verfügung. Eine große Streuung der Ergebnisse verringert somit

zusätzlich die Teststärke. Desweiteren erfolgte innerhalb dieses Tierversuches die Kreuzbandrekonstruktion über eine komplette Arthrotomie. In der humanen Kreuzbandchirurgie ist man jedoch um eine möglichst minimale Invasivität bemüht und nutzt daher die arthroskopisch gestützte operative Kreuzbandrekonstruktion. Wie in anderen Arbeiten (HELLER et al., 2005; HUNT et al., 2005) wurde auch in der vorliegenden Untersuchung festgestellt, dass die Knochenstruktur des ovinen Schienbeinkopfes wesentlich weniger belastbar ist als die menschliche. Der relativ dünne Spongiosasaum des Tibiakopfes über dem Fettmark lässt zumindest zum Zeitpunkt Null keinen Vergleich von Fixierungswerten mit humanen Parametern zu. Die Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf den Menschen ist durch diese genannten Gründe beschränkt.

Auch die Methoden der Präparatherstellung sollte trotz der gewissenhaften Durchführung kritisch betrachtet werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die entkalkungsbedingte Auflösung des  $\beta$ -TCP-Implantates besonders an den Grenzonen Knochen/Implantat und Sehne/Implantat wichtige Strukturen und Zellen verloren gehen. Diesbezüglich sind besonders die Osteoklasten hervorzuheben, da diese aufgrund ihrer Eigengröße vornehmlich an der Implantatoberfläche zu erwarten sind. Dieser Sachverhalt würde für die Auswertung an den angefertigten Dünnschliffpräparaten sprechen. Für eine präzise histologische Auswertung erschien jedoch das wesentlich dünnere (4  $\mu$ m) entkalkte Paraffinpräparat dem Dünnschliffpräparat (100  $\mu$ m) überlegen. Aufgrund des geringen Implantatdurchmessers ( $\varnothing = 7$  mm) konnte sehr häufig nur ein repräsentatives Dünnschliffpräparat pro Versuchstier hergestellt werden. Das Paraffinpräparat hingegen ermöglicht die Herstellung von Serienschnitten. Daher wurden die Dünnschliffpräparate lediglich für die histomorphometrische Auswertung verwendet.

Mit der Standzeit von 24 Wochen ist keine Aussage über das Langzeitergebnis zu treffen. Erfahrungsgemäß ist mit einem Abschluss des Transplantat-Remodellings frühestens nach 52 Wochen zu rechnen (JASKULKA; 1997; LABS, 2001; DUSTMANN, 2007; SCHMIDT, 2007).

## **4.2 Diskussion der histologischen Ergebnisse**

### **4.2.1 Einheilvorgänge des $\beta$ -TCPs**

Im Rahmen der makro- und mikroskopischen Analyse der Implantate konnten verschiedene Faktoren eruiert werden, die erheblichen Einfluss auf die Einheilvorgänge des  $\beta$ -TCPs haben. Auch wenn die verwendeten  $\beta$ -TCP-Implantate zur „press fit“-Fixierung und als Knochenersatzwerkstoff identisch waren, differierte deren Darstellung in situ. Am deutlichsten zeigten sich die Unterschiede nach 24 Wochen Standzeit.

Einen bedeutenden Faktor für die Einheilvorgänge des  $\beta$ -TCPs stellt die mechanische Beanspruchung des Implantates dar. Hierbei ist zwischen der intraoperativen Beanspruchung des

Implantates zum Zeitpunkt der Implantation und der postoperativen lokalspezifischen Beanspruchung am Implantationsort zu unterscheiden.

Die  $\beta$ -TCP -Implantate, welche die Bandplastik „press fit“ fixieren, wurden unter Aufwendung von mechanischer Kraft in den Knochen implantiert. Ferner unterlagen sie aufgrund der Mobilität der Versuchstiere unmittelbar postoperativ Scher-, Druck- und Zugbelastungen. Diese intraoperativen und postoperativen Belastungen führen bereits in den ersten 6 postoperativen Wochen zu einer progredienten physikalischen Degradation des  $\beta$ -TCPs und somit zu vermehrten Fragmentierungserscheinungen. Auf das zusätzlich implantierte „ $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff“ wurde während der Implantation und im weiteren Versuchsverlauf nur wenig mechanische Kraft ausgeübt (MAYR, 2007a). Dementsprechend war bei den Knochenersatzstoff-Implantaten im Vergleich zu den „press-fit“-Implantaten aufgrund der weniger ausgeprägten physikalische Degradation geringere Fragmentierungserscheinungen zu finden. Welcher Vorgang die Hauptursache für die Fragmentierung darstellt, kann bezüglich der tibialen Implantate nicht eindeutig gesagt werden. Das Röntgen der Kniegelenke nach der Tötung zeigte jedoch, dass die postmortalen Präparationsvorgänge als Ursache ausgeschlossen werden können. In Bezug auf die femoralen Implantate erscheint die Implantation die Hauptursache für die stärkere physikalische Degradation der „press fit“-Implantate zu sein, da die Anatomie und die mechanischen Tragachse des Schafhinterlaufes eine vergleichbare Belastung beider Femurkondylen gewährleistet. Ferner zeigen die biomechanischen (siehe MAYR, 2007a) und histologischen Ergebnisse, dass nach 6 Wochen Standzeit die durch das Sehnentransplantat bedingte mechanische Zug- oder Scherbeanspruchung aufgrund der hohen Nekrosequantität (vgl. **Kap. 4.2.2**) eher auszuschließen ist.

Das in diesem Versuch verwendete interkonnektierende  $\beta$ -TCP-Implantat wies eine Porengröße von 5  $\mu\text{m}$  auf. Es wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass die Porengröße des  $\beta$ -TCPs einen bedeutenden Einfluss auf dessen Einheil- und Degradationseigenschaften hat (BOHNER und BAUMGART, 2004; VON DOERNBERG et al., 2006; SCHLÜFTER, 2007). Diesen Studien nach verläuft die Degradation makroporösen  $\beta$ -TCPs (Porengröße > 100  $\mu\text{m}$ ) schneller als die mikroporösen  $\beta$ -TCPs (MAYR, 2007a).

Sowohl die „press fit“-Implantate beider Transplantatgruppen als auch die Knochenersatz-Implantate erwiesen sich bereits nach 6 Wochen als fest in den Wirtsknochen integriert. Bei den „press fit“-Implantaten bestand keine Dislokationstendenz bei der postmortalen Präparation der Kniegelenke, insbesondere bei der medianen Teilung der Implantate.

Bei der mikroskopischen Betrachtung zeigten sich auf der Implantatoberfläche der „press fit“- und der Knochenersatz-Implantate bereits nach 6 Wochen eine große Anzahl von Phagozyten, Osteoklasten und mehrkernige Riesenzellen. Über den gesamten weiteren Versuchszeitverlauf (12 und 24 Wochen Standzeit) war bezüglich der Quantität dieser Zellen keine Reduktion erkennbar. Die interkonnektierenden Poren von 5  $\mu\text{m}$  sind zu klein für die im Blut vor-

kommenden Blutzellen (Granulozyten  $\varnothing = 8-11 \mu\text{m}$ , Monozyten  $\varnothing = 12-20 \mu\text{m}$ , Osteoklasten, Osteoblasten, mehrkernige Riesenzellen  $\varnothing > 20 \mu\text{m}$ , Hämangioblasten  $\varnothing > 20 \mu\text{m}$ ) und verhindern deren Eindringen in das interkonnektierende Porensystem des  $\beta$ -TCP-Implantates (ROHEN und LÜDJEN-DRECOLL, 2000). Es können lediglich formflexible Blutzellen (Erythrozyten  $\varnothing \approx 7,5 \mu\text{m}$ ) in dieses Porensystem einwandern. Ferner ist vor Ablauf der physikalischen und chemischen Biodegradation keine hämangioblastisch gesteuerte Angiogenese innerhalb des Implantates möglich (ASAHARA und KAWAMOTO, 2004; BOHNER und BAUMGART, 2004; KOPP et al., 2004). Es findet somit eine zellvermittelte Biodegradation des  $\beta$ -TCP an der Implantatoberfläche statt, die über den gesamten Versuchszeitraum hinaus andauert. Die zellvermittelte Biodegradation (Resorption) greift auf die Phagozytose-Eigenschaften dieser Zellen zurück (vgl. **Kap. 1.8**). Sie ist folglich als ein aktiver Resorptionsprozess zu verstehen. In den Femora verlief die Resorption der mechanisch stark belasteten „press fit“-Implantate signifikant schneller als die der Knochenersatzwerkstoff-Implantate ( $p_{[24 \text{ Wochen}]} = 0,04$ ). Diese „press fit“-Implantate zeigten eine starke Fragmentierungsrate. Damit verbunden ist eine Oberflächenvergrößerung, welche wiederum zu einer Beschleunigung der Resorption der Keramik führt.

Zusätzlich haben Spongiosastruktur, Trophik und Vaskularisation Einfluss auf die Einheil- und Degradationseigenschaften von Knochenersatzwerkstoffen. Es zeigte sich in dem hier durchgeführten Versuch zwischen dem Femur und der Tibia ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich der Degradationseigenschaften ( $p_{[24 \text{ Wochen}]} = 0,002$ ). Die Dichte der knöchernen Trabekelstruktur unterscheidet sich bei Femur und Tibia. Der relativ hohen Trabekeldichte des Femur steht eine erheblich lockerere Trabekelstruktur der Tibia gegenüber. Ferner zeichnet sich die Tibia im Vergleich zum Femur durch höhere Anteile an vitalen Zellen sowie Stammzellen aus (HARRIS et al., 1998 und JACOBS, 2000). Welchen Stellenwert die Vaskularisation für die Resorption hat, wird besonders durch die Betrachtung der ROI Sehne/Implantat deutlich. Eine geringgradige Resorption des intakten  $\beta$ -TCPs war hier zum Teil auch nach 24 Wochen lediglich mikroskopisch erkennbar. Voraussetzung für diese Beobachtung war jedoch, dass keine durchgehende, querverlaufende Fragmentierungslinie das Implantat teilte. Bei Vorhandensein solcher Fragmentierungslinien konnte auch in der ROI Sehne/Implantat eine deutliche, zeitlich progrediente Resorption des Implantates auch makroskopisch beobachtet werden. Da das im Bohrkanal befindliche Sehnenstransplantat in den ersten 12 postoperativen Wochen deutliche Nekroseanteile aufweist (siehe **Kap. 4.2.2**), ist bei intaktem  $\beta$ -TCP die vaskuläre Versorgung der ROI Sehne/Implantat und somit die Migration von Stammzellen in diese ROI nicht in ausreichendem Maße gewährleistet. Die deutliche Mehrheit der Implantate zeigte jedoch besagte Fragmentierungerscheinungen. In der ROI Sehne/Implantat beider Transplantate fanden sich 12 Wochen post operationem dem Implantat aufliegende und im weiteren Zeitverlauf wachsende Knochenbälkchen mit Osteoblasten und Osteoklasten an der Oberfläche. Diese

Beobachtung bestätigt die Osteokonduktivität des  $\beta$ -TCP. Die beobachtete Osteokonduktivität in Verbindung mit der zunehmende Revaskularisation der Sehnentransplantate (siehe **Kap. 4.2.2**) lassen eine Zunahme der Knochenumbauaktivität und somit auch des Resorptionsausmaßes an der Grenzzone Sehne/Implantat ab der 24. postoperativen Woche erwarten. Dieser Vermutung konnte in der hier durchgeführten 24-Wochen-Studie jedoch nicht weiter nachgegangen werden und bietet sich daher als Untersuchungsbestandteil für nachfolgende Studien an. In dem Versuch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Fragmentierungserscheinungen und lokalisationsspezifischen Umgebungsfaktoren, die sich in einer signifikant höheren Resorptionsgeschwindigkeit des tibialen „press fit“-Implantates widerspiegelte. Es fanden sich an der Oberfläche des  $\beta$ -TCPs zahlreiche Phagozyten, Osteoklasten und mehrkernige Riesenzellen. Nach mindestens 12 Wochen Standzeit zeigten sich vereinzelt  $\beta$ -TCP-Partikel als gänzlich ossär ummantelt. An der Oberfläche dieser ummantelten  $\beta$ -TCP-Partikel konnten keine der oben genannten phagozytierenden Zellarten und keine Resorption mehr nachgewiesen werden. Die Biodegradation des  $\beta$ -TCP erfolgt somit überwiegend zellvermittelt (Resorption) über die Werkstoffoberfläche und wird von physikalischen Veränderungen (Fragmentierungsausmaß) beschleunigt. Hinsichtlich des Hauptanteils des implantierten Formkörpers zeigte sich jedoch auch nach 24 Wochen Standzeit keine oberflächliche ossäre Ummantelung, die der beschriebenen vereinzelt  $\beta$ -TCP-Partikel vergleichbar wäre. Auf der Implantatoberfläche waren histologisch nach Ablauf des Versuchszeitraumes weiterhin Phagozyten, mehrkernige Riesenzellen und Osteoklasten nachweisbar. Folglich war das Ende der Biodegradation nach 24 Wochen Standzeit noch nicht erreicht. Diese von lamellärem Knochen ummantelten Partikel verdeutlichen den osteoneogenetische Integrationsprozess,  $\beta$ -TCP wird zunehmend resorbiert und der resorptionsbedingte Substanzverlust des Implantates knöchern aufgefüllt. Die knöchern eingeschlossenen  $\beta$ -TCP-Partikel erlauben die Schlussfolgerung, dass die Geschwindigkeit der Resorption geringer ist als die Geschwindigkeit der Osteoneogenese. Der Verlauf der Osteoneogenese konnte anhand der deskriptiven Fluoreszenzmarkierung einzelner Versuchstiere der 12-Wochen-Gruppe dargestellt werden. Anhand der charakteristischen Fluoreszenzbanden konnte in den Dünnschliffpräparaten dieser Tiere eine vom Wirtsknochen in den Bohrkanal gerichtete Knochenneubildung nachgewiesen werden. Am deutlichsten zeigte sich dies in der ROI Knochen/Implantat. Dort wuchs das Knochengewebe bis an die Implantatoberfläche heran und lagerte sich ihr an.

Die histologische Untersuchung der ROI Knochen/Implantat zeigte eine vom Transplantat unabhängige Quantität von Osteoklasten und mehrkernigen Riesenzellen. Sowohl bei den Flexorsehnen- als auch bei den Patellasehnenpräparaten zeigten sich eine hohe Anzahl der genannten Zellen. Bezüglich der Quantität dieser Zellen konnten keine Unterschiede zwischen den Transplantatgruppen festgestellt werden (vgl. **Kap. 3.5.1**). Die Knochenreifung in der ROI Knochen /Implantat zeigte ebenfalls keine Unterschiede (vgl. **Kap. 3.10.1**).

Auch innerhalb des Implantates zeigte sich in Auswertung der Fluoreszenzpräparate eine sehr geringe Knochenneubildung. Mikroporöses, interkonnektierendes  $\beta$ -TCP hat demnach ein sehr geringes Kontakt- und ein sehr großes Distanz-Osteogenese-Potential. Als Kontakt-Osteogenese beschreiben NEUGEBAUER et al. (2004) die Knochenneubildung, die von der Implantatoberfläche ausgeht. Dem gegenüber steht die Distanz-Osteogenese, bei der die Knochenneubildung von der Implantatkavität (Bohrkanal bzw. der Wirtsknochen) ausgeht.

Unter Berücksichtigung der in die Diskussion einbezogenen Literatur zeigt sich, dass die histologischen Ergebnisse zur „press fit“-Fixierung mittels mikroporösen, interkonnektierenden  $\beta$ -TCPs bezüglich der knöchernen Integration beider Transplantate keinen Unterschied zur Interferenzschraubenfixierung erkennen lassen (siehe **Kap. 4.2.2**). Ferner unterstreicht die nachgewiesene hohe biomechanische Stabilität (MAYR, 2007a) die Eignung des  $\beta$ -TCPs zur „press fit“-Fixierung.

Da im Vergleich zum femoralen „press fit“-Implantat innerhalb von 24 Wochen Standzeit tibial mit  $41,65 \pm 19,8$  % mehr als die doppelte Menge des  $\beta$ -TCPs resorbiert wurde, bietet sich die hier untersuchte Methode vor allem für die tibiale Transplantatfixierung an. Bezüglich der Stabilität und des im folgenden Kapitel beschriebenen Einheilverhaltens der Bandplastik (**Kap. 4.2.2**) eignet sich mikroporöses, interkonnektierendes  $\beta$ -TCP für die „press fit“-Fixierung sowohl von synovialisierten Flexorsehnen- als auch von mit Knochenblock versehenen Patellasehnen-Transplantaten.

Auch wenn die Resorption des mikroporösen, interkonnektierenden  $\beta$ -TCPs langsam verläuft, so erweist sie sich als kontinuierlich und progredient. Das  $\beta$ -TCP wird resorbiert und zeitgleich knöchern ersetzt. Mikroporöses, interkonnektierendes  $\beta$ -TCP beweist in-vivo Biokompatibilität, Stabilität, Resorbierbarkeit und Osteokonduktivität und ist folglich auch als Knochenersatzwerkstoff geeignet.

#### **4.2.2 Einheilvorgänge der Sehnen-Transplantate**

Das native vordere Kreuzband weist im mittleren Abschnitt seines intraartikulären Verlaufes nur eine geringe Durchblutung auf (siehe **Kap. 1.2**). Alles in allem ist das native Kreuzband auf das Kapillargeflecht innerhalb des es umschließenden Synovialschlauches angewiesen. Da dieser Synovialschlauch bei der operativen Kreuzbandrekonstruktion mitsamt dem rupturierten Kreuzband entfernt wird, ist zum Erhalt der Vitalität und Funktionalität des Sehnen-Transplantates eine umfangreiche Ligamentisation nötig. Als Ligamentisation oder auch Ligamentisierung wird der Prozess bezeichnet, in dem das Sehnen-Transplantat über zelluläre Umbauvorgänge (Remodelling) die histologischen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften des nativen vorderen Kreuzbandes annimmt (DUSTMANN, 2007).

JASKULKA et al. (1997) diskutierten in ihrer Studie „*Der Ersatz des vorderen Kreuzbandes durch kältekonservierte Knochen-Kreuzband-Knochen-Allotransplantate*“ u. a. den Sachverhalt

der vaskulären Versorgung des Sehnentransplantates. Als Versuchstiere nutzen JASKULKA et al. (1997) ebenfalls Schafe. Sie verwendeten jedoch lediglich allogene kryokonservierte Patella-sehnentransplantate, deren Einheilverhalten sie über einen Zeitraum von 52 Wochen untersuchten.

Sie kamen zu dem Schluss, dass die Blutversorgung der knochenahnen intraartikulären Transplantatanteile aus dem Femur bzw. der Tibia und die des mittleren Anteils aus der Synovialis erfolgt. Da in der hier diskutierten Studie neben der Patellasehne auch die Flexorsehne als Sehnentransplantat verwendet wurde, lag die Erwartung nahe, dass die bereits synovialisierte Flexorsehne gegenüber der Patellasehne die besseren Voraussetzungen für eine Revitalisierung besitzt. Im Verlauf zeigte sich jedoch 12 Wochen post operationem bei der synovialisierten Flexorsehne ein hoch signifikant größeres Nekroseareal im Vergleich zur Patellasehne ( $p_{\text{Nekrose [12 Wochen]}} = 0,002$ ). Der geringe Nekroseanteil der Patellasehnentransplantate nach 12 Wochen Standzeit ist mit den Ergebnissen von JASKULKA et al. (1997) vereinbar. Auch RUPP und KOHN (1997) beschrieben in ihrem Bericht über die Kreuzbandersatz-Chirurgie, dass nach 6 bis 12 Wochen punktuelle Nekrosebezirke und zunehmende Revaskularisation innerhalb der intraartikulären Transplantatanteile zu beobachten sind. Jedoch fiel der Umfang der Nekrose besonders 6 Wochen post operationem in der vorliegenden Studie höher aus.

Auf der anderen Seite fanden sich in der hier diskutierten Studie in den synovialisierten Flexorsehnen nach 6 und auch nach 12 Wochen eine signifikant höhere Fibroblastenpopulation als bei den Patellasehnen ( $p_{\text{Fibroblasten [6 Wochen]}} = 0,04$ ;  $p_{\text{Fibroblasten [12 Wochen]}} = 0,009$ ). Bezüglich der Fibrozytenpopulation war hingegen zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied nachweisbar.

Der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Transplantaten besteht folglich in dem Zeitraum, den das Sehnentransplantat benötigt, um sich nach der Revaskularisation den neuen mechanischen Ansprüchen morphologisch anzupassen. Im Gegensatz zur synovialisierten Flexorsehne erreichte im Mittel der intraartikuläre Transplantatanteil der nicht synovialisierten Patellasehne früher den morphologischen Zustand, der dem eines nativen vorderen Kreuzbandes „ähnelt“ (vgl. **Kap. 3.4.1-3**). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch der nach 24 Wochen Standzeit erreichte histologische Zustand der Patellasehnentransplantate noch nicht dem nativer Kreuzbänder entsprach.

Auch DUSTMANN (2007) beobachtete diese intraartikulären Befunde in den von ihm untersuchten autologen Flexorsehnentransplantaten. In seiner Arbeit verglich er in einer Schafstudie die histologischen Befunde des Remodelling-Verlaufes autogener Flexorsehnentransplantate mit allogenen Flexorsehnentransplantaten. Vergleichbar mit den hier vorliegenden Ergebnissen beschreibt DUSTMANN (2007) eine hohe Varianz der Gesamtzellzahl innerhalb der intraartikulären Flexorsehnentransplantate im Zeitraum von 12 auf 52 Wochen Standzeit und führt dies auf die hohe Aktivität der Remodelling-Prozesse zurück. Die Gesamtzellzahl innerhalb der intraartikulären Patellasehnen zeigte hingegen eine deutlich geringere Varianz im Zeitraum von

6 auf 24 Wochen. Der Prozess des Transplantat-Remodellings erscheint demnach vor allem in den ersten 12 Wochen post operationem beim vorderen Kreuzbandersatz mittels Flexorsehne umfangreicher zu verlaufen als beim vorderen Kreuzbandersatz mittels Patellasehne.

Die Ergebnisse von DUSTMANN (2007) zeigen, dass der Vorgang des Remodellings auch nach 52 Wochen Standzeit nicht abgeschlossen ist. Eine Schlussfolgerung, die auch von JASKULKA et al. (1997) getroffen wurde. Diese Erkenntnis könnte in Bezug auf den Zeitpunkt der Vollbelastbarkeit bedeutsam sein. DUSTMANN empfindet aufgrund seiner Ergebnisse den Zeitpunkt 2 - 4 Monate post operationem als zu früh. Auch wenn sich die Ergebnisse von DUSTMANN lediglich auf das Flexorsehnentransplantat beschränken, so zeigen die hier gewonnenen Ergebnisse, dass sich diese langfristig auch auf die Patellasehnentransplantate übertragen lassen. Bezüglich der intraartikulären Transplantatanteile fanden sich in der vorliegenden Studie im direkten histologischen Vergleich nach 24 Wochen Standzeit zwischen den Flexor- und Patellasehnen keine Unterschiede mehr.

Die Befunde der im Bohrkanals lokalisierten Transplantatanteile entsprachen den Befunden der intraartikulären Transplantatanteile.

Neben dem Remodelling des intraartikulären Transplantatanteils ist das Einheilverhalten des Transplantates innerhalb des Bohrkanals entscheidend für die langfristige Stabilität und Prognose des Therapieergebnisses. RÖPKE et al. untersuchten 2001 in einer prospektiven Studie die langfristigen, postoperativen klinischen Ergebnisse der vorderen Kreuzbandrekonstruktion am Menschen unter Verwendung von Patellasehne und gedoppelter Semitendinosussehne als autologes Transplantat. Die Transplantate wurden von RÖPKE et al. mittels Titan-Interferenzschrauben fixiert. Sie stellten fest, dass am Menschen die operative Kreuzbandrekonstruktion über die Patellasehne eine frühzeitige und forcierte Rehabilitation ermöglicht. Als möglicher Grund dafür wird die rasantere Knochen-zu-Knochen-Einheilung des Knochenblocks der Patellasehne diskutiert (RÖPKE et al., 2001; SCHLICHTING, 2007). In der hier durchgeführten Studie konnte beobachtet werden, dass der Knochenblock des Patellasehnentransplantates primär knöchern in den Wirtsknochen einheilt und bereits nach 6 Wochen Standzeit fest integriert ist. Diese Beobachtung bestätigt die Untersuchungsergebnisse von RÖPKE et al. (2001). Bereits nach 6 Wochen konnte der ursprüngliche Knochenblock des Patellasehnentransplantates histologisch nur noch selten eindeutig abgegrenzt werden. Die Einheilung der Patellasehnentransplantate erfolgt in erster Linie über den Knochenblock-Knochen-Kontakt und erst in zweiter Linie, wie bei den Flexorsehnen-transplantaten, über die ossäre Integration des knochenblockfreien Transplantatgewebes in den Wirtsknochen.

Für das Einheilen der synovialisierten Flexorsehne und des knochenblockfreien Anteils der Patellasehnen ist u. a. der Anpressdruck des Transplantates in den Wirtsknochen entscheidend (TOMITA, 2001; WEILER et al., 2002b, HUNT et al., 2006, MAYR, 2007a). Eine gelenknahe

„press fit“-Fixierung erzeugt demzufolge einen hohen intraossären Anpressdruck, welcher die Voraussetzung für die primäre Insertion des Flexorsehnentransplantates darstellt. Bei der primären ossären Insertion wird das Sehnenstransplantat über die Bildung von ossifizierendem Knorpel direkt in das umliegende Knochengewebe integriert.

DYNBIL et al. beobachteten 2006 bei der vorderen Kreuzbandrekonstruktion mittels autologer Semitendinosussehne am Kaninchenmodell bereits nach 3 Wochen Standzeit vereinzelte Knorpelzellnester an der Grenze zwischen Sehnenstransplantat und Knochengewebe. Jedoch unterlagen die Transplantate bei DYNBIL et al. keinem vergleichbaren in den Knochen gerichteten Anpressdruck, da die Transplantate gelenkfern, periostal fixiert und somit „locker“ im BohrkanaI platziert waren. Bei solch einer gelenkfernen Fixierung entsteht der für die primäre ossäre Insertion benötigte Anpressdruck durch den anatomischen Verlauf des Transplantates in Kombination mit einer mechanischen Belastung des betroffenen Kniegelenkes. In der histologischen Auswertung der hier diskutierten Studie bestätigt sich nach 6 Wochen Standzeit der Versuchstiere der Befund von DYNBIL et al. (2006). Die Zunahme der Knorpelzellanzahl und deren progrediente Kalzifizierung im Zeitraum von 12 auf 24 Wochen zeigten, dass das Transplantatgewebe an der Grenzfläche zum Gelenk primär ossär integriert wird. Daraus resultierte eine Zunahme des lamellären Knochengewebes innerhalb des untersuchten Areals. Signifikante Unterschiede zwischen den Patellasehnen- und Flexorsehnentransplantaten fanden sich diesbezüglich nicht. Dennoch konnte in der Histomorphometrie festgestellt werden, dass der das Patellasehnentransplantate umgebende Knochen nach 24 Wochen Standzeit in dieser Grenzzone deutlich stärker mineralisiert war ( $p_{[24 \text{ Wochen} - \text{Os\%} / \text{Osteoid\%}]} = 0,004$ ). Unterschiede bezüglich der Aktivitäten der Knochenzellen (Osteozyten, Osteoblasten) waren jedoch zu keinem der drei untersuchten Standzeiträume zu erkennen.

Neben den Arealen mit Knorpelnestern mit progredienter Kalzifizierung fanden sich bei beiden Transplantaten auch Bereiche, an denen kein derartiger Anpressdruck vorhanden war und sich zwischen Transplantat und Knochen eine Zwischenschicht u.a. aus kollagenem Bindegewebe, Fibroblasten, Phagozyten und Blutgefäßeinsprossungen gebildet hatte. Diese Zwischenschicht war von zahlreichen Sharpey-artigen Fasern durchzogen, welche einen Verbund des Transplantates mit dem Wirtsknochen erkennen ließen und im Versuchsverlauf zunehmend ossifizierten. Ein Unterschied zwischen den Transplantaten war diesbezüglich nicht nachweisbar. WEILER (2002a) fand in seiner Schafstudie zwischen den mittels Interferenzschrauben fixierten Flexorsehnentransplantaten und dem Wirtsknochen ebenfalls diese fibröse Zwischenschicht. WEILER nimmt an, dass ein Zwischenraum zwischen Knochen und Transplantat nicht zu vermeiden ist und dieser sich mit fibrösem Gewebe auffüllt. Vielmehr geht er davon aus, dass eine dünne fibröse Zwischenschicht sich vorteilhaft auf die Transplantatintegration auswirkt.

Auch der im BohrkanaI platzierte Transplantatanteil durchlief über den gesamten Versuchsverlauf der vorliegenden Studie ein Remodelling. Nach 6 Wochen zeigten sowohl Flexorsehnen- als auch Patellasehnen-Transplantate umfangreiche zellarme bis zellfreie Areale, die im weiteren Versuchsverlauf zunehmend eine Repopularisation durch Fibroblasten und Fibrozyten erfuhren. Trotz der teilweise nekrotisch wirkenden Morphologie der Sehnen-Transplantate, war dennoch stets die Grundstruktur der Sehne zu erkennen. Ein Befund, der auch von JASKULKA et al. (1997) beschrieben wird. Jedoch stellten sie diesen Sachverhalt als Vorteil eines transplantierten allogenen Kreuzbandes gegenüber transplantiertem autologem Sehngewebe dar, da sich im Falle des allogenen Kreuzbandes ein Remodelling erübrige bzw. nicht so umfangreich sei. Ein Befund, der von der hier diskutierten Studie nicht gestützt wird.

BÖHRINGER (1993) berichtet in seiner Arbeit über die Rolle der angelegten Vorspannung des Transplantates bei der operativen Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mit einem autologen Patellasehnen-Transplantat in einer Schafstudie. Er beschrieb, dass bereits ab einer Vorspannung 50 N eine deutlich höhere Anzahl an Sharpey-artigen Fasern beobachtet werden konnten. In der vorliegenden Studie wurde vor der Fixierung des Transplantates eine Vorspannung von 90 N angelegt.

In der biomechanischen Auswertung des hier diskutierten Tierversuches beschrieb MAYR (2007a), dass unter Aufwendung von linearer Zugkraft alle Transplantate intraligamentär rupturierten. Die bis zum Versagen des Transplantates benötigte Kraft stieg dabei über den Versuchszeitraum deutlich an. Diese Befunde sprechen für eine stabile Integration des Transplantates innerhalb des BohrkanaIs. Für die hier vorliegende Arbeit wurde das mittlere Drittel des  $\beta$ -TCP-Passzylinders in der Histologie umfassend und statistisch ausgewertet; die anderen Anteile wurden deskriptiv beurteilt (vgl. **Kap. 2.6.2** und **Abb. 17**). Im BohrkanaI war nach 24 Wochen Standzeit kein sehnencharakteristisches straffes Bindegewebe erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass hier das Sehnen-Transplantat keiner bedeutenden mechanischen Belastung mehr ausgesetzt ist. Die für die Zugstabilität verantwortliche Fixierung ist folglich nicht in dem hier untersuchten intraossären Areal zu suchen, sondern vielmehr in dem gelenknahen Areal. Deskriptiv konnten am artikulären Bohrlocheingang bei beiden Transplantaten massive ossifizierte Knorpelareale gefunden werden, die WEILER (2002c) als die „dem nativen Kreuzband entsprechende Bandinsertion“ bezeichnet.

SCHLICHTING untersuchte 2007 in einem Schafversuch das Einheilverhalten von Patellasehnen- und Flexorsehnen-Transplantaten. Zur Fixierung der Transplantate nutzte sie biodegradierbare Interferenzschrauben (PLLA) und Compositeschrauben (TCP/HA). In ihren Ergebnissen beschrieb SCHLICHTING als wichtigste Voraussetzung für eine gute Langzeitprognose der vorderen Kreuzbandrekonstruktion die ossäre Einheilung des Transplantates auf Gelenkniveau. Das Gelenkniveau entspricht laut SCHLICHTING dem Bereich, an dem die transplantierte Patellasehnenplastik keinen Knochenblock aufweist. Die sehnigen Anteile

sowohl der Flexorsehnen- als auch der Patellasehnen-Transplantate müssen daher gleichermaßen knöchern integriert werden. Die Schlussfolgerungen von SCHLICHTING werden von den hier erhobenen Befunden gestützt.

#### **4.2.3 Schlussfolgerung**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter „press fit“-Fixierung mittels eines mikroporösen, interkonnektierenden  $\beta$ -TCP-Passzylinders eine suffiziente Rekonstruktion eines rupturierten vorderen Kreuzbandes erreicht werden kann. Das synovialisierte Flexorsehnen- und das mit Knochenblock versehene Patellasehnen-Transplantat liefern unter dieser Fixierungsmethode langfristig vergleichbare Ergebnisse.

Die hier untersuchte Methode der „press fit“-Fixierung stellt somit eine Erfolg versprechende Alternative zu den heute gängigen Fixierungsmöglichkeiten dar (vgl. **Kap. 1.5**). Bezüglich der Primärstabilität wäre bis zum heutigen Tage die Titan-Interferenzschraube die effektivste Fixierungsmethode. Da das Titan ein Revisionshindernis darstellt, wird die Titan-Interferenzschraube heutzutage zur Fixierung nicht mehr genutzt. In mechanischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Primärstabilität eines mittels  $\beta$ -TCP-Passzylinder fixierten Sehnen-Transplantates zum Zeitpunkt „Null“ der Primärstabilität eines mittels Titan-Interferenzschraube fixierten Transplantates gleichwertig ist (MAYR, 2007a). Ferner sind die histologischen Ergebnisse der Einheil- und Remodelling-Prozesse unter  $\beta$ -TCP -„press fit“-Fixierung mit denen der Titanschrauben-Fixierung vergleichbar. In beiden Methoden zeigen sich initial Nekrosen mit darauf folgender Revitalisierung und Remodelling.

Die Wahl des Transplantates erscheint für die „press fit“-Fixierung mittels mikroporösen  $\beta$ -TCPs als unerheblich. Im direkten histologischen Vergleich von synovialisierter Flexorsehne und mit Knochenblock versehener Patellasehne war festzustellen, dass die Gewebereaktion innerhalb der Sehnen-Transplantate und die des umliegenden Knochens bei einem Untersuchungszeitraum von 24 Wochen über den zeitlichen Verlauf dieselben histologischen Langzeitergebnisse liefern.

Das verwendete  $\beta$ -TCP ist biokompatibel sowie osteokonduktiv und wird im zeitlichen Verlauf resorbiert und knöchern ersetzt. Es stellt zu keinem Zeitpunkt ein Revisionshindernis dar. Auf der anderen Seite zeichnet sich das mikroporöse  $\beta$ -TCP durch eine hohe mechanische Belastbarkeit aus, sodass es sich in der hier getesteten Form auch als Knochenersatzwerkstoff für Knochendefekte in mechanisch hoch beanspruchten Bereichen des Skeletts anbietet. Eine Erhöhung der Stabilität erfolgt jedoch auf Kosten der Resorptionsgeschwindigkeit. Mikroporöses  $\beta$ -TCP wird langsamer resorbiert als das bereits in Verwendung befindliche makroporöse  $\beta$ -TCP.

## **5 Zusammenfassung**

Obwohl die Geschichte der Kreuzbandchirurgie bereits mehr als 160 Jahre andauert, ist die Suche nach der idealen Fixierungstechnik bis zum heutigen Tag noch nicht beendet. Die in der Moderne verwendete Titan-Interferenzschraube ermöglicht zwar eine stabile Transplantatfixierung, sie stellt jedoch einen Fremdkörper dar, der eine Revision erschweren kann. Die in der heutigen Zeit genutzte degradierbare Interferenzschrauben entspricht in ihren Fixierungseigenschaften nicht den Erwartungen und „press fit“-Fixierungstechniken mittels autologer Knochenblöcke besitzen eine zu große ossäre Invasivität.

In dieser in-vivo-Schafstudie sollte die „press fit“-Fixierung zweier Bandplastiken mittels eines mikroporösen (5µm)  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Zylinders ( $\beta$ -TCP) mit interkonnektierenden Poren untersucht werden. Der Passzylinder hatte einen Durchmesser von 7 mm und eine Länge von 25 mm und wurde in dieser Form in vivo noch nicht untersucht. Daher erfolgte parallel die Untersuchung des  $\beta$ -TCPs in dieser Form auf dessen Eignung als Knochenersatzstoff. Als Bandplastiken dienten die synovialisierte Flexorsehne und die mit Knochenblock versehene Patellasehne. Das Einheilverhalten der Implantate und Transplantate wurde für drei Standzeiten (Tötung nach 6, 12 und 24 Wochen) histologisch und histomorphometrisch untersucht.

Durch die Studie konnte nachgewiesen werden, dass der verwendete  $\beta$ -TCP-Passzylinder für die „press fit“-Fixierung einer vorderen Kreuzbandplastik geeignet ist. Die Wahl des autologen Transplantates erscheint für das längerfristige histologische und histomorphometrische Ergebnis in der hier untersuchten Methode als unerheblich. Sowohl die synovialisierte Flexorsehne als auch die mit Knochenblock versehene Patellasehne wurden im zeitlichen Verlauf ossär integriert und die Knochenreifung der umliegenden Spongiosa zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Integration erfolgte in Regionen unter „press fit“-Bedingungen über primäre ossäre Integration. In Regionen mit lockerem Transplantat-Knochen-Kontakt wurde das Transplantat ossär über Sharpey-artige Fasern in das Knochengewebe integriert. Unterschiede zwischen den Transplantaten bezüglich ihres Einheilverhaltens waren vornehmlich nach 6 und 12 Wochen Standzeit zu erheben. Der Knochenblock der Patellasehne war bereits nach 6 Wochen knöchern integriert. Beide verwendeten Sehnen-Transplantate unterlagen im Versuchszeitraum einem ausgeprägten Remodelling-Prozess. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Patellasehnen-Transplantat in den ersten 12 Wochen schneller an die neuen mechanischen Anforderungen anpassen kann als das Flexorsehnen-Transplantat. Ob das Flexorsehnen-Transplantat postoperativ ein umfangreicheres Remodelling erfährt, konnte aufgrund der geringen Untersuchungszeitpunkte nicht eindeutig geklärt werden. Nach 24 Wochen Standzeit zeigten sich diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den beiden Transplantaten mehr, jedoch war der Remodelling-Prozess noch nicht abgeschlossen.

Mikroporöses, interkonnektierendes  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff erwies sich im Versuchverlauf als biokompatibel, belastungsstabil und osteokonduktiv. Ferner konnte die Resorbierbarkeit auch bei einer Porosität von  $5\mu\text{m}$  nachgewiesen werden. Auch wenn die Degradation des mikroporösen  $\beta$ -TCP langsamer verläuft als die des makroporösen, konnte nachgewiesen werden, dass der degradierte  $\beta$ -TCP-Anteil unmittelbar knöchern ersetzt wird. Die Degradation des  $\beta$ -TCP's war nach 24 Wochen Standzeit nicht abgeschlossen. Mikroporöses, interkonnektierendes  $\beta$ -TCP erwies sich in der Schafstudie somit als geeigneter Knochenersatzwerkstoff.

## **6 Literaturverzeichnis**

1. Amling M: Physiologie und Pathophysiologie des Skelettsystems. In: 3. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biomechanik (29.-31.5.2003) – Instructional Course II: Biologie und mechanische Kompetenz des Knochens. (2003) 2-15
2. Asahara T, Kawamoto A: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (2004), 572 – 579
3. Bangert K: Herstellung und Charakterisierung von Calciumorthosphaten für die Anwendung als Knochenersatzwerkstoffe. Dissertation, Universität Würzburg (2005)
4. Banzhaf M: Biomechanische Testung der femoralen Pressfit-Technik beim Ersatz des vorderen Kreuzbandes mittels Patellarsehne. Dissertation, Universität Tübingen (2007)
5. Barka T, Anderson PJ: Histochemistry: Theory, practice and bibliography. Hoeber Medical Division, Harper and Row Publisher Inc., New York, Evanston, London, 1963, pp. 212-256
6. Bernstein A: Osteokonduktive Keramiken für Implantatbeschichtungen in der Orthopädie - Eine In-vitro- und In-vivo-Studie, Habilitation, Universität Halle (2008)
7. Betz O: Die Heilung von Knochendefekten nach Auffüllung mit synthetischen, resorbierbaren Kompositmaterialien im Vergleich zu autogenen Spongiosatransplantaten. Dissertation, Universität Ulm (2001)
8. Bleier T: Untersuchung zur Einteilung und Pathogenese des felinen Fibrosarkoms. Dissertation, Universität Gießen, Laufersweiler, Wetttenberg (2003)
9. Böhringer M: Histologische und Computertomographie-Osteoabsorptiometrische Langzeituntersuchungen zur autologen Kreuzbandrekonstruktion mit einem freien Patellasehnen-transplantat unter Anlegen definierter Vorspannungen im Schafmodell. Dissertation, Universität München, 1993
10. Böhner M, Baumgart F: Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 25 [17] (2004) 3569-3582
11. Bohumil VR, Peelen JGJ, de Groot K: Tri-Calcium Phosphat as a Bone Substitute. *J Bioeng* 1 (1976) 93-97
12. Bröhl CA: Morphologischer Vergleich verschiedener operativer Knorpelersatztechniken im Schafskniemodell. Dissertation, Universität Lübeck (2004)
13. Buhl M: Histologische Studie zum zeitlichen Heilungsablauf der subtrochantären Mehrfragmentfraktur des Schaffemurs mit Hilfe der polychromen Sequenzmarkierung. Dissertation, Universität Marburg (2001)
14. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK: Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 234 (1994) 206-210
15. Cameron E, von Stokar P: Das Kreuz mit de Kreuzband. SportMed Solothurn Regio (2006), [http://www.sportmed-sr-ch/data/kreuzband\\_ec\\_pvst.pps](http://www.sportmed-sr-ch/data/kreuzband_ec_pvst.pps)

16. Christian R, Ludwig-Mayerhofer W: Kruskal-Wallis H-Test. Internet-Lexikon der Methoden der empirischen Sozialforschung (2005), [http://www.lrz-muenchen.de/~wln/ilm\\_k20.htm](http://www.lrz-muenchen.de/~wln/ilm_k20.htm)
17. Dt. Ges. f. Orthopädie und orthopäd. Chirurgie + BV d. Ärzte f. Orthopädie (Hrsg.) Leitlinien der Orthopädie. Dt. Ärzte-Verlag, 2. Auflage, Köln 2002
18. Dhert WJ, Thomson P, Blomgren AK, Esposito M, Ericson LE, Verbout AJ: Integration of press-fit implants in cortical bone: a study on interface kinetics. *J Biomed Mater Res* 41 (1998) 574-583
19. Diekstall P, Rauhut F: Überlegung zur Differentialindikation der vorderen Kreuzbandplastik. *Unfallchirurg* 102 (1999) 173-181
20. Dustmann M: Histologische und immunhistologische Untersuchungen zum Transplantat-Remodeling nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes mit freiem autologen und allogenen Sehnentransplantat. Dissertation, Universität Berlin (2007)
21. Dynybil C, Kawamura S, Kim HJ, Ying L, Perka C, Rodeo SA: Der Einfluss von Osteoprotegerin auf die Sehne-zu-Knochen-Heilung nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes: Eine histomorphologische und radiographische Studie im Kaninchenmodell. *Z Orthop* 144 (2006) 179-186
22. Eichhorn HJ, Birkner W: Aktuelle Trends zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. *SFA-Arthroskopie aktuell* 19 (2006)
23. Engelhardt M, Freiwald J, Rittmeister M: Rehabilitation nach vorderer Kreuzbandplastik. *Orthopäde* 31 (2002) 791-798
24. Epple M: Biomaterialien und Biomineralisation – Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Teubner, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, 2003
25. Fiechter RM-E.: Am Schafmodell reproduziertes Femoroacetabuläres Impingement, häufigste Ursache der frühen Osteoarthritis beim nichtdysplastischen Hüftgelenk. Dissertation, Universität Zürich (2005)
26. Franke M: Biomaterialien in der Medizin – Gewebereaktion und Biokompatibilität nach Implantation von Hydroxylapatit-Polyethylen (Hapex<sup>TM</sup>) in Weichgewebe und Ulnadefekt beim Kaninchen. Dissertation, Universität Gießen, Laifersweiler, Gießen, 2007
27. Grolms O: Mechanische Aktivierung und Zementbildung von  $\beta$ -Tricalciumphosphat. Dissertation, Universität Würzburg (2005)
28. Häfner M: Die augmentierte Kreuzbandnaht. Dissertation, Universität München (2004)
29. Harris M, Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman JA: Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. *Bone* 22 (1998) 141-145
30. Heller MO, Duda GN, Ehrig RM, Schell H, Seebeck P, Taylor WR: Muskuloskeletale Belastungen im Schafhinterlauf: Mechanische Rahmenbedingungen der Heilung. *Mat.-wiss. U. Werkstofftech.* 36 (2005) 775-780

31. Hertel P, Cierpinski T: Vorderes Kreuzband ersetzen: Sicher, funktionell, frei von Fremdmaterial, ökonomisch. Orthoprot. 03 (2004) 4-6
32. Hunt P: Elektronenmikroskopische Analyse des Remodeling eines freien Sehnen-  
transplantates nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes unter lokalem Einfluss von platelet-  
derived growth factor (PDGF-BB). Dissertation, Universität Berlin (2003)
33. Hunt P, Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A: A model of soft-tissue graft anterior  
cruciate ligament reconstruction in sheep. Arch Orthop Trauma Surg 125 (2005) 238-248
34. Hunt P, Rehm O, Weiler A: Soft tissue graft interference fit fixation: observation on graft  
insertion site healing and tunnel remodeling 2 years after ACL reconstruction in sheep.  
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 14 (2006) 1245-1251
35. [http://www.dfk-koeln.de/dfk\\_de/default.aspx?pduid=\\_\\_DetailPage\\_\\_&mduid=mdl\\_20061203T143652843&iduid=cid\\_20061203T145816937&member=Copy&onpage=false](http://www.dfk-koeln.de/dfk_de/default.aspx?pduid=__DetailPage__&mduid=mdl_20061203T143652843&iduid=cid_20061203T145816937&member=Copy&onpage=false)
36. [http://www.stryker.de/index/de\\_pag\\_anwenderinfo/de\\_pag\\_produktportfolio/de\\_pag\\_endoskopie/de\\_pag\\_sportmedizin/de\\_pag\\_kreuzband.htm](http://www.stryker.de/index/de_pag_anwenderinfo/de_pag_produktportfolio/de_pag_endoskopie/de_pag_sportmedizin/de_pag_kreuzband.htm)
37. Jacobs CR: The mechanobiology of cancellous bone structural adaption. J Rehabil Res Dev 37 (2000) 209-216
38. Jansen JA, Dhert WJ, van der Waerden JP, von Recum AF: Semiquantitative and qualitative  
histologic analysis method for the evaluation of implant biocompatibility. J Invest Surg 7  
(1994) 123-134
39. Jaskulka R, Ittner G, Birkner T: Der Ersatz des vorderen Kreuzbandes durch  
kältekonservierte Knochen-Kreuzband-Knochen-Allotransplantate. Unfallchirurg 100 (1997)  
724-736
40. Kornak U, Dellling G, Mundlos S: Molekulare Mechanismen der Regulation der  
Knochendichte durch Osteoklasten. Dtsch Ärztebl 19 (2003) 1258-1268
41. Krämer J, Grifka J: Orthopädie. 7. Aufl. Springer, Heidelberg, 2005
42. Kopp CW, Minar E, Steiner S: Therapeutische Angiogenese bei peripher-arterieller  
Verschlußkrankheit. Journal für Kardiologie 11 [3] (2004), 79-83
43. Labs K: Klinische Langzeitergebnisse und experimentelle Untersuchungen zur  
Stimulierbarkeit des Ein- und Umbauverhalten einer autologen vorderen Kreuzbandplastik.  
Habilitation, Universität Berlin (2001)
44. Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Descamps M, Thierry B: Role of  
interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. J Mat Sci  
10 (1999) 111-120
45. Mayr HO: Mikroporöse Formkörper aus phasenreinem beta-Tricalciumphosphat zur  
Fixierung der vorderen Kreuzbandplastik und als Knochenersatz – biomechanische,  
radiologische und histologische Untersuchungen zur Erforschung der Stabilität und des  
Einheilverhaltens. Habilitation, Universität Halle (2007a)

46. Mayr HO, Dietrich M, Fraedrich F, Hube R, Nerlich A, von Eisenhart-Rothe R, Hein W, Bernstein B: Microporous Pure  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Implants for Press-Fit Fixation of Anterior Cruciate Ligament Grafts: Strength and Healing in a Sheep Model. *Arthroscopy* 25 [9] (2009) 996-1005.
47. Mayr HO, Hube R, Bernstein A, Seibt AB, Hein W, von Eisenhart-Rothe R: Beta-tricalcium phosphate plugs for press-fit fixation in ACL reconstruction – A mechanical analysis in bovine bone. *The Knee* 14 (2007b) 239-244
48. Mayr HO, Plitz WO, Beck T: Impaktierende Befestigung bei Vorderer Kreuzbandplastik. *Arthroskopie* 10 (1997) 121-125
49. Muchow S: Vergleich zweier identischer Fixateure mit unterschiedlichen Schersteifigkeiten am Schafmodell – Histologie und Histomorphometrie der Frakturheilung. Dissertation, Universität Berlin (2006)
50. Musahl V, Abramowitch SD, Gabriel MT, Debski RE, Hertel P, Fu FH, Woo SL: Tensile properties of an anterior cruciate ligament graft after bone-patellar tendon-bone press-fit fixation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 11 (2003) 68-74
51. Muschik M, Ludwig R, Halbhübner S, Bursche K, Stoll T:  $\beta$ -tricalcium-phosphat as a bone substitute for dorsal spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis: preliminary results of a prospective clinical study. *Eur Spine J* 10 (2001) 178-184
52. Neugebauer J, Karapetian VE, Scheer M, Zöller JE: Aktuelle Aspekte der Osteointegration. *Implantologie Journal* 8 (2004) 6-11
53. Niedhart C, Niethard FU: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: *Bioceramics in Orthopaedics – New applications, Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Ceramic Wear Couple*. February 14 Stuttgart Germany (1998) 46-50
54. Nkenke E, Kloss F, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Tröger M, Loos K, Wilhelm F, Neukam FW: Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteome technique. *Clin Oral Impl Res* 13 (2002) 595-602
55. Nöbel D: Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz. Dissertation, Universität Leipzig (2006)
56. O'Brien SJ, Warren RF, Pavlov H, Panariello R, Wickiewicz TL: Reconstruction of the Chronically Insufficient Anterior Cruciate Ligament with the Central Third of the Patellar Ligament. *J Bone Joint Surg Am* 73 (1991) 278-286
57. Parfitt AM: Bone histomorphometry, Proposed system for standardization of nomenclature, symbols and units. *Calcif Tissue Int.* 6 (1988) 515-517
58. Partale K: Einfluss von Belastung und einer Implantatbeschichtung auf die knöcherne Integration von Schanz'Schrauben. Dissertation, Universität Berlin (2003)
59. Rahn BA: Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens. *Nova Acta Leopoldina* 44 [266] (1976) 249-255

60. Reichel H: Der diaphysäre Knochen nach Kallusdistraktion: densitometrische, biomechanische und histologische Untersuchungen zur operativen Beinverlängerung. Zuckschwerdt, München, 1998
61. Richter J, Muhr G: Rekonstruktive Kreuzband-Chirurgie. Unfallchirurg 103 (2000) 254 -257
62. Röpke M, Becker R, Urbach D, Nebelung W: Semitendinosussehne vs. Ligamentum patellae. Unfallchirurg 104 (2001) 312-316
63. Rohen JW, Lüdjen-Drecol E: Funktionelle Histologie. 4. Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York, 2000
64. Romeis: Mikroskopische Technik. Hrsg.: P. Böck, 17. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1989
65. Rudroff T: Kreuzbandruptur und Rekonstruktion des Ligamentum Cruciatum anterius mit Patellar- und Semitendinosussehnentransplantat. Dissertationsschrift, Universität Konstanz (2001)
66. Rupp S, Kohn D: Forschungsergebnisse zur Therapie der Ruptur des vorderen Kreuzbandes. Magazin Forschung Universität des Saarlandes 2 (1997) 30-36
67. Scheffler SU, Südkamp NP, Gockenjan A, Hoffmann RF, Weiler A: Biomechanical comparison of hamstring and patellar tendon graft anterior cruciate ligament reconstruction techniques: The impact of fixation level and fixation method under cyclic loading, Arthroscopy 18 (2002) 304-315
68. Schmidt A: Vergleich von Mittel- und Langzeitergebnissen nach vorderer Kreuzbandplastik mit dem mittleren Patellarsehnedrittel unter besonderer Berücksichtigung von Arthroseentwicklung und Versorgungszeitpunkt. Dissertation Universität des Saarlandes (2006)
69. Schmidt T: Untersuchung der Revaskularisierung und des Remodellings allogener und autologer freier Sehnentransplantate zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes – Eine histologische Langzeitstudie. Dissertation, Universität Berlin (2007)
70. Schiborra F: Das juvenile Schaf als Modelltier für orthopädische Studien: Untersuchungen an Sehne, Kreuzband, Meniskus und Gelenkknorpel während des Wachstums. Dissertation, Universität Hannover (2006)
71. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M: Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. Biomaterials 25 (2004) 3963-3972
72. Schlichting K: Einheilung von Patellarsehnen- vs. Beugesehnentransplantaten nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes – Histologische Untersuchung am Schaf. Dissertation, Universität Berlin (2007)
73. Schlüfter S: In vitro Untersuchungen zum Abbauverhalten von Calciumphosphat-Keramiken. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena (2007)

74. Schrimpf FM: Beeinflussung der Gelenkknorpelregeneration beim Schaf durch den Einsatz resorbierbarer Implantate. Dissertation, Universität München (2004)
75. Sobau C, Ellermann A: Die vordere Kreuzbandplastik mit Hamstringsehnen bei Kindern und Jugendlichen. *Unfallchirurg* 107 (2004) 676-679
76. Stürmer KM: Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. *Orthopäde* 25 (1996) 386-393
77. Tebart U: Untersuchungen zur Optimierung von Osteosynthesen am Beispiel hydroxylapatit-beschichteter Fixateur-externe-Pins. Dissertation, Universität Hannover (2003)
78. Tomita F, Yasuda K, Mikami S, Sakai T, Yamazaki S, Tohyama H: Comparisons of Intraosseous Graft Healing Between the Doubled Flexor Tendon Graft and the Bone-Patellar Tendon-Bone Graft in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Arthroscopy* 17 [5] (2001) 461-476
79. Unterhauser FN: Revaskularisierung und Nachweis von Myofibroblasten im freien Sehnentransplantat nach vorderem Kreuzbandersatz. Dissertation, Universität Berlin (2004)
80. van Hemert WLW, Willems K, Anderson PG, van Heerwaarden RJ, Wymenga AB: Tricalcium phosphate granules or rigid wedge preforms in open wedge high tibial osteotomy: a radiological study with a new evaluation system. *Knee* 11 [6] (2004) 451-456
81. von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, Grunenfelder S, van Lenthe GH, Muller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G Auer J: In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27 (2006) 5186-5198
82. Wehrhan F, Nkenke E, Srour S, Schlegel A: Knochenersatzmaterialien – Biologischer Hintergrund und klinische Evidenz. *zm* 10 (2008) 47-52
83. Weiler A: Anatomische "Hamstringsehnen" Verankerung mit Interferenzschrauben beim Kreuzbandersatz. Habilitation, Universität Berlin (2002a)
84. Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ, Rehm O, Südkamp NP: Tendon Healing in a Bone Tunnel. Part II: Histological Analysis After Biodegradable Interference Fit Fixation in a Model of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep. *Arthroscopy* 18 (2002b) 124-135
85. Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A, Abel C, Südkamp NP, Hoffmann RF: Tendon Healing in a Bone Tunnel. Part I: Biomechanical Results After Biodegradable Interference Fit Fixation in a Model of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep. *Arthroscopy* 18 (2002c) 113-123
86. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P: Degradation Characteristics of  $\alpha$  and  $\beta$  Tri-Calcium-Phosphate (TCP) in Minipigs. *J Biomed Mater Res* 63 (2002) 115-121
87. Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G: Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde* 212 (1990) 479-488

**7 Anhang**

Reaktionszone	Antwort	Score	Abschätzung in Prozent
<b>ROI Knochen/Implantat</b> Ossäre Integration Implantat OsIn/D (mm)	2.6-3.5 mm ( vollständiger Durchbau)	4	
	1.6-2.5mm	3	
	0.6-1.5mm	2	
	0-0.5 mm	1	
	Nicht nachweisbar	0	
<b>ROI Knochen/Implantat</b> Ossäre Reaktion Implantat OsRe/D-Q	Qualitative Auswertung		
	Lamellärer Knochen, wie originaler Knochen	4	
	Knochen mit dominierender osteoblastischer Aktivität (Knochenbildungsaktivität)	3	
	phagozytäre Reaktion auf der Oberfläche des Dübels (inkl. Risse)	2	
	„Knorpel-/Faser-Callus“ (alles andere außer Knochen)	1	
	lockeres „Granulations- und Fasergewebe“	0	
<b>ROI Knochen/Implantat</b> Umgebungsreaktion um Implantatstelle Umlmp (µm)	Knochenneubildung in der Umgebung des Dübels		
	>1500 µm	4	
	1001 µm-1500µm	3	
	501-1000µm	2	
	0-500 µm	1	
	Nicht nachweisbar	0	
<b>ROI Knochen/Implantat</b> Umgebungsreaktion um Implantatstelle Umlmp-Q	Qualitative Auswertung (Knochenneubildung)		
	Lamellärer Knochen, wie originaler Knochen	4	
	Knochen mit dominierender osteoblastischer Aktivität (Knochenbildungsaktivität)	3	
	Knochen mit osteoblastischer und/oder (evtl. dominierender?) osteoklastischer Aktivität	2	
	„Knorpel-/Faser-Callus“ (alles andere außer Knochen)	1	
	prädominante Entzündung, lockeres „Granulations- und Fasergewebe“	0	
<b>ROI Knochen/Implantat</b> Ossäre Integration Implantat OsIn/D-If	Interface Qualität		
	direkter Kontakt Knochen-Implantat ohne bindegewebige Zwischenschicht	4	
	Umbaulakunen mit Osteoblasten und/oder Osteoklasten an der Oberfläche	3	
	Lockeres Bindegewebe nicht organisiert als Kapsel	2	
	Fibröse Gewebekapsel	1	
	Entzündung	0	
<b>Knochenblock/Bohrkanal</b>	<b>sehniger Anteil liegt an</b>	0	
	<b>knöcherner Anteil liegt an</b>	1	
<b>ROI Knochen/Sehne</b> K/S (µm)	Knochenneubildung in der Umgebung der Sehne		
	>1500 µm	4	
	1001 µm-1500µm	3	
	501-1000µm	2	
	0-500 µm	1	
	Nicht nachweisbar	0	
<b>ROI Knochen/Sehne</b> K/S-Q	Qualitative Auswertung Knochen		
	Lamellärer Knochen, wie originaler Knochen	4	
	Knochen mit dominierender osteoblastischer Aktivität (Knochenbildungsaktivität)	3	
	Knochen mit osteoblastischer und/oder (evtl. dominierender?) osteoklastischer Aktivität	2	
	„Knorpel-/Faser-Callus“ (alles andere außer Knochen)	1	
	prädominante Entzündung, lockeres „Granulations- und Fasergewebe“	0	
<b>ROI Knochen/Sehne</b> K/S-Q	Qualitative Auswertung Sehne		
	Knochen mit osteoblastischer Aktivität (Knochenbildungsaktivität)	4	
	Hyaliner Knorpel (Säulenknorpel) und oder Fasernknorpel	3	
	straffes kollagenes Bindegewebe	2	
	Entzündung, lockeres „Granulations- und Fasergewebe“	1	
	Nekrose	0	
<b>ROI Knochen/Sehne</b> K/S-If	Interface Qualität		
	knöcherner Umbau im Grenzbereich	4	
	direkter Kontakt Knochen-Sehne ohne bindegewebige Zwischenschicht	3	
	Bindegewebige Zwischenschicht ohne Sharpey Fasern	2	
	Lockeres Bindegewebe , zellreich, Makrophagen, Sharpey Fasern	1	
	Entzündung	0	
<b>ROI Knochen/Sehne</b> <b>Knochenblock/Knochen</b> KB/K-Q	Qualitative Auswertung		
	Lamellärer Knochen, wie originaler Knochen	4	
	Knochen mit dominierender osteoblastischer Aktivität (Knochenbildungsaktivität)	3	
	Knochen mit osteoblastischer und/oder (evtl. dominierender?) osteoklastischer Aktivität	2	
	„Knorpel-/Faser-Callus“ (alles andere außer Knochen)	1	
	prädominante Entzündung, lockeres „Granulations- und Fasergewebe“	0	
<b>ROI Knochen/Sehne</b> <b>Knochenblock/Knochen</b> KB/K-If	Interface Qualität		
	direkter Kontakt Knochenblock-Knochen ohne bindegewebige Zwischenschicht	4	
	Umbaulakunen mit Osteoblasten und/oder Osteoklasten an der Oberfläche	3	
	Lockeres Bindegewebe nicht organisiert als Kapsel	2	
	Fibröse Gewebekapsel	1	
	Entzündung	0	
<b>ROI Sehne/Implantat</b> S/D-If	Interface Qualität		
	direkter Kontakt Sehne-Implantat ohne bindegewebige Zwischenschicht	4	
	Umbaulakunen mit Osteoblasten und/oder Osteoklasten an der Oberfläche	3	
	Lockeres Bindegewebe nicht organisiert als Kapsel	2	
	Fibröse Gewebekapsel	1	
	Entzündung	0	
<b>ROI Sehne/Implantat</b> <b>Knochenblock/Implantat</b> KB/D-If	Interface Qualität		
	knöcherner Umbau im Grenzbereich	4	
	direkter Kontakt Knochenblock-Implantat ohne bindegewebige Zwischenschicht	3	
	Bindegewebige Zwischenschicht	2	
	Lockeres Bindegewebe , zellreich, Makrophagen	1	
	Entzündung	0	

**Anhang I: Der ROI-spezifische Histologie-Score für die histologische Auswertung der im Bohrkanal platzierten Transplantat- und Implantatanteile**

Score-Punkt	Antwort	Score-Wert					
Zelluläre Morphologie und Organisation	Normal ( hauptsächlich Fibrozyten, wenige Fibroblasten)	3					
	leicht verändert ( erhöhte Anzahl von Fibroblasten, vereinzelte Histiozyten – Mastzellen - Plasmazellen, oder diverse Granulozyten, Lymphozyten )	2					
	moderat verändert ( zahlreiche Fibroblasten, vereinzelt Makrophagen/Riesenzellen, vereinzelt Gefäßlumina)	1					
	stark verändert hyperzellulär, hypervaskulär (zahlreiche aktive Fibroblasten, Makrophagen; Entzündungszellen, zahlreiche Gefäßlumina)	0					
Zellzahl	Fibroblasten	Fibrozyten					
Vitalität (Nekroseareale)	0 Teilquadrate sind zellfrei	100 %					
	1-9 Teilquadrate sind zellfrei	90 %					
	10-19 Teilquadrate sind zellfrei	80 %					
	20-29 Teilquadrate sind zellfrei	70 %					
	30-39 Teilquadrate sind zellfrei	60 %					
	40-49 Teilquadrate sind zellfrei	50 %					
	50-59 Teilquadrate sind zellfrei	40 %					
	60-69 Teilquadrate sind zellfrei	30 %					
	70-79 Teilquadrate sind zellfrei	20 %					
	80-89 Teilquadrate sind zellfrei	10 %					
90-100 Teilquadrate sind zellfrei	0 %						
Transplantat-Umbauprozess (Gesamtbeurteilung) nur ankreuzen	Umbau nicht erkennbar						
	initiale Phase (Nekrose/Degradation)						
	Revitalisierungsphase (Reparation und Proliferation)						
	Remodellingphase						

**Anhang II:** Band-Score zur histologischen Auswertung des intraartikulär gelegenen Transplantatanteils

Osteoblasten	Osteozyten	Osteoklasten/Makrophagen/Riesenzellen/OB-Vorläuferzellen	Fibrozyten	Fibroblasten	Chondrozyten/Chondroblasten	Plasmazellen, Rundzellen	sonstige Zellen

**Anhang III:** Zell-Score die Zellzahlquantifizierung innerhalb der jeweiligen auszuwertenden ROI (ROI Knochen/Implantat, ROI Knochen/Sehne oder ROI Sehne/Implantat)

## **8 Thesen**

1. Es ist möglich, eine Bandplastik unabhängig vom Vorhandensein eines Knochenblockes mittels eines mikroporösen  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Passzylinders mit interkonnektierenden Poren gelenknah „press fit“ zu fixieren.
2. Die verwendeten Sehnen transplantate durchlaufen ein initiales Nekroestadium, gefolgt von Revitalisierung und Remodelling.
3. In den ersten 12 postoperativen Wochen passt sich das Patellasehnen transplantat schneller an die mechanischen Anforderungen an.
4. Bezüglich der Eigenschaften nach sechs Monaten zwischen einem mit Knochenblock versehenen Patellasehnen transplantat und einem synovialisierten Flexorsehnen transplantat sind keine Unterschiede nachweisbar.
5. Die Zellmorphologie der intraartikulären Anteile von Flexor- und Patellasehnen transplantat entspricht nach 24 Wochen nicht der einer nativen Sehne. Das Remodelling ist nach 24 Wochen nicht abgeschlossen.
6. 6 Wochen post operationem ist der Knochenblock der Patellasehnen transplantat ossär integriert.
7. Die „press fit“-Fixierung mittels eines mikroporösen  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Formkörpers bewirkt unabhängig vom Vorhandensein eines Knochenblockes eine primäre knöcherne Einheilung der Bandplastik auf Gelenkniveau.
8. Innerhalb der Bohrkanals laufen die primär knöcherne Einheilung und die sekundäre Einheilung über die Bildung von Sharpey-Fasern sowohl bei Patellasehnen- als auch bei Flexorsehnen transplantat simultan ab.
9. Für die primäre Einheilung ist ein direkter Kontakt zwischen Transplantat und Knochen erforderlich.
10. Für die primäre Einheilung ist ein dichtes Anliegen des Sehnen transplantates am Wirtsknochen erforderlich.
11. Innerhalb des Bohrkanals ist nach 24 Wochen kein sehnencharakteristisches straffes Bindegewebe zu finden. Die für die mechanische Stabilität verantwortliche Verankerung der Sehnen transplantate erfolgt gelenknah.

12. Ein mikroporöser  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Formkörper mit der Porengröße 5  $\mu\text{m}$  wird langsam über die Werkstoffoberfläche resorbiert und zeitnah knöchern ersetzt.
13. Über den gesamten Versuchszeitraum findet sich eine konstante Anzahl an Riesenzellen vom Osteoklastentyp auf der Implantatoberfläche. Die Resorption des interkonnektierenden, mikroporösen  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Formkörpers ist nach 24 Wochen noch nicht abgeschlossen.
14. Ein interkonnektierender, mikroporöser  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Formkörper eignet sich als Knochenersatzwerkstoff.
15. Mikroporöses  $\beta$ -Tricalciumphosphat hat osteokonduktive Eigenschaften.

## **Lebenslauf**

### **PERSÖNLICHE INFORMATION**

---

Name: Franz Otto Fraedrich  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum: 02.03.1980  
Geburtsort: Halle/Saale  
Familienstand: verheiratet, 1 Tochter (Birte Dorothea Fraedrich)  
Konfession: evangelisch

### **SCHULISCHER WERDEGANG**

---

1986-1989 Polytechnische Oberschule „Krupskaja“, Halle/Saale  
1989-1990 Grundschule Hachenburg/Altstadt  
1990 Grundschule Eicklingen  
1990-1991 Orientierungsstufe Wathlingen  
1991-1999 Gymnasium Ernestinum, Celle  
1999 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

### **WEHRDIENST**

---

07/99 - 04/00 Grundwehrdienst im Sanitätsdienst des 3.Instandsetzungsbataillons in  
Celle-Scheuen und des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg

### **STUDIUM**

---

10/2001 – 06/09 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle –  
Wittenberg

### **PRAKTISCHES JAHR**

---

08/2007 - 07/2008 Praktisches Jahr am Klinikum Martha-Maria Halle-Dölau gGmbH:  
08/2007 - 12/2007 1. Tertial: Klinik für Unfall-, Wiederherstellungs- und  
Handchirurgie (Dr. med. L. Lindemann-Sperfeld)  
12/2007 - 03/2008 2. Tertial: Klinik für Orthopädie I (Dr. med. G. Brauer)  
03/2008 - 07/2008 3. Tertial: Klinik für Innere Medizin I, Abteilung für  
Kardiologie (Prof. Dr. med. H.-J. Busse)

### **AKTUELLE ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT**

---

seit 08/09 Assistenzarzt an der Klinik für Orthopädie, Unfall- und  
Wiederherstellungschirurgie des St.-Elisabeth-Klinikums Ibbenbüren  
(Chefarzt: Dr. med. T. Köhler)

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Franz Fraedrich, dass ich die vorliegende Arbeit „Ossäres und intra-artikuläres Heilverhalten zweier verschiedener mittels  $\beta$ -TCP „press fit“ fixierter Kreuzbandplastiken in einer Schafstudie“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkte oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Privatdozentin Dr. rer. nat., rer. medic. habil. A. Bernstein

Privatdozent Dr. med. H. O. Mayr

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ibbenbüren, den 02.03.2010

Franz Fraedrich

**Erklärung über vorausgegangene Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Franz Fraedrich, dass die vorliegende Arbeit „Ossäres und intraartikuläres Heilverhalten zweier verschiedener mittels  $\beta$ -TCP „press fit“ fixierter Kreuzbandplastiken in einer Schafstudie“ zur Erlangung des akademischen Doktorgrades „Doktor der Medizin“ (Dr. med.) erstmalig von mir eingereicht wird.

Es ist mein erster Promotionsversuch und es liegen keine weiteren Dissertationsarbeiten von mir an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder an anderen nationalen oder internationalen Universitäten zur Begutachtung vor.

Ibbenbüren, den 02.03.2010

Franz Fraedrich

### **Hinweis auf bereits erfolgte Publikationen**

In folgenden Artikeln wurden Ergebnisse dieser Arbeit bereits veröffentlicht:

- 1) Mayr HO, Bernstein A, Dietrich M, Fraedrich F, Hein W: Pure Beta TCP for press fit fixation of the ACL-graft - biomechanical results of a sheep trial. In: Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 92. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie und 47. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie. Berlin, 02.-06.10.2006. Düsseldorf, Köln: German Medical Science; 2006
- 2) Mayr HO: Mikroporöse Formkörper aus phasenreinem beta-Tricalciumphosphat zur Fixierung der vorderen Kreuzbandplastik und als Knochenersatz - biomechanische, radiologische und histologische Untersuchungen zur Erforschung der Stabilität und des Einheilverhaltens. Habilitation, Universität Halle, 2007
- 3) Mayr HO, Hube R, Bernstein A, Seibt AB, Hein W, von Eisenhart-Rothe R: Beta-tricalcium phosphate plugs for press-fit fixation in ACL reconstruction – A mechanical analysis in bovine bone. *The Knee* 14 (2007) 239-244
- 4) Mayr HO, Dietrich M, Fraedrich F, Hube R, Nerlich A, von Eisenhart-Rothe R, Hein W, Bernstein B: Microporous Pure  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Implants for Press-Fit Fixation of Anterior Cruciate Ligament Grafts: Strength and Healing in a Sheep Model. *Arthroscopy* 25 [9] (2009) 996-1005.

## **Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Hein danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas an der von ihm geführten Klinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Universität Halle-Wittenberg sowie für die Bereitstellung der notwendigen Technik und Arbeitsmöglichkeiten.

Besonders möchte ich mich besonders bei meinen Betreuern bedanken: zum einen bei Frau PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. A. Bernstein für die freundliche und kompetente Unterstützung während der histologischen Auswertungen (Danke, Danke!!!) und zum anderen bei Herrn PD Dr. med. H. Mayr für sein Vertrauen bezüglich der Mitarbeit an seiner Habilitationsstudie sowie seiner Beratung bezüglich der schriftlichen Ausarbeitung.

Nicht zu vergessen ist mein getreuer Kommilitone M. Dietrich. Es war mir eine Freude mit ihm an dieser Studie zu arbeiten (ich danke ihm für die Hilfe am Diamantsägeband).

Dr. med. vet. G. Woitow und H. Trapp danke ich für die kompetente veterinärmedizinische und tierpflegerische Unterstützung während des Versuchszeitraumes.

Cornelia Vetter und Angela Rosemeier danke ich für die unermüdliche Hilfe bei der Herstellung der Präparate und die angenehme freundlich-menschliche Zeit innerhalb des Histologie-Labors.

Für ihre kompetente und erfolgreiche Beratung in Sachen Statistik und bezüglich der Bedienung eines SPSS-Programmes möchte ich meiner Tante Heike meinen Dank aussprechen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinem Onkel Dirk für wertvolle Tipps und Ratschläge für die schriftliche Ausarbeitung dieser Arbeit und für die langen, geduldvoll ertragenen Telefonate.

Meiner Dörte danke ich für ihr Verständnis und ihre Geduld sowie meinem Schwiegervater Bernd für seine Hilfe meine schriftlichen Ausarbeitungen in eine geordnete, verständliche und germanistisch korrekte Fassung zu verwandeln.

Abschließend möchte ich noch ein persönliches Dankeschön an meine Eltern richten. Ohne die jahrelange Unterstützung meiner Eltern wäre ich niemals in der Lage gewesen, eine Dissertation anzufertigen bzw. meinen beruflichen Wünschen und Zielen nachgehen zu können. Danke für Euer Vertrauen, Euer Verständnis, Eure Geduld und dafür, dass Ihr mich niemals in jedweder Art unter Druck gesetzt habt.