

---

**Habilitationsschrift**

**Der Einfluss allogenen Spendergewebes und  
deren Sterilisationsverfahren auf die biologischen Umbauprozesse  
und biomechanischen Eigenschaften von Ersatzplastiken  
des vorderen Kreuzbandes**

zur Erlangung der Lehrfähigkeit für das Fach  
Orthopädie und Unfallchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr.med. Sven Scheffler  
Geboren am 23.01.1973  
in Berlin**

Eingereicht: Dezember 2009

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. C. Wirtz.....
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. A. Meurer .....

Datum der öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 14.06.2010

## Inhaltsverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Einleitung .....  | 1  |
| 1.1   | Therapieoptionen in der Behandlung der vorderen Kreuzbandläsion .....   | 1  |
| 1.1.1 | Konservativ.....  | 1  |
| 1.1.2 | Operativ .....  | 2  |
| 1.2   | Einflussfaktoren des vorderen Kreuzbandersatzes .....   | 2  |
| 1.2.1 | Transplantatwahl .....  | 3  |
| 1.2.2 | Verankerungsverfahren .....   | 5  |
| 1.2.3 | Um- & Einbauverhalten .....   | 6  |
| 1.3   | Humanes Spendergewebe (Allograft) in der vorderen Kreuzbandchirurgie .....  | 9  |
| 1.3.1 | Aktuelle Bedeutung humaner Allografts in der Kreuzbandchirurgie .....   | 9  |
| 1.3.2 | Allogene Transplantate.....   | 10 |
| 1.3.3 | Konservierungsverfahren .....   | 10 |
| 1.3.4 | Rechtliche Bestimmungen in der Handhabung allogenen Gewebes .....   | 12 |
| 1.3.5 | Sterilisationsverfahren .....   | 14 |
| 1.4   | Wissenschaftliche Fragestellung.....  | 17 |
| 2     | Experimentelle Untersuchungen .....   | 19 |
| 2.1   | Vergleich des autologen und allogenen vorderen Kreuzbandersatzes mit knochenblockfreiem Sehnen­transplantat im in-vivo Tiermodell .....         | 19 |
| 2.1.1 | Biologische Umbauprozesse des intraartikulären Transplantates .....   | 19 |
| 2.1.2 | Ossäre Integration des extraartikulären Transplantates.....   | 21 |
| 2.1.3 | Wiederherstellung der biomechanischen Funktion .....  | 23 |
| 2.2   | Einfluss von Sterilisationsverfahren auf die Biologie und Biomechanik von allogenen Sehnen­transplantaten für den vorderen Kreuzbandersatz..... | 24 |
| 2.2.1 | Peressigsäure-Ethanol Verfahren.....  | 24 |
| 2.2.2 | Electron-Beam Verfahren.....  | 27 |
| 3     | Diskussion.....   | 32 |
| 3.1   | Untersuchung nicht-sterilisierter Allografts .....  | 32 |
| 3.2   | Untersuchung der Sterilisationsverfahren.....   | 33 |
| 3.3   | Klinische Relevanz .....  | 37 |
| 3.4   | Schlussfolgerung .....  | 39 |
| 4     | Zusammenfassung.....  | 41 |
| 5     | Literaturverzeichnis .....  | 43 |

## 1 Einleitung

Die Verletzung des vorderen Kreuzbandes (VKB) stellt die häufigste ligamentäre Läsion des Kniegelenkes dar<sup>32</sup>. Geschätzte Vermutungen nehmen eine Inzidenz der Kreuzbandruptur von 1:3500 Personen in der Allgemeinbevölkerung an<sup>7, 50</sup>. Da durch die Verletzung des VKB die Funktion des Kniegelenkes deutlich beeinträchtigt wird, ergeben sich hieraus erhebliche Konsequenzen für das private und berufliche Leben betroffener Patientinnen und Patienten. Zusätzlich führt die Verletzung bzw. seine Versorgung zu einer, wenn auch zeitlich begrenzten, Arbeitsunfähigkeit, die erhebliche Kosten für die Gesundheitssysteme bedingt. Dadurch erklären sich die fortwährenden Bemühungen, bestehende Behandlungsstrategien der Verletzung des VKB zu verbessern, um möglichst umgehend und unter effizienter Nutzung der zur Verfügung stehenden Ressourcen eine komplette Funktionswiederherstellung des Kniegelenkes erreichen zu können.

### 1.1 Therapieoptionen in der Behandlung der vorderen Kreuzbandläsion

Aufgrund einer Ruptur des vorderen Kreuzbandes ergibt sich eine nach anterior gerichtete vermehrte Auslenkung des Unterschenkels gegenüber dem Oberschenkel, sowie eine erhöhte Innenrotation<sup>58</sup>. Diese Instabilität führt zu einer verminderten Belastbarkeit des Kniegelenkes und ist mit einer deutlich erhöhten Inzidenz von sekundären Gelenkschäden, vor allem der Menisken und des Knorpels, verbunden<sup>9</sup>. Durch eine konservative Behandlung kann eine Wiederherstellung der vollständigen Integrität und originären in-situ Spannung des VKB nicht erreicht werden<sup>43</sup>. Dies erklärt die zunehmende Erweiterung des Indikationsspektrums der operativen Therapie der VKB-Ruptur, so dass die konservative Behandlung immer mehr in den Hintergrund tritt.

#### 1.1.1 Konservativ

Obwohl die konservative Therapie der vorderen Kreuzbandläsion aufgrund der unvollständigen Wiederherstellung der Gelenkstabilität immer weniger Beachtung findet, konnten Langzeituntersuchungen zeigen, dass dem Kreuzbandersatz vergleichbare klinische Ergebnisse erreicht werden können, wenn die

Belastungssituation des Kniegelenkes angepasst wird<sup>43 38</sup>. Im Vordergrund der konservativen Therapie der vorderen Kreuzbandläsion stehen initial die schmerzlindernden und die Gelenkfunktion wiederherstellenden Therapien, die dann durch muskelaufbauende Maßnahmen sowie durch das gezielte Erlernen von Bewegungsabläufen, die protektiv das Gelenk vor exzessiven Auslenkungen bewahren sollen, ergänzt werden.

### **1.1.2 Operativ**

In Deutschland werden aktuell ca. 50.000 Ersatzplastiken des VKB, in den USA ca. 100.000<sup>50</sup> jährlich durchgeführt<sup>21</sup>. Aufgrund der zunehmenden Erweiterung des Indikationsspektrums, vor allem im Hinblick auf die VKB Verletzung des sich noch im Wachstum befindlichen und des auch im fortgeschrittenen Alter (> 50 Jahre) körperlich aktiven Patienten, ist es in den vergangenen Jahren zu einer kontinuierlichen Zunahme der operativen Behandlung gekommen. Der primäre Vorteil der Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes ist die langfristige Wiederherstellung der Gelenkstabilität, welches in Langzeitstudien gezeigt werden konnte<sup>43</sup>. Hierdurch kann eine deutliche Senkung von Sekundärschäden erreicht werden<sup>22, 34, 75</sup>. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass die Entwicklung arthrotischer Gelenkveränderungen durch eine Stabilisierung des Gelenkes zumindest verzögert wird, obwohl es nur eine begrenzte Anzahl prospektiver Studien gibt, die den Langzeitverlauf operativ und konservativ behandelter Patienten mit VKB Ruptur verglichen haben. Eine langfristige Reduktion des Arthroserisikos auf das der kreuzbandgesunden Normalbevölkerung konnte mit den bisherigen Techniken der Kreuzbandrekonstruktion nicht erreicht werden<sup>34</sup>.

## **1.2 Einflussfaktoren des vorderen Kreuzbandersatzes**

Verschiedene Faktoren nehmen direkten Einfluss auf das klinische Ergebnis der vorderen Kreuzbandrekonstruktion und beeinflussen dadurch den Zeitraum bis zur Wiederherstellung der Funktion des Kniegelenkes.

### 1.2.1 Transplantatwahl

Die Wahl des optimalen Transplantates zur Rekonstruktion des VKB war und ist Anlass ausgedehnter Diskussionen und beschäftigt die Fachleute und Fachgesellschaften seit Jahrzehnten.

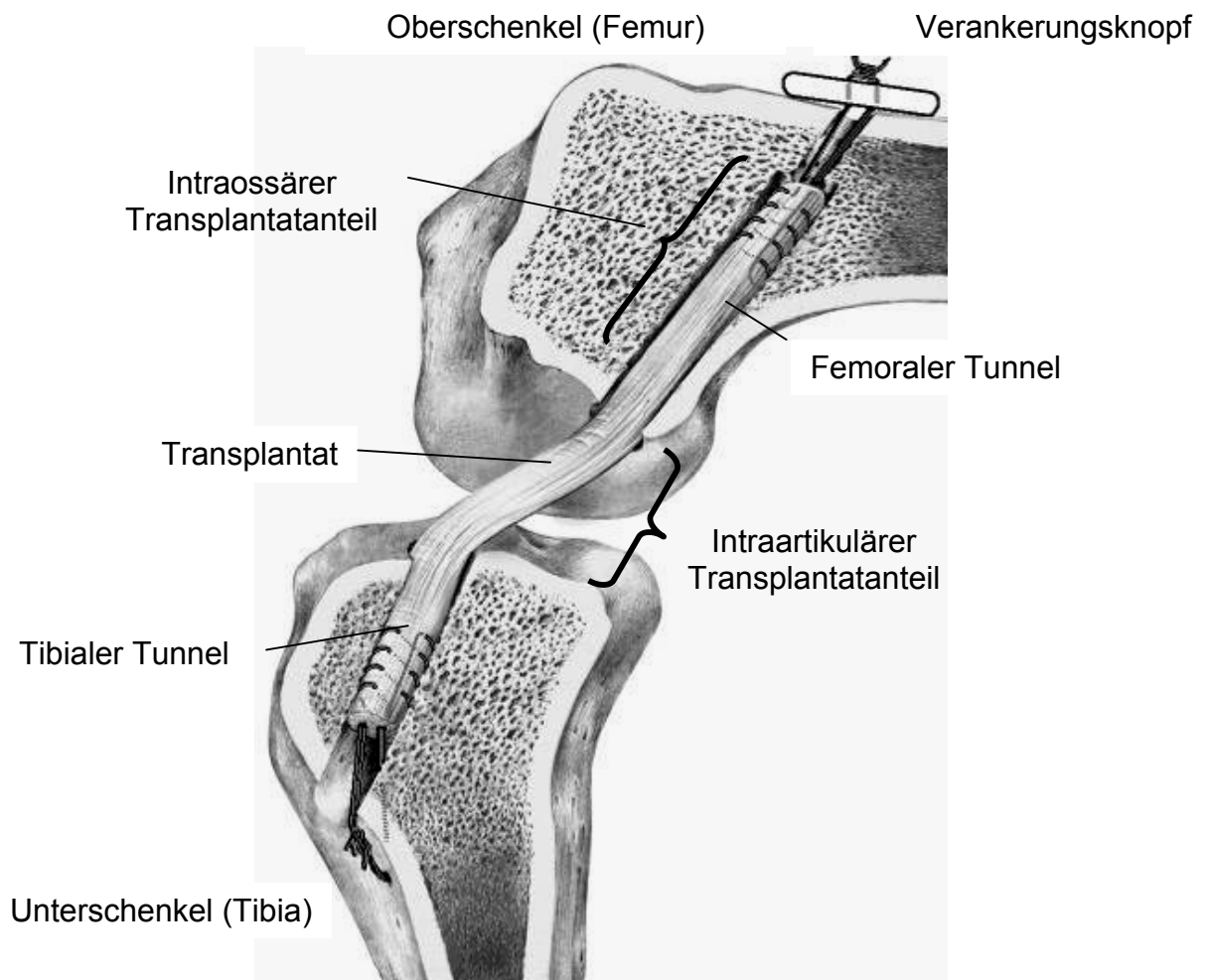
#### Autolog vs. Allogen

Prinzipiell kann unterschieden werden zwischen körpereigenen (autologen, Syn: autogen bzw. homolog) und körperfremden (allogenen) humanen Weichteiltransplantaten. Traditionell finden primär körpereigene Sehnen-Transplantate Verwendung, da die Bereitstellung von Spendergewebe eine aufwendige Infrastruktur und Logistik erfordert, die die Verfügbarkeit limitiert und mit initialen Mehrkosten verbunden ist. Jedoch ist es in den zurückliegenden Jahren zu einem sprunghaften Anstieg des Einsatzes von allogenen Transplantaten in der Kreuzbandchirurgie gekommen<sup>80</sup>. Als Hauptgrund wird hierbei die Vermeidung der Entnahmemorbidität körpereigenen Gewebes angeführt, die für sämtliche Transplantate beschrieben ist<sup>33</sup> und zu einer Verzögerung der postoperativen Rehabilitation führen kann. Da zusätzlich gezeigt werden konnte, dass OP-Zeit und Klinikaufenthalt durch den Wegfall der Sehnenentnahme und des entsprechenden Entnahmeschmerzes verkürzt werden<sup>6</sup>, resultiert eine Kostensenkung für die Rekonstruktion des VKB mit allogenen im Vergleich zum autologen Sehnen-Transplantat<sup>6</sup>. Folgend werden weitere Unterschiede zwischen autologer und allogener VKB Rekonstruktion beschrieben, die identifiziert werden konnten, ohne dass deren endgültige Relevanz für den Menschen geklärt werden konnte.

Tierexperimentelle Untersuchungen der VKB Rekonstruktion mit allogenen Knochen-Sehnen-Transplantaten (Patellarsehne) konstatierten eine Verzögerung der biologischen Umbauprozesse und eine Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften innerhalb der ersten 6 Monate im Vergleich zur autologen Sehne<sup>31, 35</sup>. Inzwischen finden jedoch überwiegend freie Sehnen-Transplantate, als autologes oder allogenes Transplantat, Verwendung in der Kreuzbandchirurgie (Abbildung 1: Kreuzbandersatztechnik). Diese unterscheiden sich durch eine direkte Verankerung des Sehnen-Transplantats ohne adherierenden Knochenblock im tibialen bzw. femoralen Knochen (Abb. 1). Hierdurch entwickelt sich eine Sehnen-Knochen-Einheilung, deren zeitlicher Ablauf sich von der Knochen-Knochen Einheilung von Knochen-Sehnen-Transplantaten (Patellar-, Quadrizepssehne)<sup>77, 86</sup> unterscheidet

und direkten Einfluss auf die biologischen Umbauprozesse des intraartikulären Transplantatanteils nimmt<sup>77</sup>.

Vergleichende Untersuchungen von knochenblockfreien Allografts und Autografts existieren jedoch bis zu dem heutigen Zeitpunkt nicht, so dass unklar ist, ob die ossäre Einheilung und die intraartikulären Umbauprozesse von allogenen freien Sehnen transplantaten eine ähnliche Verzögerung aufweisen, wie sie für Knochen-Sehnen Allografts im Tiermodell gezeigt werden konnten.



**Abbildung 1:** Schematische Übersicht einer Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes

## 1.2.2 Verankerungsverfahren

Es existiert eine Vielzahl an Techniken zur Verankerung der Kreuzbandtransplantate. Diese Techniken unterscheiden sich vor allem durch die Lokalisation der Transplantatverankerung (gelenknah – gelenkfern), bzw. ob eine reine Weichteil- (der freien Sehnen transplantate) oder eine Knochen-Knochen Verankerung (Knochen-Sehnen Transplantate) vorliegt. Der Einfluss dieser Faktoren wurde durch unsere Arbeitsgruppe in einer in-vitro Studie biomechanisch untersucht<sup>63</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass eine gelenknahe Verankerung von freien Sehnen transplantaten biomechanische Vorteile bot, diese jedoch der direkten Knochen-Knochen Verankerung des Patellarsehnen transplantates unterlegen war.

**Scheffler SU, Südkamp NP, Göckenjan A, Hoffmann RFG, Weiler A:** The impact of fixation level and fixation method on anterior cruciate ligament reconstructions: a biomechanical comparison of four hamstring and one patellar tendon graft reconstruction techniques, *Arthroscopy*, 2002 Mar;18(3):304-315

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11877619>

Jedoch hat sich bis zum heutigen Zeitpunkt die ursprüngliche Annahme, dass ein bestimmtes Verankerungsverfahren zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Langzeitergebnisses nach VKB Rekonstruktion führen könnte, in klinischen Studien nicht bestätigt. Auch bei Anwendung mechanisch unterlegener Verankerungsverfahren des freien Sehnen transplantates konnte eine langfristige Stabilität des Kniegelenkes erreicht werden, die den gelenknahen Verankerungstechniken bzw. den Knochen-Sehnen Transplantaten entsprach<sup>5 26</sup>. Entscheidendere Bedeutungen für den klinisch erfolgreichen VKB Ersatz scheinen die Wiederherstellung der exakten Anatomie, im Speziellen der Insertionspunkte, und des nicht-isometrischen Dehnungsverhaltens des VKB zu sein. Des Weiteren kommt der optimalen Anpassung der Nachbehandlung an die verschiedenen Phasen des Transplantatum- und -einbaus (siehe Kapitel 1.2.3) eine entscheidende Bedeutung zu<sup>65, 88</sup>.



### 1.2.3 Um- & Einbauverhalten

Im Rahmen der autologen Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes wird ein Weichteiltransplantat aus seiner ursprünglichen anatomischen Umgebung entfernt und im Kniegelenk derart positioniert, dass ein Teil des Transplantates die jeweiligen Insertionspunkte des ursprünglichen VKB femoral und tibial intraartikulär verbindet (intraartikuläres Transplantat, Abb.1). Gleichzeitig kommt proximal und distal des Gelenkes das Transplantat intraossär zu liegen (Abb.1), um suffizient in bzw. an den ossären Tunneln des Femur und der Tibia verankert werden zu können.

Während initial die mechanische Festigkeit des VKB Ersatzes primär durch seine Verankerungsobjekte, wie z.B. Schrauben, Krampen oder Faden-Knopf-Verbindungen, bestimmt wird, kommt es im weiteren Verlauf zu einem sukzessiven biologischen Umbau des Transplantates, der idealerweise direkt im Bereich der originären Insertionspunkte des VKB zur Ausbildung einer direkten Neoinsertion führt und eine langfristige Bandstabilität erlaubt. Im Rahmen dieser biologischen Einheilung müssen zwei grundlegende Prozesse unterschieden werden: zum einen die Umbauvorgänge des intraartikulären Anteils des Transplantates und zum anderen die Einbauvorgänge der intraossären Transplantatareale (Abb.1). Die verschiedenen Um- und Einbauvorgänge der autologen Ersatzplastiken des VKB sind detailliert untersucht worden <sup>65</sup>.

**Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A:** Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction: Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2008 Sep; 16(9):834-42. Epub 2008 May 31

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516592>

Zusammenfassend lassen sich 3 Phasen des intraartikulären Umbaus unterscheiden: 1.) Eine frühe Umbauphase der ersten 4 Wochen. Hier kommt es aufgrund der eingeschränkten vaskulären Versorgung zu zunehmenden Abbauprozessen der Transplantatsubstanz, sichtbar durch Abnahme der Zellzahl und Zunahme von nekrotischen Arealen. Als Folge dieser Prozesse kommt es zu einer Schwächung der mechanischen Eigenschaften des Transplantates. Hieran schließt sich 2.) eine sogenannte Proliferationsphase an, die ca. bis zum 3. postoperativen Monat anhält und charakterisiert ist durch ausgedehnte zelluläre und

extrazelluläre Umbau- und Reparationsvorgänge. In dieser Phase ist die mechanische Schwächung des Transplantates am ausgeprägtesten. Schließlich folgt 3.) die Ligamentisierungsphase. Diese zeichnet sich durch eine Konsolidierung und Reorganisation des Transplantates aus, wobei eine Entwicklung hin zu den biologischen Eigenschaften des nativen vorderen Kreuzbandes zu beobachten ist. Dies geht mit einer deutlichen Erholung der biomechanischen Eigenschaften einher. Gleichzeitig zeigt sich eine Reifung der neu ausgebildeten direkten biologischen Transplantatverankerung. Die Dauer dieser Phase ist unklar. In verschiedenen Tiermodellen konnte ein Endpunkt nach einem Jahr beobachtet werden<sup>84</sup>, während beim Menschen davon ausgegangen wird, dass diese Phase auch noch Jahre nach der Operation anhält<sup>59, 40</sup>. Die postoperative Rehabilitation muss diese Phasen des biologischen Umbaus und die damit einhergehende Beeinträchtigung der Transplantatstabilität berücksichtigen, um die Wiederherstellung der Gelenkfunktion nicht zu gefährden.

Ob die an Tierstudien gewonnenen Einheilungsprozesse auf den Menschen übertragbar sind, ist umstritten, da nur eine sehr geringe Anzahl von Patientenstudien vorliegt<sup>13, 40, 59</sup>, die Biopsien von Kreuzbandplastiken bei Sekundäreingriffen entnehmen und analysieren konnten. Erschwerend kommt hinzu, dass die Biopsatgewinnung fast ausschließlich zu Zeitpunkten nach 6 Monaten und später erfolgte, so dass das heutige Wissen in Bezug auf die frühen Umbauprozesse der ersten 3 Monate und von Allografts im Allgemeinen auf in-vivo Tierstudien basiert<sup>31, 35, 69, 70, 81</sup>. In diesen Studien zeigte sich eine zeitliche Verzögerung der Umbauprozesse von allogenen VKB Transplantaten<sup>31, 35, 69, 70, 81</sup>. Sämtliche Studien verwendeten die Patellarsehne mit adherierenden Knochenblöcken. In-vivo Tierstudien, in denen die Umbauprozesse von freien allogenen Sehnentransplantaten als VKB Ersatz untersucht wurden, liegen in der aktuellen Literatur nicht vor. Die Kenntnis einer möglichen Verzögerung der Umbauprozesse und damit auch zeitlichen Varianz der Phasen maximal eingeschränkter mechanischer Stabilität sind von höchster Bedeutung für den Kliniker und Physiotherapeuten, da die Nachbehandlungsprotokolle in diesem Fall nicht direkt vom autologen VKB Ersatz übernommen werden sollten, sondern entsprechend dem Transplantattyp angepasst werden müssten.

Die knöcherne Einheilung des Transplantates hat eine den intraartikulären Umbauprozessen entsprechende Bedeutung. Es konnte am Tiermodell gezeigt

werden, dass die Einheilung autologer Knochen-Sehnen Transplantate zeitlich schneller (wenige Wochen) voranschreitet als die der freien Sehnentransplantate <sup>37</sup>. Es existieren jedoch aktuell keine Untersuchungen, die das knöcherne Einheilungsverhalten von allogenen Transplantaten in der VKB Chirurgie analysiert oder direkt mit dem autologen VKB Ersatz verglichen haben. Daher ist es nicht bekannt, ob analog der Ergebnisse der intraartikulären Umbauprozesse ebenfalls eine Verzögerung der Transplantateinheilung zu beobachten ist und ob dieses in der Nachbehandlung der Patienten mit allogenen VKB Ersatz berücksichtigt werden sollte.

## 1.3 Humanes Spendergewebe (Allograft) in der vorderen Kreuzbandchirurgie

### 1.3.1 Aktuelle Bedeutung humaner Allografts in der Kreuzbandchirurgie

Die Bedeutung humanen Spendergewebes in der vorderen Kreuzbandchirurgie variiert erheblich zwischen den verschiedenen Regionen der Welt. Dieses ist zum einen mit religiös / ethischen Vorbehalten (Japan), erheblichen Unterschieden in den rechtlichen Vorgaben und Restriktionen der Länder (Europa) und zum anderen mit einer deutlich höheren Spenderbereitschaft und entsprechenden Infrastruktur zur Aufarbeitung und Distribution von Spendergewebe (USA) zu erklären (siehe 1.3.4).

Vor allem im anglo-amerikanischen Raum ist es zu einem sprunghaften Anstieg der Nutzung von muskuloskeletalen Allografts gekommen. Zwischen 1990 und 2001 konnte ein Anstieg von 350.000 auf 875.000 operativ verwendeten Allografts beobachtet werden <sup>23</sup>, während 2006 durch die Amerikanische Vereinigung der Gewebebanken (American Association of Tissue Banks, AATB) der Einsatz von 1.5 Millionen muskuloskeletalen Allografts in den USA registriert wurde <sup>49</sup>. Ca. 10% dieser Allografts sind Weichteilgewebe, die im Bereich der Kreuzbandchirurgie Einsatz finden <sup>73</sup>. 86% von 365 Befragten einer aktuellen Umfrage (2006) der Amerikanischen Orthopädischen Gesellschaft für Sportmedizin bejahten den Einsatz von Allografts in der Kreuzbandchirurgie <sup>42</sup>. Während Allografts schon seit vielen Jahren in der Revisionschirurgie des VKB Anwendung fanden, wurde jetzt eine deutlich zunehmende Popularität dieser Transplantate (Zuwachsraten von 30-50%) beim primären Kreuzbandersatz beobachtet <sup>80</sup>. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die postoperativen Anforderungen an einen primären Kreuzbandersatz aufgrund der aggressiveren Nachbehandlung deutlich höher als beim Revisionseingriff sind.

Im Gegensatz zum anglo-amerikanischen Raum ist die Bedeutung der Allografts in Deutschland deutlich geringer. Aktuell werden ca. 1% aller VKB Rekonstruktionen mit Allografts durchgeführt. Hauptursache hierfür sind rechtliche Beschränkungen bzw. die fehlende Existenz eines Netzwerks von Gewebebanken, die ein adäquates Spenderaufkommen organisieren, eine Infrastruktur garantieren und die kontrollierte Abgabe der Transplantate gewährleisten könnten. Eine aktuelle

Umfrage <sup>41</sup> der weltweit größten Arthroskopiegesellschaft, der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA), offenbarte, dass aktuell 14% der Kreuzbandchirurgen Allografts verwenden, jedoch 66% diese Transplantate gerne nutzen würden, wenn eine entsprechende Verfügbarkeit existieren würde.

### 1.3.2 Allogene Transplantate

In Abschnitt 1.2.1 wurde die generelle Unterscheidung zwischen Knochenblocktragenden und freien Sehnentransplantaten erwähnt. Während aufgrund der funktionellen Einschränkung nach autologer Sehnenentnahme nur eine begrenzte Anzahl an Sehnen verwendet werden können, existieren diese Einschränkungen bei Spendersehnen, die in der Regel im Rahmen von Multiorgantransplantationen entnommen werden, nicht. Daher ist eine größere Anzahl an Transplantatalternativen als in der autologen Kreuzbandchirurgie verfügbar. Tabelle 1 listet die aktuell Verwendung findenden Transplantate auf.

Tabelle 1: Allogene Transplantate in der VKB Chirurgie

| <i>Freie Sehnentransplantate</i> | <i>Knochenblock-tragende Transplantate</i> |
|----------------------------------|--|
| Semitendinosussehne              | Patellarsehne                              |
| Gracilissehne                    | Quadrizepssehne                            |
| Tibialis anterior Sehne          | Achillessehne                              |
| Tibialis posterior Sehne         |  |
| Faszia lata                      |  |

In der Gruppe der Spendersehnen (Allografts) werden die Transplantate sowohl nach Art der Konservierung (siehe Abschnitt 1.3.3) als auch nach Existenz bzw. Typ der Sterilisation unterschieden (siehe Abschnitt 1.3.5), welche deutliche Unterschiede in ihrem Einfluss auf die biologischen und mechanischen Eigenschaften des entsprechend behandelten Gewebes aufweisen können.

### 1.3.3 Konservierungsverfahren

Da in der Regel ein Zeitraum von mindestens 3-4 Wochen zwischen Sehnenentnahme und Transplantation vergeht, während dessen die serologische und mikrobiologische Aufarbeitung von Spenderserum und -gewebe zum

Ausschluss viraler und bakterieller Infektionen bzw. zum Nachweis der Sterilität erfolgt, ist eine Konservierung des zu transplantierenden Gewebes essentiell. In Tabelle 2 sind die verschiedenen Verfahren der Gewebekonservierung aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der Verfahren zur Konservierung humanen Sehngewebes

| <i>Verfahren</i>   | <i>Eigenschaften</i>   |
|--------------------|--|
| Frisch-gefroren    | unter -40°C, keine Sterilisation, Erhalt von Zellvitalität & Biomechanik                           |
| Tief-gefroren      | unter -40°C, in der regel sterilisiert bzw. desinfiziert, Immunogenität , Zellviabilität reduziert |
| Kryokonserviert    | <-135°C im flüssigen Stickstoff, geringe Zellvitalität & Biomechanik                               |
| Gefrier-getrocknet | Restfeuchte 1-6%, Raumtemperatur, Biomechanik ↓  |

Das Einfrieren des Spendergewebes unmittelbar nach steriler Entnahme bei -40°C ohne Zusatz von konservierenden Agenzien bzw. Anwendung von Sterilisationsverfahren wird als „frisch-gefroren“ bezeichnet und stellt das am häufigsten verwendete Verfahren dar. Vorteile hierbei sind der Erhalt der biomechanischen Funktion des Gewebes, der zumindest partielle Erhalt von Zellviabilität, die Möglichkeit der Konservierung bis zu 2 Jahren und das unproblematische zügige Auftauen direkt vor Verwendung<sup>68, 79</sup>. Zusätzlich kann das Gewebe auf unter -70 C gefroren werden („tief-gefroren“), was den Vorteil der Reduktion der Immunogenität und eine längere Konservierung des Gewebes (bis zu 5 Jahre) erlaubt, jedoch gleichzeitig eine deutliche Reduktion der Zellviabilität bedingt<sup>78</sup>. Tiefgefrorene Gewebe werden zumeist zusätzlich einem Sterilisationsverfahren unterzogen.

Bei der Kryokonservierung wird das Spendergewebe sukzessive unter Zugabe von Glycerol und/oder Dimethylsulfoxid (DMSO) auf -135°C heruntergefroren. Diese Methode hat den Vorteil des Erhalts eines Großteil der Zellviabilität<sup>42, 68, 79</sup>, erfordert aber einen deutlich höheren technischen Aufwand und ist dadurch kostenintensiver. Das Gewebe kann bis zu 10 Jahre und länger konserviert werden<sup>3</sup>.

Die Gefriertrocknung von Spendergewebe führt zum fast kompletten Entzug der Gewebeflüssigkeit, so dass letztendlich das Gewebe bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Weitere Vorteile sind die Reduktion der Immunogenität<sup>3</sup>.

Nachteil dieses Verfahrens ist die komplette Zerstörung sämtlicher vitaler Zellen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Eigenschaften derart behandelten Gewebes beeinträchtigt sind<sup>57</sup>. Daher wird dieses Verfahren heute nur noch selten in der Konservierung allogener Weichteiltransplantate der Kreuzbandchirurgie eingesetzt.

#### 1.3.4 Rechtliche Bestimmungen in der Handhabung allogenen Gewebes

In der Bundesrepublik Deutschland unterliegt die Entnahme, Zubereitung, Aufbewahrung und Transplantation von humanem Spendersehnen und –bändern, wie sie in der Kreuzbandchirurgie Anwendung finden, strengen rechtlichen Auflagen und Richtlinien<sup>29</sup>. Diese werden aktuell durch das am 01.08.2007 in Kraft getretene Gewebegesetz (TPG) definiert und haben zu der deutlich eingeschränkten Nutzung im Vergleich zum anglo-amerikanischen Raum geführt. Folgend sollen kurz die für die Nutzung von Transplantaten in der vorderen Kreuzbandchirurgie relevanten Aspekte erwähnt und deren Konsequenzen skizziert werden.

Allgemein muss das Einverständnis eines Verstorbenen bzw. die Einwilligung der nächsten Angehörigen zur Gewebespende gemäß § 3 und 4 TPG als Voraussetzung der Gewebeentnahme vorliegen. Die Spendertauglichkeit ist hierbei durch einen qualifizierten Arzt (§ 8d TPG) zu beurteilen und zu dokumentieren. Die entsprechenden Kriterien sind im Gewebegesetz, sowie den EU-Richtlinien 2004/23/EG, 2006/17/EG und 2006/86/EG festgelegt.

In der Bundesrepublik Deutschland wird humanes Spendergewebe nicht als Organ verstanden (§ 1a Nr. 4 TPG), sondern fällt unter die umfassende Definition des Stoffbegriffes (§ 3 AMG). Der Umgang, die Zubereitung und Verwendung sämtlicher Gewebe, die als Stoffe betrachtet werden, unterliegen dem deutschen Arzneimittelgesetz (AMG) und werden als Arzneimittel angesehen (§ 2 Abs. 1 AMG). Speziell die Zubereitung von menschlichen Zellen und Gewebe, wie sie in der Präparation von humanen Sehnen für den vorderen Kreuzbandersatz erfolgt, werden gemäß § 4 Abs. 30 AMG ausdrücklich als Arzneimittel bezeichnet<sup>29</sup>.

Hieraus ergeben sich folgende Konsequenzen:

- 1.) Die Gewinnung von Geweben und deren Laboruntersuchungen zum Ausschluss von Risikofaktoren (z.B. klinisch relevante Viren wie HIV, HBV, HCV) kann nur

nach Erteilung einer Erlaubnis nach § 20b AMG erfolgen, die durch die regional zuständige Landesbehörde erteilt wird. Das bedeutet, dass einer solchen Einrichtung nur dann die Erlaubnis nicht erteilt werden darf, wenn

- a. eine angemessen ausgebildete Person mit der erforderlichen Berufserfahrung nicht vorhanden ist, die, soweit es sich um eine Entnahmeeinrichtung handelt, zugleich die ärztliche Person im Sinne von § 8d Abs. 1 Satz 1 des Transplantationsgesetzes sein kann,
- b. weiteres mitwirkendes Personal nicht ausreichend qualifiziert ist,
- c. angemessene Räume für die jeweilige Gewebegewinnung oder für die Laboruntersuchungen nicht vorhanden sind oder
- d. nicht gewährleistet wird, dass die Gewebegewinnung oder die Laboruntersuchungen nach dem Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik und nach den Vorschriften der Abschnitte 2, 3 und 3a des Transplantationsgesetzes vorgenommen werden.

2.) Die weitere Zu- und Aufbereitung, Konservierung, Lagerung und in Verkehrbringung von Spendersehnen erfordert eine Herstellungserlaubnis nach § 13 AMG bzw. eine Erlaubnis nach §20c AMG, die ebenfalls durch die Landesbehörde erteilt wird. Die Voraussetzungen der Erteilung einer solchen Erlaubnis und fachlichen Anforderungen werden in §20c, Absatz 2), Nr. 1-5 definiert.

Die Definition der fachlichen Anforderungen an den Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik, und damit auch die Frage nach einer etwaigen Sterilisationspflicht, wird durch die zuständige Bundesoberbehörde, das Paul-Ehrlich Institut, festgelegt und ist in den Vorgaben zur Erteilung der Genehmigung in §4 und §21a AMG dargelegt. Hiernach wird aktuell gefordert, dass muskuloskeletales Gewebe einem Inaktivierungsverfahren (Sterilisation) zu unterziehen ist, wenn es am humanen Patienten angewendet werden soll. Wenn ein solches Inaktivierungsverfahren keine Anwendung finden kann (z.B. weil relevante verfahrensbedingte Nachteile für das Spendergewebe oder den Empfänger entstehen), kann eine Verwendung des Spendergewebes ohne Herstellungserlaubnis unter der alleinigen Verantwortung des entnehmenden und transplantierenden Arztes erfolgen (§4a, Abs. 1, Satz 3 AMG) bzw. aus dem Ausland über eine interantionale Apotheke eingeführt werden (§72 AMG). Im ersten Fall geht jedoch die komplette rechtliche Verantwortung und Haftung auf den anwendenden Arzt über (§4a, Abs. 1, Satz 3 AMG). Dieses bedeutet z.B., dass die Entnahme und Verwendung eines muskuloskeletalen Transplantates, wie z.B. einer Sehne, durch



eine physisch identische Person bzw. Arzt oder Ärztin erfolgen muss. Diese Umsetzung ist in der alltäglichen klinischen Praxis im Regelfall nicht durchführbar, so dass die Sterilisation beim allgemeinen Einsatz von Allografts in der Kreuzbandchirurgie in Deutschland gegenwärtig unvermeidbar ist.

Die Leitlinien für den Prozess der Implantation von Spendergewebe werden nicht durch Landes- oder Bundesbehörden vorgegeben, sondern werden durch die verantwortlichen Fachorganisationen, bei muskuloskeletalem Gewebe primär der Orthopädie und Unfallchirurgie, definiert.

### 1.3.5 Sterilisationsverfahren

Die Transplantation von Spendergewebe birgt das Risiko einer Übertragung von infektiösen Erkrankungen. Um ein solches Risiko minimieren zu können, existieren verschiedene Ansätze. Zum einen werden die Spender einer rigorosen Befragung nach den Lebensverhältnissen, den Umständen des Ablebens, stattgehabter Erkrankungen und des sozialen Umfeldes unterzogen, um Risikopatienten initial vom Spenderprozess ausschließen zu können. Des Weiteren wird die Entnahme von Spendergeweben unter sterilen Kautelen durchgeführt. Schließlich muss eine umgehende Konservierung und Lagerung des Gewebes in einer akkreditierten Gewebebank erfolgen, die gleichzeitig eine Vielzahl von serologischen und mikrobiologischen Untersuchungen durchführen muss, um eine bestehende Infektion auszuschließen. Jedoch besteht auch unter Beachtung sämtlicher Präventionsmaßnahmen ein, wenn auch geringes, Restrisiko einer Erkrankungsübertragung. Während im anglo-amerikanischen Raum dieses Restrisiko als so gering erachtet wird, dass rechtlich bindend keine weiteren Maßnahmen getroffen werden müssen, erfordert der Gesetzgeber in der Bundesrepublik Deutschland (siehe Abschnitt 1.3.4), dass Spendergewebe einem geeigneten Sterilisationsprozesses unterzogen werden muss, wenn es als Arzneimittel in Verkehr gebracht werden soll <sup>29</sup>. Aktuell existieren in der Bundesrepublik Deutschland drei Verfahren, die für die Sterilisation von Weichteilgewebe angewendet werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: In Deutschland angewandte Sterilisationsverfahren von Weichteiltransplantaten

| <i>Bezeichnung</i>                | <i>Verfahrenstyp</i>                             |
|-----------------------------------|--|
| Gamma / Elektron Beam Bestrahlung | Hochdosis-Bestrahlung                            |
| Peressigsäure Ethanol             | Chemische Behandlung                             |
| Tutoplast®                        | Chemische Behandlung + Niedrig-Dosis Bestrahlung |

#### Peressigsäure-Ethanol-Sterilisation (siehe Abschnitt 2.2.1)

Die Effektivität der Peressigsäure-Ethanol Sterilisation wurde Anfang der 80er Jahre für Weichteilgewebe von Starke et al. am Beispiel der Achillessehne in-vitro belegt <sup>72</sup>. Dieses Verfahren basierte auf dem erfolgreichen Einsatz in der Sterilisation von Spenderknochen seit Beginn der 70er Jahre <sup>71</sup> und konnte erfolgreich klinisch in der Sterilisation von Herzklappen eingesetzt werden <sup>14</sup>.

Hierbei wird das zu sterilisierende Gewebe primär unter hohem Druck von Fett und Blut mit sterilem Wasser gereinigt sowie in einer Lösung aus Chloroform und Methanol abschließend entfettet. Nach Entfernung des Chloroforms wird die eigentliche Sterilisation unter niedrigem Druck (200 mbar) durchgeführt. Die entfetteten Transplantate werden hierfür mit Peressigsäurelösung bedeckt, welche den Zelltod möglicher Erreger bewirkt. Diese wird am Ende des Prozesses wieder aus dem Gewebe entfernt, welches durch einen Merckoquant®-Test (Merck KGaA) mit einer Sensitivität von <5 ppm kontrolliert wird.

Obwohl das Peressigsäure-Ethanol Verfahren eine Zulassung für die Sterilisation von Weichteilgeweben für den Einsatz am Menschen seit Beginn der 90er Jahre in der Bundesrepublik Deutschland besitzt, existieren keine in-vitro Untersuchungen über den Einfluss dieses Verfahren auf die biomechanischen Eigenschaften bzw. keine in-vivo Untersuchungen über den Einfluss auf die biologischen Umbau- und Einbauprozesse von entsprechend behandeltem Spendersehnengewebe.

#### Gamma-/Elektron Beam Bestrahlung (siehe Abschnitt 2.2.2)

Das weltweit am weitesten verbreitete und am häufigsten Anwendung findende Sterilisationsverfahren ist die Bestrahlung. Hierbei werden primär Gamma-Quellen als Strahlungsinitiator verwendet. Bei der Bestrahlung werden Niedrigdosis

( $\leq 15$  kGy) von Hochdosis ( $\geq 30$  kGy) Verfahren unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Niedrigdosisbestrahlung ausreichend ist, um einen vollständigen Schutz vor der Übertragung von bakteriellen Erregern durch Weichteiltransplantate zu gewährleisten<sup>12, 25</sup>. Allerdings kann ein adäquater Schutz vor Übertragung von viralen Erregern, bzw. kleineren Pathogenen wie Prionen, nur bei deutlich höheren Strahlendosen ( $\geq 30$  kGy) erreicht werden<sup>52</sup>. Verschiedene in-vitro Studien offenbarten jedoch, dass Strahlendosen  $> 20$  kGy zu einer deutlichen Reduktion der biomechanischen Eigenschaften von Weichteiltransplantaten, die in der VKB Chirurgie Anwendung finden, führten<sup>16, 55</sup>. Gleichzeitig wurde in klinischen Studien eine deutlich erhöhte Versagerrate von VKB Rekonstruktionen nach Gamma-Hochdosis Bestrahlung beobachtet<sup>54, 74</sup>. Aufgrund der rechtlichen Rahmenbedingungen in der Bundesrepublik Deutschland wird aktuell eine Dosisapplikation von  $> 30$  kGy zur terminalen Sterilisation von Sehnen- und Sehnen-Transplantaten mit Gammastrahlung empfohlen, so dass dieses Verfahren im Bereich der VKB Chirurgie keine Anwendung finden kann.

Als Alternative zur Gammastrahlung existiert ein weiteres Bestrahlungsverfahren, welches eine Elektronen-emittierende Strahlenquelle zur Gewebesterilisation nutzt. Dieses Verfahren wird als Electron-Beam (Ebeam) Verfahren bezeichnet<sup>12</sup>. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass eine höhere Energie pro Zeit appliziert werden kann und die Dichte der Bestrahlung pro Fläche deutlich homogener als bei der Gammabestrahlung ist. Dieses hat zum einen den Vorteil, dass der Bestrahlungsprozess deutlich kürzer ist (Minuten vs. Stunden (Ebeam vs. Gamma)), vor allem aber Dosisspitzen vermieden werden, die beim Gammaverfahren nicht zu umgehen sind. Daraus resultierte die Hypothese, dass die Elektronenbestrahlung (Ebeam) eine deutlich geringere Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften bedingen sollte als die Gammabestrahlung. Entsprechende Beobachtungen konnten bei der Sterilisation von nicht-vitalen Materialien gemacht werden. Allerdings existieren bis dato keine in-vitro oder in-vivo Untersuchungen der Ebeam Sterilisation von Weichteiltransplantaten.

### Tutoplast®-Sterilisation

Dieses von der Firma Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand, Deutschland) entwickelte Verfahren kombiniert eine chemische Behandlung von

Spendersehnen mit einer Niedrig-Dosis Bestrahlung (15 kGy). Initial wurde dieses Verfahren für die Sterilisation von Knochen entwickelt, fand schließlich aber auch Einsatz in der Behandlung von VKB Transplantaten. In verschiedenen klinischen Studien<sup>18-20</sup>, musste eine deutlich erhöhte Versagerrate der VKB Rekonstruktionen, vor allem in Patientengruppen mit hohem Aktivitätsniveau, festgestellt werden. Daher findet dieses Verfahren zur Sterilisation von Transplantaten für die Kreuzbandchirurgie kaum mehr Verwendung.

#### 1.4 Wissenschaftliche Fragestellung

Die biologischen Um- und Einbauprozesse von humanen nicht-sterilisierten freien Spendertransplantaten in der VKB Chirurgie und deren Vergleich mit dem autologen VKB Ersatz sind zum Zeitpunkt der Entwicklung dieser Untersuchungen (2002) nicht bekannt gewesen. Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1.) Existieren Unterschiede in den biologischen Umbauvorgängen des intraartikulären Transplantates zwischen nicht-sterilisiertem allogenen und autologem Ersatz des vorderen Kreuzbandes?
- 2.) Existieren Unterschiede in den biologischen Einheilungsprozessen des intraossären Transplantates zwischen nicht-sterilisiertem allogenen und autologem Ersatz des vorderen Kreuzbandes?
- 3.) Unterscheidet sich die Wiederherstellung der Gelenkstabilität und biomechanischen Funktion von allogenen zum autologem freien Sehnen transplantat?

Da der Einsatz von Sterilisationsverfahren bei der Verwendung von Spendertransplantaten in der Bundesrepublik Deutschland bindend ist, wurden folgende bisher nicht geklärten Fragestellungen hinsichtlich existenter Sterilisationsverfahren gestellt:

##### Peressigsäure-Ethanol Verfahren

- 1.) Welchen Einfluss hat das Peressigsäure-Ethanol Verfahren auf die biomechanischen Eigenschaften eines freien Sehnen transplantates in-vitro?

- 2.) Welchen Einfluss hat das Peressigsäure-Ethanol Verfahren auf die biologischen Umbauprozesse des intraartikulären Transplantates in-vivo?
- 3.) Welchen Einfluss hat das Peressigsäure-Ethanol Verfahren auf die biologischen Einbauprozesse des intraossären Transplantates in-vivo?
- 4.) Existiert eine Beeinträchtigung der Wiederherstellung der Gelenkstabilität und biomechanischen Funktion des allogenen VKB-Transplantates nach Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol Verfahren in-vivo?

#### Electron-Beam Verfahren

- 1.) Führt die Niedrig- und Hochdosisbestrahlung von Sehnen-Transplantaten mit dem Electron-Beam Verfahren zu geringeren Beeinträchtigungen der biomechanischen Eigenschaften als bei Verwendung der herkömmlichen Gamma-Bestrahlung in-vitro?
- 2.) Wie vergleichen sich die Umbauprozesse eines allogenen freien Sehnen-Transplantates nach Hochdosis-Sterilisation mit dem Electron-Beam mit herkömmlicher Gamma Bestrahlung in-vivo?

## 2 Experimentelle Untersuchungen

### 2.1 Vergleich des autologen und allogenen vorderen Kreuzbandersatzes mit knochenblockfreiem Sehnentransplantat im in-vivo Tiermodell

Während zum einen die knochenblockfreien Sehnen (hier im Speziellen die Semitendinosus- und Gracilissehnen, die auch als sogenannten „Hamstring“-Sehnen bezeichnet werden) deutlich an klinischer Bedeutung gewonnen haben und die knochenblocktragenden Sehnen (vor allem das Knochen- Patellarsehnen-Knochen Transplantat) als meist-verwendete Transplantate in der vorderen Kreuzbandchirurgie erreicht bzw. abgelöst haben<sup>10, 15, 47</sup>, ist es zum anderen zu einem sprunghaften Anstieg der Verwendung von Spendersehnen (Allografts) und hier im Speziellen von knochenblockfreien Sehnen gekommen<sup>41, 42, 80</sup>. Die Popularität der freien Sehnenallografts basiert unter anderem auf der besseren Verfügbarkeit, da neben den auch autolog verwendeten Hamstringsehnen weitere Transplantate wie die Tibialis anterior und posterior und die langen Peronealsehnen zur Verfügung stehen. Allerdings basieren der Kenntnisstand bezüglich der biologischen Um- und Einbauprozesse fast ausschließlich auf Untersuchungen von knochenblocktragenden Patellarsehnen-transplantaten<sup>31, 35, 69, 70, 81</sup>. Vergleichende in-vivo Studien von autologen und nicht-sterilisierten allogenen Rekonstruktionen des vorderen Kreuzbandes mit freiem Sehnen-transplantat lagen zum Zeitpunkt der Studienentwicklung dieser Arbeit nicht vor.

#### 2.1.1 Biologische Umbauprozesse des intraartikulären Transplantates

**Scheffler SU, Schmidt T, Gangéy I, Dustmann M, Unterhauser FN, Weiler A:** Fresh-Frozen Allografts versus Autografts in ACL Reconstruction: Delayed Remodeling and Inferior Mechanical Function in Sheep-: Arthroscopy. 2008 Apr;24(4):448-58 (Winner of the Richard O’Conner award 2007)

In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass das freie nicht-sterilisierte allogene Sehnen-transplantat als Ersatz des vorderen Kreuzbandes im Schafsmodell nach 6 und 12 Wochen im Vergleich zum autologen VKB Ersatz eine zeitliche Verzögerung seiner intraartikulären zellulären Umbauprozesse zeigt. Zu diesen

frühen Zeitpunkten des biologischen Umbaus konnten keine signifikanten Unterschiede der biomechanischen Eigenschaften festgestellt werden. Nach einem Jahr zeigten sich nur noch geringfügige Unterschiede im histologischen Erscheinungsbild beider Transplantattypen, während die biomechanischen Eigenschaften des autologen VKB Ersatz signifikant besser waren als die der allogenen Rekonstruktionen.

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18375278>

In einer weiteren Studie wurden die extrazellulären Veränderungen des intraartikulären Transplantates im Heilungsverlauf von autologem und allogennem VKB Ersatz am gleichen Tiermodell untersucht und verglichen.

**Dustmann M, Schmidt T, Gangey I, Unterhauser FN, Weiler A, Scheffler SU:** The extracellular remodelling of free-soft-tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament - a comparison study in a sheep model -: Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2008 Apr;16(4):360-9. Epub 2008 Jan 9

Analog konnte eine zeitliche Verzögerung der Wiederherstellung der extrazellulären Matrix zu den frühen Zeitpunkten nach 6 und 12 Wochen beobachtet werden. Nach einem Jahr konnten keine signifikanten Unterschiede der Extrazellulärmatrix von autologem und allogennem freiem Sehnen transplantat festgestellt werden, wobei sich eine Entwicklung hin zu einer Morphologie des intakten vorderen Kreuzbandes zeigte, ohne dass eine komplette Wiederherstellung nach einem Jahr zu beobachten war.

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18183370>

### 2.1.2 Ossäre Integration des extraartikulären Transplantates

Wie in Abschnitt 1.2.3 dargelegt, wird die Funktion des Kniegelenkes zum einen durch die biologischen Umbauprozesse des intraartikulären Transplantatanteils, zeitgleich aber auch durch die biologische Inkorporation des Transplantates im femoralen und tibialen Knochen bestimmt. Hierzu gab es bis zum Zeitpunkt der Studienentwicklung keine Untersuchungen, die die Einheilung von autologem und allogenen freien Sehnenstransplantat als VKB Ersatz am Tiermodell untersucht haben.

**Scheffler SU, Unterhauser FN, Keil J, Weiler A:** Comparison of tendon-to-bone-healing after soft-tissue autograft and allograft ACL reconstruction in a sheep model, 12th ESSKA 2000 congress, May 24-27, 2006, Innsbruck, Austria

Es zeigte sich, dass zu den frühen Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 12 Wochen das freie allogene Sehnenstransplantat eine zeitlich verzögerte knöcherne Einheilung im Vergleich zum autologen VKB Ersatz durchlief. Nach einem Jahr konnten keine signifikanten Unterschiede im Reifegrad und der Wiederherstellung einer neuen direkten Sehneninsertion auf Gelenkniveau zwischen den beiden Transplantattypen festgestellt werden.



**COMPARISON OF TENDON-TO-BONE-HEALING AFTER SOFT-TISSUE AUTOGRAFT AND ALLOGRAFT ACL RECONSTRUCTION IN A SHEEP MODEL**

**Scheffler SU, Unterhauser FN, Keil J, Weiler A**

Sports Traumatology & Arthroscopy Service, Trauma & Reconstructive Surgery,  
Charité, Humboldt-University Berlin

**Purpose:** Soft-tissue allografts have become an important graft option for the reconstruction of the anterior cruciate ligament (ACL). However, recent studies raised concerns about the prolonged time of graft incorporation, increased laxity and rerupture rates during long-term healing for these graft types. The underlying mechanisms are unclear with most studies examining the intraarticular remodeling, but no available data on tendon-to-bone-healing of soft-tissue autograft and allograft ACL reconstructions.

**Methods:** 42 mature female merino sheep underwent open ACL reconstruction with a flexor tendon autograft (AU) or fresh-frozen allograft (AL). Animals were followed for 6, 12 and 52 weeks with seven animals in each group at the respective time points. Proximal tibiae were cut sagittally in the center of the tendon-bone interface. Cuts were embedded into PMMA for undecalcified histologies and 6  $\mu$ m thick serial sections were created. Masson-Goldner's Trichrome, a modified Safranin O-van Kossa, and Alcian blue stains were used for descriptive analysis using normal and polarized light. Type and maturity of the tendon-bone insertion was evaluated using the scoring system below of Tab. 1.

**Results:** At 6 weeks, the AU and AL group had a fibrous interzone (FIZ) between graft and tunnel wall with frequent Sharpey-like fibers. 4 AU and 2 AL specimens showed first blending of the graft and mineralized cartilage at the tunnel aperture (class 1 & 2). Foreign-body giant cells and osteoclasts phagocytosing graft tissue and bone debris were seen. Osteoblasts with immature woven bone and a thin line of non-calcified osteoid was bridging the FIZ. Central graft necrosis and at the graft-bone interface hypercellularity and hypervascularity were found.

At 12 weeks a FIZ was mainly found at the tunnel entrance and the upper third of the bone-tunnel. A direct ligament insertion was observed in 5 of the AU and only 2 of the AL specimens (class 3 & 4) at the aperture side. Osteoclasts were reduced in the AU group compared to 6 weeks, whereas osteoblasts were increased in both groups. In all AL specimens central necrosis remained with only one in the AU group. The graft-bone interface was hypercellular and hypervascular in both groups.

Increased tunnel widening was found in the AL compared to the AU specimens at 6 and 12 weeks.

At 52 weeks central necrosis of the AL was still visible, while AU appeared centrally normocellular with only partial hypercellularity and vascularity at the bone-interface. All auto- and allografts showed a direct ligament insertion at the aperture site. Increased tunnel-widening remained in the AL compared to the AU group. Bony graft replacement with narrowing of the tunnel entrance was observed in both groups.

**Conclusions:** Tendon-bone incorporation seemed to be delayed and tunnel enlargement increased in allografts during early graft healing up to 12 weeks. However, at one year both graft types were able to reestablish a direct tendon-to-bone insertion at the tunnel aperture, even though differences remained regarding cellularity and vascularity of the intratunnel graft tissue. Bony replacement of the graft was ongoing at the tunnel entrance, but was not completed along the complete intratunnel graft length with no differences between auto- and allografts.

The findings of this study suggest that early aggressive rehabilitation should be cautioned with soft-tissue allograft ACL reconstruction due to the delayed bony graft incorporation.

**Tab. 1:** Scoring system for tendon-bone incorporation

| Classification | Description                                 |
|----------------|---|
| 0              | No ligament insertion (LI)                  |
| 1              | LI with chondroid like cells, non-calcified |
| 2              | LI with chondroid like cells, calcified     |
| 3              | Immature direct LI                          |
| 4              | Mature direct LI                            |

### 2.1.3 Wiederherstellung der biomechanischen Funktion

Obwohl die biologischen Umbau- und Einbauvorgänge der frühen Heilungsphasen nach 6 und 12 Wochen eine zeitliche Verzögerung der allogenen VKB Transplantate im Tiermodell zeigten, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wiederherstellung der anterior-posterioren Gelenkstabilität, sowie in der Ausrißsteifigkeit und Versagenskraft der VKB Rekonstruktionen mit Auto- und Allograft festgestellt werden <sup>62</sup> (siehe Publikation Abschnitt 2.1.1). Während nach einem Jahr keine deutlichen histologischen Unterschiede zwischen Auto- und Allografts zu beobachten waren <sup>11, 62</sup>, waren die strukturellen und mechanischen Eigenschaften der allogenen VKB Rekonstruktionen signifikant niedriger, sowie die anterior-posteriore Translation als Messparameter der Gelenkinstabilität, signifikant höher als bei den autologen VKB Transplantaten.

## **2.2 Einfluss von Sterilisationsverfahren auf die Biologie und Biomechanik von allogenen Sehnentransplantaten für den vorderen Kreuzbandersatz**

Während im anglo-amerikanischen Raum die Verwendung von nicht-sterilisierten Allografts in der Kreuzbandchirurgie aufgrund der rechtlichen Rahmenbedingungen, der Bestimmungen der American Association of Tissue Banks (AATB) und der bestehenden Netzwerke von Gewebebanken unproblematisch ist, existiert die Möglichkeit der Verwendung von Spendersehnen als Arzneimittel in Deutschland nur nach Sterilisation des Gewebes (siehe Abschnitt 1.3.4). Aktuell angewandte Verfahren in der Bundesrepublik Deutschland sind in Abschnitt 1.3.5 ausführlich erläutert worden.

### **2.2.1 Peressigsäure-Ethanol Verfahren**

Die Effektivität des Peressigsäure-Ethanol Sterilisationsverfahren (PES) bakterielle Erreger, wie *Bacillus subtilis*, *Pseudomonaden*, *Staphylococcus aureus* und *Candida* Pilze zu eliminieren wurde an der humanen Achillessehne nachgewiesen<sup>72 51</sup>. Heutige Richtlinien erfordern jedoch von Sterilisationsverfahren zusätzlich einen effektiven Schutz gegen virale Erreger, welche aufgrund ihrer Struktur und geringen Größe deutlich resistenter gegenüber Inaktivierungsverfahren sind. Die suffiziente Inaktivierung von viralen Erregern, wie dem bovinen Parvovirus, mit dem Peressigsäure- Ethanol Verfahren wurde für spongiösen Knochen nachgewiesen<sup>53</sup>. Es ist jedoch bekannt, dass eine erhöhte Protein-Konzentration, wie sie typischerweise in Sehnen und Bändern im Vergleich zum spongiösen Knochen gefunden werden, zu einer Herabsetzung der Effektivität von chemischen Inaktivierungsverfahren führen kann<sup>82</sup>. Dieses Phänomen wird als „Protein-Effekt“ bezeichnet. Da das Peressigsäure-Ethanol Verfahren auch zur Sterilisation von allogenen Sehnen und Bändern zugelassen ist, sollte der Nachweis geführt werden, dass dieses Verfahren keinen Verlust seiner Inaktivierungskompetenz bei entsprechendem Weichteilgewebe zeigt.

**Scheffler SU, Trautmann S, Smith M, Kalus U, von Versen R, Pauli G, Pruss A:** Influence of collagenous proteins of Achilles tendon, skin and cartilage on the virus inactivating efficacy of peracetic acid-ethanol: *Biologicals*. 2007 Oct;35(4):355-9. Epub 2007 Jul 19

Es konnte gezeigt werden, dass die Sterilisation von humaner Achillessehne, Haut und Knorpel, mit dem Peressigsäure-Ethanol Verfahren zu keiner Minderung der virusinaktivierenden Kapazität führte.

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644408>

In der aktuellen Literatur existieren keine Studien, die den unmittelbaren Einfluss des Peressigsäure-Ethanol Verfahrens auf die biomechanischen Eigenschaften von Weichteiltransplantaten untersucht haben. Daher wurde in einem zweiten Schritt der Effekt der Peressigsäure-Ethanol Sterilisation auf die biomechanischen Eigenschaften von humanen Patellarsehnen, wie sie typischerweise Einsatz in der vorderen Kreuzbandchirurgie finden, in-vitro analysiert.

**Scheffler SU, Scherler J, Pruss A, von Versen R, Weiler A:** Biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone autografts and allografts after sterilization with peracetic acid-ethanol, *Cell and Tissue Banking* 2005, 6: 109-115

Die Ergebnisse dieser Studie wiesen keinen nachteiligen Effekt der Peressigsäure-Ethanol Sterilisation auf die strukturellen und viskoelastischen biomechanischen Eigenschaften von humanen Patellarsehnentransplantaten nach zyklischer submaximaler, sowie einmaliger maximaler Belastung auf im Vergleich zu nicht-sterilisierten Patellarsehnentransplantaten.

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15909098>

Aufgrund dieser positiven Studienergebnisse wurde in einer dritten Studie der Einfluss des Peressigsäure-Ethanol Sterilisationsverfahren auf die frühen Um- und Einbauvorgänge in-vivo untersucht. Es wurde das identische Tiermodell der Untersuchungen von autologem und allogenen VKB Ersatz verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Resultate ermöglichen zu können.

**Scheffler SU, Gonnermann, Kamp J, Pryzbilla M, Pruss A:** Peracetic-acid ethanol sterilization inhibits the remodeling of soft-tissue allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament in an in-vivo sheep model, Clin Orthop Relat Res. 2008 Aug;466(8):1810-8. Epub 2008 May 20

In dieser Studie musste jedoch festgestellt werden, dass nach 6 Wochen eine deutliche Verzögerung des biologischen Remodeling im Vergleich zum nicht-sterilisierten allogenen VKB Ersatz und nach 12 Wochen fast ein vollkommener Stillstand der intraartikulären Umbauvorgänge zu beobachten war. Gleichzeitig musste eine deutliche Reduktion der strukturellen Eigenschaften der Peressigsäure sterilisierten VKB Transplantate sowohl im Vergleich zum nicht-sterilisierten allogenen als auch autologen VKB Ersatz nach 6 und vor allem nach 12 Wochen festgestellt werden. Diese Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften der Ersatzplastiken resultierte in einer deutlich erhöhten anterior-posterioren Translation, gleichzusetzen mit einer Kniegelenksinstabilität.

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18491201>

Aufgrund dieser negativen Studienergebnisse, die den Einsatz des Peressigsäure-Ethanol Verfahrens zur Sterilisation von Spendertransplantaten in der vorderen Kreuzbandchirurgie in Frage stellen, wurde auf eine Tierstudie mit Langzeitstehern (1 Jahr) verzichtet, da aktuelle Bestrebungen in der Kreuzbandchirurgie vor allem darauf ausgerichtet sind, möglichst früher eine volle Belastbarkeit wiederherzustellen, dieses aber gerade aufgrund der Beobachtungen der in-vivo Studie nicht möglich wäre.

### 2.2.2 Electron-Beam Verfahren

Das Electron-Beam Verfahren hat bisher vor allem Anwendung in der Sterilisation von avitalen Materialien, wie Kunststoffen, gefunden. Dabei zeigte sich bei hohen Strahlendosen unter Zusatz von CO<sub>2</sub> ein deutlich geringerer Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften dieser Materialien als bei der herkömmlichen Gamma Bestrahlung<sup>66</sup>. Jedoch existierten bis dato keine publizierten Untersuchungen, die den dosisabhängigen Einfluss des Elektronen-Bestrahlung (Ebeam) auf die biomechanischen Eigenschaften von human Patellarsehnen, die beim Ersatz des vorderen Kreuzbandes Verwendung finden, untersucht haben.

**Hoburg A, Salahedeen K., Smith M., Gohs U., Pruss A., Scheffler SU:** Impact of electron beam irradiation on biomechanical properties of soft-tissue allografts in ACL reconstruction, accepted for publication in the American Journal of Sports Medicine

Strahlendosen von 15, 25 und 34 kGy hatten keinen nachteiligen Effekt auf die strukturellen Eigenschaften der humanen Patellarsehnen, mit Ausnahme einer signifikant reduzierten Versagenskraft bei Hochdosisbestrahlung (34 kGy).

Link zur Publikation in PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360605>

Um einen möglichen biomechanischen Vorteil von Sehnentransplantaten nach Sterilisation mit dem Electron-Beam Verfahren im Vergleich zur herkömmlichen Gamma-Bestrahlung quantifizieren zu können, wurde eine weitere Studie abgeschlossen, die beide Verfahren unter Hochdosisbestrahlung (34 kGy) von humanen Patellarsehnen in-vitro verglich.

**Scheffler SU, Keshlaf S, Smith M, Pruss A:** Electron beam sterilization of soft-tissue grafts maintains significantly improved biomechanical properties at high-dose irradiation compared to standard gamma treatment, 7<sup>th</sup> Biennial Congress, International Society of Arthroscopy Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine, Osaka, Japan, April 4-9th, 2009

Es bestätigten sich die Ergebnisse der Untersuchungen an avitalen Materialien <sup>66</sup>, die eine geringere Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften nach Sterilisation mit der Electron-Beam Verfahren im Vergleich zur Gamma-Bestrahlung beobachteten. Es verblieb jedoch auch bei den Electron-Beam sterilisierten Transplantaten im Vergleich zur nicht-sterilisierten Sehne eine signifikante Reduktion der Versagenskraft.

## **Electronic beam sterilization of soft-tissue grafts maintains significantly improved biomechanical properties at high-dose irradiation (34 kGy) than standard gamma treatment**

**Scheffler SU, Keshlaf S, Smith M, Pruss A**

**Introduction:** Gamma irradiation is the most frequently used sterilization procedure for soft-tissue allografts as they are used in ACL surgery. However, biomechanical properties of gamma irradiated allografts at dosages > 20 kGy are significantly reduced. Electronic beam (Ebeam) irradiation dose and other parameters can be more accurately controlled than it is economically feasible than with gamma irradiation. Also, it has been shown that the addition of CO<sub>2</sub> with E-beam sterilization at low temperatures allows for a significant reduction of free radicals build-up which is mainly responsible for the loss of tissue strength.

It was the objective of this study to compare the impact of 34 kGy gamma vs. E-beam irradiation on the biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone grafts at the time of sterilization.

**Methods:** Paired 10 mm-wide human bone-patellar tendon-bone (BPTB) grafts were harvested from 10 donors and split into two groups (each n=10): A) Ebeam, B) Gamma. All grafts were irradiated with 34 kGy. 10 non-irradiated BPTB grafts of identical dimensions were used as controls.

All grafts underwent biomechanical testing: preconditioning (10 cycles, 0 – 20 N); cyclic loading (200 cycles, 20 - 200 N) and a load-to-failure (LTF) test. The strain rate was 150 mm min<sup>-1</sup>. Graft motion during cyclic loading was tracked with an optical measurement system. Failure load and displacement at failure were recorded and stiffness was derived from these values. The strain difference between the first and last cycles as well as creep were used as a determinant of viscoelasticity. Paired-samples t-test was used for statistical comparison of both study groups. Level of significance was set at  $p < 0.05$ .

**Results:** Stiffness of non-irradiated controls ( $199.6 \pm 59.1$  N/mm) and ebeam sterilized grafts ( $192.8 \pm 58.0$  N/mm) did not significantly differ, while gamma-irradiated grafts had significantly lower stiffness ( $170.6 \pm 58.2$  N/mm) than controls ( $p < 0.05$ ). Failure loads were significantly lower in both study groups (ebeam:  $1139 \pm 445$  N, gamma:  $1073 \pm 617$  N) than in the controls ( $1741 \pm 304$  N) ( $p < 0.05$ ). Creep was significantly larger in the gamma irradiated ( $1,06 \pm 0,58$  mm) than in the ebeam ( $0,26 \pm 0,24$  mm) and control ( $0,20 \pm 0,17$  mm) group that did not differ significantly. Strain difference was not different between either control or study groups.

**Discussion:** This study shows that the impairment of biomechanical properties of soft-tissue allografts at high irradiation doses of 34 kGy is substantially reduced with the ebeam procedure compared to standard gamma treatment. Considering the results of this study and the improved control of irradiation application with electronic beam, this technique might be a promising alternative in soft-tissue sterilization. However, a significant reduction of failure strength has to be conceded with electronic beam irradiation, too. Therefore, in future studies it is important to gain better understanding of the underlying processes that affect soft-tissue strength and to eventually eliminate these adverse effects.



Aufgrund der positiven Ergebnisse der Vorstudien wurde schließlich der Einfluss der Electron-Beam Hochdosisbestrahlung (34 kGy) auf die frühen biologischen Umbauprozesse und die Wiederherstellung der biomechanischen Eigenschaften vom freien Sehnentransplantat im Tiermodell in-vivo untersucht. Hierbei war ursprünglich eine Analyse von zwei Strahlendosen (25 und 34 kGy) zu den Standzeiten 6, 12 und 52 Wochen geplant, aufgrund von Auflagen des Tierschutzbeauftragten des Landes Berlin in einer ersten Studie jedoch lediglich die Analyse der Hochdosisbestrahlung (34 kGy) zu den frühen Zeitpunkten 6 und 12 Wochen zugelassen worden.

**Schmidt T., Hoburg A., Broziat C., Scheffler S.:** Untersuchung des Einflusses des Electron Beam Sterilisationsverfahrens auf die Revaskularisierung und Biomechanik während des frühen Bandremodeling allogener Kreuzbandtransplantate am Schafsmodell, AGA-Research-Symposium, 26. AGA Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Arthroskopie, Leipzig, Deutschland, 17.-19. September 2009

In dieser Studie zeigte sich, dass die Hochdosisbestrahlung mit 34 kGy im Electron-Beam Verfahren zu einer signifikant erhöhten Revaskularisierung der freien Sehnentransplantate im Vergleich zu den nicht-sterilisierten Allografts der Vorstudien führte (s. Abschnitt 2.1.1). Einhergehend mit diesen histologischen Ergebnissen wurde eine deutliche, signifikante Reduktion der biomechanischen Eigenschaften (signifikant geringere Ausrißsteifigkeit und Ausrißfestigkeit) festgestellt. Ebenfalls war die anterior-posteriore Gelenkstabilität zu den frühen Zeitpunkten nach 6 und 12 Wochen signifikant erhöht, entsprechend die Gelenkstabilität erniedrigt.

## Untersuchung des Einflusses des Electron Beam Sterilisationsverfahrens auf die Revaskularisierung und Biomechanik während des frühen Bandremodeling allogener Kreuzbandtransplantate am Schafsmodell

T. Schmidt<sup>1</sup>, A. Hoburg<sup>2</sup>, C. Broziat<sup>2</sup>, S. Scheffler<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, <sup>2</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Campus Mitte, Berlin, Germany

**Fragestellung:** Ist das Electron Beam Bestrahlungsverfahren ein geeignetes Verfahren zur Sterilisation allogener Kreuzbandtransplantate?

**Methoden:** 18 Merinomixschafen wurde das VKB durch eine allogene, mit Electron Beam Strahlung sterilisierte Sehne ersetzt. Die Standzeiten betragen 6 und 12 Wochen. Zunächst erfolgten biomechanische Testungen. Histologisch wurde mittels immunhistologischer Faktor VIII Detektierung die Revaskularisierung semiquantitativ in verschiedenen Regionen (SUB= subsynovial, MID= intermediär) ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Als Kontrolle dienten Daten zum Remodeling unsterilisierte allogener und autologer Transplantate eines identischen Tiermodells unserer Arbeitsgruppe.

**Ergebnisse:** Die bestrahlten Sehnen zeigten nach 6 Wochen signifikant geringere Steifigkeiten (ST) und Versagenslast (FL) als die Autografts. Nach 12 Wochen waren die Unterschiede zu beiden Kontrollgruppen signifikant. Von 6 nach 12 Wochen kam es zu einem geringen Anstieg der Steifigkeit und Absinken der Versagenslast in der Ebeam-Gruppe. Zu beiden Zeitpunkten kam es bei 2 (6 Wochen) bzw. 3 (12 Wochen) Ebeam-Sehnen zu einem vorzeitigen Versagen, so dass für diese keine maximale Versagenslast ermittelt werden konnte.

Es zeigte sich nach 6 Wochen in der MID Region der Ebeamsehnen eine deutlich geringere Gefäßdichte im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Nach 12 Wochen kam es zu einem ausgeprägten Anstieg der Vaskularisierung in der Ebeam Gruppe. Bei den Allografts kam es zu einem moderaten Anstieg, während die Autografts nur minimale Änderungen aufwiesen.

| * p ≤ 0.05                     | Ebeam 6 Wo. | Allo 6 Wo. | Auto 6 Wo.  | Ebeam 12 Wo. | Allo 12 Wo. | Auto 12 Wo. |
|--------------------------------|-------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Versagenskraft (N)             | 109 ± 113 * | 225 ± 112  | 232 ± 74    | 69 ± 22 *    | 280 ± 108   | 392 ± 148   |
| Steifigkeit (N/mm)             | 22 ± 13     | 60 ± 28    | 61 ± 25     | 33 ± 44 *    | 68 ± 14     | 73 ± 15     |
| Gefäße SUB (/mm <sup>2</sup> ) | 205 ± 226   | 152 ± 224  | 227 ± 191   | 452 ± 324 *  | 199 ± 165   | 232 ± 45    |
| Gefäße MID (/mm <sup>2</sup> ) | 38 ± 32     | 111 ± 170  | 305 ± 224 * | 247 ± 242    | 200 ± 148   | 254 ± 101   |

**Diskussion:** Das Electron Beam Verfahren konnte bei *in vitro* Vorversuchen an humanen Patellarsehnen deutliche Vorteile gegenüber der herkömmlichen Gammabestrahlung zeigen. Der Tierversuch verdeutlicht jedoch, dass das Verfahren zu einer erheblichen Verminderung der mechanischen Eigenschaften der Transplantate während des frühen Remodelings führt. Die von 6 nach 12 Wochen weiter fortschreitende massive Revaskularisierung könnte hierbei eine ursächliche Rolle für die verminderte mechanische Kompetenz spielen. Von einer Verwendung von mit Ebeam 34 kGy sterilisierten Sehnen zum Kreuzbandersatz muss anhand der Ergebnisse abgeraten werden, Modifikationen des Verfahrens könnten in der Zukunft jedoch bessere Ergebnisse erbringen.

Presenting author: Dr. med. vet. Tanja Schmidt

## 3 Diskussion

### 3.1 Untersuchung nicht-sterilisierter Allografts

Im ersten Abschnitt verglichen wir in verschiedenen Teilstudien die mechanischen Eigenschaften und die biologischen Um- und Einbauprozesse einer autologen mit einer allogenen Ersatzplastik des vorderen Kreuzbandes unter Verwendung eines freien Sehnentransplantates im Tiermodell. Es zeigte sich, dass der biologische Reifungsprozess sowohl der intraartikulären Spendersehne als auch die Einheilung in den ossären Tunnel des Empfängers im Vergleich zur körpereigenen (autologen) Sehne in den ersten 3 Monaten verzögert ist, nach Ablauf eines Jahres beide Transplantattypen eine Entwicklung hin zum intakten vorderen Kreuzband nehmen und deutlich geringere Unterschiede im Reifegrad zeigen. Biomechanische Konsequenzen im Sinne einer eingeschränkteren Wiederherstellung der strukturellen Eigenschaften des Transplantates und der Gelenkstabilität konnten nur nach 1 Jahr für die allogene im Vergleich zur autologen VKB Rekonstruktion festgestellt werden.

In unserer Untersuchung konnten wir erstmalig zeigen, dass ähnlich der bekannten Verzögerung der intraartikulären Umbauprozesse von knochenblocktragenden Spendersehnen<sup>1, 2, 8, 17, 31, 45, 69, 70, 81</sup>, solche auch im freien allogenen Sehnentransplantat in den ersten drei Monaten zu beobachten sind<sup>62</sup>. Zusätzlich konnte erstmalig auch die Expression spezieller kontraktiler Zellen, sogenannter Myofibroblasten, im Heilungsverlauf der allogenen Sehne nachgewiesen werden<sup>11</sup>. Die Bedeutung dieser Zellen in der frühen Wiederherstellung der strukturellen Bandintegrität sind erst seit kurzem bekannt<sup>44, 85</sup>. Diese Zellen zeichnen sich durch ihre Kapazität aus, strukturelle Defekte, wie sie durch die ausgedehnte Remodelingaktivität der ersten 3 Monate im Sehnentransplantat zu beobachten sind, mittels ihrer kontraktilen Eigenschaften überbrücken zu können. Somit stellen sie einen sehr selektiven Parameter dar, um Unterschiede im frühen Reifegrad der beiden Sehnentypen analysieren zu können.

Weitere neue bis dato nicht existente Beobachtungen konnten für die ossäre Einheilung von Spendersehnen erbracht werden. Die biologischen Umbauvorgänge der ossären Einheilung unterscheiden sich substantiell von den intraartikulären

Bandveränderungen<sup>65, 83</sup>. Eine histologische Untersuchung dieser Vorgänge am freien allogenen Sehnentransplantat ist in der publizierten Literatur nicht existent. Es zeigte sich analog zu der Verzögerung des intraartikulären Bandumbaus, eine ebenso zeitliche Verzögerung der ossären Transplantatintegration der Allografts<sup>64</sup> während der frühen Heilungsphase. Interessanterweise führte die frühe Verzögerung der biologischen Einheilung der Allografts nicht zu einer signifikanten Einschränkung der mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu den Autografts. Eine Erklärung hierfür mag der kurze Zeitraum zwischen Beginn der Vollbelastung der Tiere (in der Regel nach 2 – 3 Wochen) und den frühen Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 12 Wochen gewesen sein, so dass die in diesem Zeitraum aufgetretene Last nicht zu einer messbaren Auslockerung der vorderen Kreuzbandplastik oder Elongation des Transplantates führen konnte und somit keine deutlich messbaren biomechanischen Unterschiede festgestellt werden konnten. Während aber zwischen 12 Wochen und 1 Jahr die strukturellen Eigenschaften der autologen VKB Transplantate deutlich anstiegen und sich dies in einer entsprechend verbesserten Gelenkstabilität widerspiegelte, kam es zu keinen Verbesserungen derselben biomechanischen Eigenschaften in der Allograft Gruppe zwischen diesen Zeitpunkten. Da keine Unterschiede im Gangbild und der Belastung während des gesamten Untersuchungszeitraums der Jahrestiere zwischen den beiden Studiengruppen zu beobachten waren, ist es wahrscheinlich, dass die kontinuierliche Belastung der Allografts über 1 Jahr bei verzögertem Bandremodeling und Einheilung zu der signifikanten Reduktion der biomechanischen Eigenschaften der Allografts geführt hat.

### **3.2 Untersuchung der Sterilisationsverfahren**

Aufgrund des sich ausweitenden Indikationsspektrums für den Einsatz von Allografts in der vorderen Kreuzbandchirurgie und der überwiegend positiven klinischen Erfahrungen im anglo-amerikanischen Raum besteht ein zunehmendes Interesse in der Bundesrepublik Deutschland an dem Einsatz dieser Gewebeart<sup>41</sup>. Die rechtlichen Rahmenbedingungen des deutschen Gewebegesetzes setzen jedoch bei allgemeiner Anwendung die Sterilisation von Spendergewebe voraus, um die Gefahr einer Übertragung von Infektionen auf ein Minimum zu reduzieren. Während Untersuchungen der Sterilisationsverfahren mit Gamma Strahlung<sup>16, 25, 52, 54, 55, 74, 79</sup>

und des Tutoplast<sup>®</sup>-Verfahren<sup>18-20, 73</sup> bezüglich der Dosisfindung, des Einfluss auf die Mechanik und Biologie von Weichteiltransplantaten und klinische Studien vorliegen, ist die Datenlage über das ebenfalls zugelassene Peressigsäure-Ethanol Verfahren sehr beschränkt. Vor allem die Kenntnisse des direkten Einflusses auf die mechanischen Eigenschaften vor Implantation (in-vitro Analyse) als auch auf die biologischen Eigenschaften nach Rekonstruktion (in-vivo Analyse) sind von entscheidender Bedeutung für den klinischen Einsatz am Menschen.

In unseren Untersuchungen hatte die Peressigsäure-Ethanol Sterilisation keinen nachteiligen Einfluss auf die strukturellen und viskoelastischen mechanischen Eigenschaften der humanen Patellarsehne vor Implantation (in-vitro). Diese Ergebnisse decken sich mit den Erfahrungen der PES von Spongiosa bzw. Kortikalisblöcken<sup>24</sup>, wo ebenfalls kein relevanter Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften dieses Gewebes in-vitro festgestellt werden konnte.

Aufgrund dieser positiven Studienergebnisse wurde eine in-vivo Studie entwickelt zur Untersuchung der biologischen Umbauprozesse und Wiederherstellung der Gelenk- und Transplantatmechanik am Schafsmodell. Hier zeigte sich, dass es zu einer deutlichen Verlangsamung bzw. Inhibition der biologischen Umbauprozesse des intraartikulären Bandanteils in den ersten drei postoperativen Monaten kam, welches sich in deutlich eingeschränkten mechanischen Eigenschaften im Vergleich zur nicht-sterilisierten Spendersehne und zum autologen Ersatz widerspiegelte.

Die genaue Pathogenese dieser Beobachtung ließ sich bisher nicht abschließend erklären. Das Peressigsäure-Ethanol Gemisch wird direkt nach der Sterilisation aus dem Gewebe durch einen Spülprozess entfernt. Dieses führt zu einer kompletten Elimination der Peressigsäure mit einem Restnachweis von < 5 ppm. Daher können die Beobachtungen nicht mit einem Verbleib des Peressigsäure-Ethanol Gemisches erklärt werden. Wir vermuten, dass es aufgrund des Sterilisationsprozesses bzw. der Entfettung mit Chloroform zu Veränderungen der Oberflächenstruktur von zellulärer und extrazellulärer Matrix kommt, die die Initiierung der typischen Remodelingprozesse intraartikulär beeinträchtigt. Zu den Standzeiten 6 & 12 Wochen wurden zusätzlich Analysen der Synovialflüssigkeit durchgeführt. Hierbei konnten keine Unterschiede zu den autologen und nicht-sterilisierten allogenen Studientieren gefunden werden. Daher scheint auch die intraartikuläre Umgebung nicht direkt durch die PES beeinflusst worden zu sein. Da

nur frühe Zeitpunkte (6 und 12 Wochen) im Tiermodell nach PES untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Erholung zu späteren Zeitpunkten eintreten könnte. Auf diese Untersuchungen wurde jedoch verzichtet, da die Beeinträchtigung des intraartikulären Remodelings in einer substantiellen Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften mit deutlich erhöhter Versagerrate bei zyklischer Belastung und Verlust von Gelenkstabilität resultierte. Als Konsequenz dieser Beobachtungen müsste die postoperative Nachbehandlung deutlich restriktiver durchgeführt werden. Da eine solche Änderung der Nachbehandlung aber in erheblichem Gegensatz zu den aktuellen Entwicklungen und Konzepten in der vorderen Kreuzbandchirurgie, nämlich der möglichst schnellen und frühen Vollbelastung zur Wiederherstellung der Gelenkfunktion, stehen, wurde auf spätere Untersuchungszeitpunkte der PES in-vivo verzichtet.

Die tatsächliche Relevanz dieser am Tiermodell gewonnenen Ergebnisse spiegeln sich in klinischen Erfahrungsberichten wider, die über Versagerraten zwischen 70-90% nach Verwendung von PES Sehnentransplantaten zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes nach 6 Monaten berichten<sup>28, 56</sup>.

Bevor eine Zulassung eines komplett neuartigen Sterilisationsverfahren von Weichteiltransplantaten durch den Gesetzgeber erteilt wird, müssen verschiedene Phasen laborexperimenteller, tierexperimenteller und klinischer Untersuchungen durchgeführt werden, welches in der Regel einen Zeitraum von mehreren Jahren erfordert. Führen jedoch Modifikationen bestehender zugelassener Methoden zu einer deutlichen Verbesserung dieser Verfahren, ist eine erheblich schnellere Umsetzung zur klinischen Anwendung möglich. Daher stellte die Electron-Beam Bestrahlung eine interessante Alternative zur weitverbreiteten Gamma Bestrahlung im Rahmen der Sterilisation von Weichteilgewebe dar. Während verfahrensbedingt der zeitliche Ablauf der Gamma Bestrahlung sich in einer Größenordnung von Stunden bewegt und hierbei erhebliche Dosisschwankungen bis zum Erreichen der Gesamtdosis zu beobachten sind<sup>87</sup>, erlaubt die Nutzung von Elektronenbestrahlung (Electron Beam) eine Sterilisation von wenigen Minuten bei einer deutlich genaueren Dosisapplikation ohne die typischen Dosisschwankungen, die bei der Gamma Bestrahlung beobachtet werden müssen. Zusätzlich wurde in Analysen zur Bestrahlung von nicht-vitalen Materialien (Plastik, Kunststoff) festgestellt<sup>66</sup>, dass bei Zusatz von CO<sub>2</sub> die Radikalbildung und hiermit verbundene Reduktion der mechanischen Eigenschaften, wie sie bei der Hochdosisbestrahlung mit

Gammastrahlen beobachtet wird, substantiell reduziert werden konnte. Die Anwendung von Elektronenbestrahlung zur Sterilisation von humanem Weichteilgewebe, das beim vorderen Kreuzbandersatz Anwendung findet, ist bisher in der Literatur nicht untersucht worden.

In einem ersten Schritt wurde der dosisabhängige Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von Kreuzbandtransplantaten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass selbst bei hohen Strahlendosen von 34 kGy mit Ausnahme der Versagenskraft keine Beeinträchtigung der viskoelastischen und strukturellen Eigenschaften zu beobachten war<sup>60, 61</sup>. Eine Vielzahl an Studien konnte zeigen, dass eine Sterilisation mit Gammastrahlen ab einer Dosis von 20 kGy zu einer deutlichen Reduktion der strukturellen Eigenschaften (Steifigkeit, Versagenskraft, Transplantatelongation) von Weichteiltransplantaten führt<sup>16, 52, 54, 55, 74, 79</sup>. Daher konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Sterilisation mit Elektronenstrahlen unter Zusatz von CO<sub>2</sub> als Radikalfänger eine verbesserte Alternative zur etablierten Gammabestrahlung darstellte. Dieses sollte schließlich in einer in-vivo Studie am etablierten Tiermodell unter Durchführung des vorderen Kreuzbandersatzes, verifiziert werden.

Obwohl die als Sehnen transplantat verwendeten Flexorensehnen nach Hochdosisbestrahlung vor Implantation keine signifikanten Unterschiede ihrer mechanischen Eigenschaften zeigten, mussten wir eine deutliche Beeinträchtigung der Steifigkeit, Versagenskraft und eine erhöhte Versagensanfälligkeit während der submaximalen zyklischen Belastung der elektronenbestrahlten Versuchstiere nach 6 Wochen und vor allem nach 12 Wochen beobachten. Histologisch zeigten sich deutliche Unterschiede zu den nicht-sterilisierten Spender- und körpereigenen Sehnen. Während nach 6 Wochen eine verzögerte Revaskularisierung der Electron-Beam bestrahlten Sehnen zu beobachten war, zeigte sich nach 12 Wochen eine deutlich erhöhte Revaskularisierung. Im Gegensatz hierzu kam es bei den VKB Rekonstruktionen mit körpereigener Sehne zu einem langsamen Abfall bzw. zu einem deutlich geringeren Anstieg bei den nicht-sterilisierten allogenen Ersatzplastiken. In experimentellen Analysen der biologischen Umbauprozesse von Meniskusgewebe bzw. von Kreuzbandersatzplastiken mit körpereigenem Gewebe ist bekannt, dass eine erhöhte Gefäßaussprossung zu einer Reduktion der mechanischen Funktion dieses Gewebes führt<sup>4, 65, 76</sup>. Diese bestätigte sich in unseren Ergebnissen.

Die Ursachen dieser Veränderungen der zeitlichen Abläufe des Bandremodelings gilt es in zukünftigen Studien genauer zu analysieren. Problematisch ist hierbei vor allem die deutliche Reduktion der mechanischen Stabilität der mit Elektronen bestrahlten Sehnentransplantate nach 12 Wochen. Hier zeigte sich sogar eine Reduktion der Versagenskraft von 6 nach 12 Wochen auf 1/6 der Versagenskräfte bei autologem und auf weniger als  $\frac{1}{4}$  bei nicht-sterilisierten Spendersehnen<sup>67</sup>. In anderen tierexperimentellen Studien wurden ähnliche Beobachtungen für mit Gammastrahlen sterilisierte Ersatzplastiken des vorderen Kreuzbandes gemacht<sup>39</sup>, jedoch zeigte sich im weiteren zeitlichen Verlauf eine deutliche Erholung und Annäherung an die mechanischen Eigenschaften von nicht-sterilisierten Allografts. Eine Aussage über die Möglichkeit der Erholung der von uns analysierten Eigenschaften zu späteren Untersuchungszeitpunkten können nicht getroffen werden. Da jedoch die deutliche Beeinträchtigung der mechanischen Funktion zu Zeitpunkten beobachtet werden musste, an denen die Rehabilitation der Patienten immer mehr forciert wird, um eine möglichst frühe Rückkehr zum Aktivitätsniveau vor der Verletzung erreichen zu können, ist dieses Verfahren in seiner untersuchten Form nicht als Alternative zur Gammabestrahlung zu empfehlen.

### 3.3 Klinische Relevanz

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen von nicht-sterilisiertem allogenem und autologem freiem Sehnentransplantat zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes haben eine unmittelbare Bedeutung für die klinische Praxis. Aufgrund der verzögerten biologischen Umbauprozesse der frühen postoperativen Phase, sollte eine Nachbehandlung vorsichtiger als bei körpereigenen Transplantaten durchgeführt werden. Diese Feststellung ist umso bedeutender als durch den zunehmenden Einsatz von nicht-sterilisierten Allografts in der primären Kreuzbandchirurgie die Belastungsanforderungen deutlich gestiegen sind mit Anwendung aggressiver Nachbehandlungsprotokolle aus der primären Kreuzbandchirurgie mit körpereigener Sehne. Diese Entwicklung wird vor allem durch die (kommerziellen) Anbieter von Spendergewebe im anglo-amerikanischen Raum (USA) unterstützt. Hierbei wird vor allem argumentiert, dass vergleichende klinische Studien von Allo- und Autografts in der VKB Chirurgie nur geringe oder keine Unterschiede im klinischen Ergebnis gezeigt haben<sup>30, 36, 46, 48</sup>. Es darf jedoch



nicht übersehen werden, dass diese Studien entweder Revisionsoperationen des VKB untersucht haben <sup>46</sup> oder Nachbehandlungsschemata verwendeten, die deutlich zurückhaltender im Belastungsaufbau und –umfang waren <sup>27, 30, 48</sup> als es heute in der primären VKB Chirurgie gehandhabt wird. Bevor nicht prospektiv randomisierte klinische Studien belegen können, dass unter Anwendung identischer aggressiver Nachbehandlungsprotokolle keine Unterschiede im klinischen Ergebnis zwischen autologem und allogenen Kreuzbandersatz zu beobachten sind, sollte, entsprechend der Ergebnisse unserer Untersuchungen, die Verzögerung der biologischen Umbauvorgänge der Allografts berücksichtigt und die Nachbehandlung zurückhaltender ausgeführt werden. Hierdurch kann ein Stabilitätsverlust vermieden und möglicherweise langfristig eine funktionelle Stabilität des Kniegelenkes wiederhergestellt werden, die dem autologen vorderen Kreuzbandersatz entspricht.

Die Sterilisation von Spendergewebe stellt weiterhin ein relevantes Problem im Bereich der vorderen Kreuzbandchirurgie in Deutschland dar. Aktuell gibt es kein Verfahren, das nicht zu einer relevanten Einschränkung biologischer und/oder mechanischer Eigenschaften von sterilisiertem Sehngewebe führt. Auch die durch unsere Arbeitsgruppe unternommenen Ansätze der Modifikation von Bestrahlungsverfahren bzw. die Untersuchung des zugelassenen Peressigsäure-Ethanol Verfahrens haben zu keinen befriedigenden Ergebnissen geführt und können aktuell nicht für den uneingeschränkten klinischen Einsatz empfohlen werden. Vor allem die Ergebnisse der Untersuchungen des Peressigsäure-Ethanol Verfahrens haben zu einer Einschränkung seines Anwendungsgebietes geführt.

Die Feststellung, dass eine Hochdosisbestrahlung, auch bei modifizierter Elektronenbestrahlung, in-vivo zu einer deutlichen Beeinträchtigung des frühen Bandremodelings führt, hat in den USA bewirkt, dass keine Dosen oberhalb von 15 kGy Anwendung mehr finden. In der Bundesrepublik Deutschland wurden sowohl die Daten unserer Tierstudien zum Vergleich von nicht-sterilisiertem allogenen und autologem Kreuzbandersatz als auch die Ergebnisse der Tierstudien der Sterilisationsverfahren dem Paul-Ehrlich-Institut vorgelegt, welches als Bundesbehörde verantwortlich ist für die Gesetzgebung im Umgang mit Spendergewebe. Aufgrund der deutlich eingeschränkten Funktion von Spendersehnen nach Behandlung mit in Deutschland zugelassenen Verfahren, wurde hierdurch erstmalig erreicht, dass ein Zulassungsverfahren in Aussicht gestellt wird, das den Einsatz von nicht-sterilisierten Spendersehnen, z.B. im Bereich der

Kreuzbandchirurgie, unter bestimmten Auflagen, erlauben würde. Entsprechende vorbereitende Untersuchungen hinsichtlich des potentiellen Risikos der Kontamination von Spendergewebe und deren Infektiosität bzw. der Sensitivität bestehender Nachweisverfahren eine Kontamination nachweisen zu können, sind begonnen worden. Ziel ist es, auch in der Bundesrepublik Deutschland, uneingeschränkt nicht-sterilisiertes Spendergewebe einsetzen zu dürfen unter Wahrung klar zu definierender Indikationen, um eine in anderen Ländern schon seit längerem etablierte und erfolgreiche Behandlungsmethode anwenden und so eine optimale Versorgung der Patienten in der Bundesrepublik Deutschland gewährleisten zu können.

### 3.4 Schlussfolgerung

Die biologischen Umbauprozesse des intraartikulären nicht-sterilisierten freien Spendertransplantates und dessen knöcherne Einheilung zeigen eine zeitliche Verzögerung im Vergleich zum körpereigenen Sehnen transplantat in der Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. Dieses kann, wenn eine frühe identische aggressive Nachbehandlung durchgeführt wird, mittel- und langfristig zu einer relevanten Beeinträchtigung der mechanischen Funktion von Kniegelenken nach allogenen Kreuzbandersatz führen.

Das für die Sterilisation von Sehngewebe in der Bundesrepublik Deutschland zugelassene Peressigsäure-Ethanol Verfahren führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung der biologischen Umbauprozesse während der frühen postoperativen Phase, welches am Beispiel des vorderen Kreuzbandersatzes gezeigt werden konnte. Diese Verzögerung resultiert in einer Einschränkung der mechanischen Funktion mit substantiell erhöhtem Risiko eines Transplantatversagens. Daher sollte aktuell von der Anwendung dieses Sterilisationsverfahrens in der Behandlung von Sehnen transplantaten, die Anwendung in der Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes finden, abgesehen werden.

Der Einsatz von ionisierender Hochdosisstrahlung (> 30 kGy), z.B. in Form von Elektronenstrahlung, führt bei Sehnen transplantaten zu einer substantiellen negativen Beeinflussung der biologischen und mechanischen Eigenschaften, die zu einer eingeschränkten Funktion des Kniegelenkes nach Ersatz des vorderen

Kreuzbandes führen. Daher kann dieses Verfahren aktuell nicht zum Einsatz zur Sterilisation von Transplantaten, wie sie Anwendung in der Kreuzbandchirurgie finden, empfohlen werden.

## 4 Zusammenfassung

Die Verwendung von nicht-sterilisierten Spendersehnen als freies Sehnen transplantat zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes zeigt charakteristische Unterschiede zum Einsatz von körpereigenem Gewebe. Hierbei ist der sowohl der intraartikuläre Umbau als auch die intraossäre Einheilung der freien Sehnenallografts in den ersten 3 Monaten deutlich langsamer. Nach Ablauf eines Jahres kommt es zu einer zunehmenden Angleichung der biologischen Eigenschaften mit einer Anpassung, jedoch keiner Wiederherstellung der Morphologie des intakten vorderen Kreuzbands. Die frühe verzögerte biologische Einheilung der Allografts führt im Tiermodell erst nach 1 Jahr zu einer verminderten biomechanischen Stabilität der rekonstruierten Kniegelenke. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollte in den ersten drei postoperativen Monaten nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes mit einem nicht-sterilisierten Sehnenallograft keine forcierte Rehabilitation durchgeführt werden.

Die Sterilisation von Sehngewebe der vorderen Kreuzbandchirurgie ist weiterhin als kritisch zu beurteilen. Sämtliche in Deutschland zugelassene Verfahren haben nachteilige Einflüsse auf mechanische und biologische Eigenschaften im Vergleich zu nicht-sterilisierten Allografts oder körpereigenen Sehnen. Das bisher nicht am Modell der vorderen Kreuzbandrekonstruktion untersucht Peressigsäure-Ethanol Verfahren scheint zwar initial in-vitro keinen nachteiligen Einfluss auf die Biomechanik nehmen zu können, jedoch finden bisher nicht eindeutig geklärte Veränderungen statt, die in-vivo zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Bandumbaus und vor allem Schwächung der biomechanischen Eigenschaften führen. Daher kann dieses Sterilisationsverfahren aktuell nicht für den Einsatz von freien Sehnen transplantaten der vorderen Kreuzbandchirurgie empfohlen werden.

Während die Hochdosisbestrahlung (34 kGy) mit Gammastrahlen aufgrund ihrer nachteiligen Auswirkungen auf die Stabilität von Sehnen transplantaten inzwischen verlassen wurde, erwartet der Gesetzgeber in Deutschland bisher weiterhin die Applikation dieser Strahlendosen zum sicheren Schutz vor bakteriellen und viralen Erregern. Die Bestrahlung mit Elektronen (Ebeam Verfahren) unter Zusatz von CO<sub>2</sub> führt in-vitro zu einer deutlichen Reduktion der mechanischen Schwächung, jedoch führt dieser Effekt in-vivo nicht zu einer Optimierung der biologischen

Umbauprozesse oder Wiederherstellung der mechanischen Funktion der Transplantate, so dass der genaue Pathomechanismus der mechanischen Schwächung verstanden werden muss, um Konzepte entwickeln zu können, die eine Hochdosisbestrahlung von Kreuzbandtransplantaten sicher erlauben würden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL. Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am.* Feb 1982;64(2):217-224.
2. Arnoczky SP, Warren RF, Ashlock MA. Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft. An experimental study. *J Bone Joint Surg Am.* Mar 1986;68(3):376-385.
3. Azar FM. Tissue processing: Role of secondary sterilization techniques. *Clin Sports Med.* Apr 2009;28(2):191-201, vii.
4. Becker R, Pufe T, Kulow S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br.* Sep 2004;86(7):1082-1087.
5. Buchner M, Schmeer T, Schmitt H. Anterior cruciate ligament reconstruction with quadrupled semitendinosus tendon - minimum 6 year clinical and radiological follow-up. *Knee.* Aug 2007;14(4):321-327.
6. Cole DW, Ginn TA, Chen GJ, et al. Cost comparison of anterior cruciate ligament reconstruction: autograft versus allograft. *Arthroscopy.* Jul 2005;21(7):786-790.
7. Daniel DM, Stone ML, Dobson BE, et al. Fate of the ACL-injured patient. A prospective outcome study. *Am J Sports Med.* Sep-Oct 1994;22(5):632-644.
8. Drez DJ, Jr., DeLee J, Holden JP, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone allografts. A biological and biomechanical evaluation in goats. *Am J Sports Med.* May-Jun 1991;19(3):256-263.
9. Dunn WR, Lyman S, Lincoln AE, et al. The effect of anterior cruciate ligament reconstruction on the risk of knee reinjury. *Am J Sports Med.* Dec 2004;32(8):1906-1914.
10. Duquin TR, Wind WM, Fineberg MS, et al. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. *J Knee Surg.* Jan 2009;22(1):7-12.
11. Dustmann M, Schmidt T, Gangey I, et al. The extracellular remodeling of free-soft-tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: a comparison study in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* Apr 2008;16(4):360-369.
12. Dziedzic-Goclawska A, Kaminski A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, et al. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(3):201-219.
13. Falconiero RP, DiStefano VJ, Cook TM. Revascularization and ligamentization of autogenous anterior cruciate ligament grafts in humans. *Arthroscopy.* Mar 1998;14(2):197-205.
14. Farrington M, Wreghitt T, Matthews I, et al. Processing of cardiac valve allografts: 2.Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties. *Cell and Tissue Banking Int.* 2002;3:91-103.

15. Feller JA, Cooper R, Webster KE. Current Australian trends in rehabilitation following anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee*. May 2002;9(2):121-126.
16. Fideler BM, Vangsness CT, Jr., Lu B, et al. Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts. *Am J Sports Med*. Sep-Oct 1995;23(5):643-646.
17. Goertzen M, Dellmann A, Gruber J, et al. Anterior cruciate ligament allograft transplantation for intraarticular ligamentous reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1992;111(5):273-279.
18. Gorschewsky O, Browa A, Vogel U, et al. [Clinico-histologic comparison of allogenic and autologous bone-tendon-bone using one-third of the patellar tendon in reconstruction of the anterior cruciate ligament]. *Unfallchirurg*. Aug 2002;105(8):703-714.
19. Gorschewsky O, Klakow A, Riechert K, et al. Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results. *Am J Sports Med*. Aug 2005;33(8):1202-1209.
20. Gorschewsky O, Puetz A, Riechert K, et al. Quantitative analysis of biochemical characteristics of bone-patellar tendon-bone allografts. *Biomed Mater Eng*. 2005;15(6):403-411.
21. GOTS. GOTS News Archiv. Gesellschaft Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin für Deutschland – Österreich – Schweiz, Oberursel 2007.
22. Gregory T, Landreau P. [Meniscus and cartilaginous lesions. Influence of the delay between ACL injury and ligament reconstruction in 40-year-old patients]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. Oct 2008;94(6):566-572.
23. Guelich DR, Lowe WR, Wilson B. The routine culture of allograft tissue in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. Sep 2007;35(9):1495-1499.
24. Haimi S, Vienonen A, Hirn M, et al. The effect of chemical cleansing procedures combined with peracetic acid-ethanol sterilization on biomechanical properties of cortical bone. *Biologicals*. Mar 2008;36(2):99-104.
25. Halls N. The microbiology of irradiation sterilization. *Med Device Technol*. Aug-Sep 1992;3(6):37-45.
26. Harilainen A, Linko E, Sandelin J. Randomized prospective study of ACL reconstruction with interference screw fixation in patellar tendon autografts versus femoral metal plate suspension and tibial post fixation in hamstring tendon autografts: 5-year clinical and radiological follow-up results. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. Jun 2006;14(6):517-528.
27. Harner CD, Olson E, Irrgang JJ, et al. Allograft versus autograft anterior cruciate ligament reconstruction: 3- to 5-year outcome. *Clin Orthop Relat Res*. Mar 1996(324):134-144.
28. Höher J. personal communication. 2007.
29. Hübner, Pannenbecker, Pühler. *Arzneimittelrecht - Geltungsbereich und Definitionen*: Deutscher Ärzte-Verlag Köln; 2009.

30. Indelli PF, Dillingham MF, Fanton GS, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction using cryopreserved allografts. *Clin Orthop Relat Res*. Mar 2004;420:268-275.
31. Jackson DW, Grood ES, Goldstein JD, et al. A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med*. Mar-Apr 1993;21(2):176-185.
32. Johnson RJ, Beynon BD, Nichols CE, et al. The treatment of injuries of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*. Jan 1992;74(1):140-151.
33. Kartus J, Movin T, Karlsson J. Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts. *Arthroscopy*. Nov-Dec 2001;17(9):971-980.
34. Kessler MA, Behrend H, Henz S, et al. Function, osteoarthritis and activity after ACL-rupture: 11 years follow-up results of conservative versus reconstructive treatment. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. May 2008;16(5):442-448.
35. Kirkpatrick JS, Seaber AV, Glisson RR, et al. Cryopreserved anterior cruciate ligament allografts in a canine model. *J South Orthop Assoc*. Spring 1996;5(1):20-29.
36. Kustos T, Balint L, Than P, et al. Comparative study of autograft or allograft in primary anterior cruciate ligament reconstruction. *Int Orthop*. Oct 2004;28(5):290-293.
37. Li Z, Jin A, Tian J. [Comparative study of tendon-bone healing and bone-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. Apr 2009;23(4):473-477.
38. Linko E, Harilainen A, Malmivaara A, et al. Surgical versus conservative interventions for anterior cruciate ligament ruptures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(2):CD001356.
39. Mae T, Shino K, Maeda A, et al. Effect of gamma irradiation on remodeling process of tendon allograft. *Clin Orthop Relat Res*. Sep 2003(414):305-314.
40. Malinin TI, Levitt RL, Bashore C, et al. A study of retrieved allografts used to replace anterior cruciate ligaments. *Arthroscopy*. Feb 2002;18(2):163-170.
41. Mayr H, Becker R, Willkomm D, et al. Resultate der AGA-Instruktorenfrage 2006 zur Verwendung von Allografts in der intraartikulären Chirurgie. *Arthroskopie*. 2007;3:246.
42. McAllister DR, Joyce MJ, Mann BJ, et al. Allograft update: the current status of tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. *Am J Sports Med*. Dec 2007;35(12):2148-2158.
43. Meuffels DE, Favejee MM, Vissers MM, et al. Ten year follow-up study comparing conservative versus operative treatment of anterior cruciate ligament ruptures. A matched-pair analysis of high level athletes. *Br J Sports Med*. May 2009;43(5):347-351.
44. Murray MM, Martin MM, Martin TL, et al. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *J Bone Joint Surg Am*. 2000;82-A(10):1387-1397.



45. Nikolaou PK, Seaber AV, Glisson RR, et al. Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique. *Am J Sports Med.* Sep-Oct 1986;14(5):348-360.
46. Noyes FR, Barber-Westin SD. Reconstruction of the anterior cruciate ligament with human allograft. Comparison of early and later results. *J Bone Joint Surg Am.* Apr 1996;78(4):524-537.
47. Patel N, Chandratreya A, Radcliffe G, et al. Current ACL practices in the UK: a postal survey of BASK members. Paper presented at: British Association for Surgery of the Knee; 23, 24 March 2007, 2007; Belfast, Northern Ireland.
48. Peterson RK, Shelton WR, Bomboy AL. Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction: A 5-year follow-up. *Arthroscopy.* Jan 2001;17(1):9-13.
49. Prevention CDCA. About tissue transplants. Available at <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/tissueTransplantsFAQ.html>.
50. Prodromos CC, Han Y, Rogowski J, et al. A meta-analysis of the incidence of anterior cruciate ligament tears as a function of gender, sport, and a knee injury-reduction regimen. *Arthroscopy.* Dec 2007;23(12):1320-1325 e1326.
51. Pruss A, Baumann B, Seibold M, et al. Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals.* Jun 2001;29(2):59-66.
52. Pruss A, Kao M, Gohs U, et al. Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals.* Jun 2002;30(2):125-133.
53. Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, et al. Virus safety of avital bone tissue transplants: evaluation of sterilization steps of spongiosa cuboids using a peracetic acid-methanol mixture. *Biologicals.* Sep 1999;27(3):195-201.
54. Rappe M, Horodyski M, Meister K, et al. Nonirradiated versus irradiated Achilles allograft: in vivo failure comparison. *Am J Sports Med.* Oct 2007;35(10):1653-1658.
55. Rasmussen TJ, Feder SM, Butler DL, et al. The effects of 4 Mrad of gamma irradiation on the initial mechanical properties of bone-patellar tendon-bone grafts. *Arthroscopy.* Apr 1994;10(2):188-197.
56. Richter J. personal communication. 2006.
57. Saddemi SR, Frogameni AD, Fenton PJ, et al. Comparison of perioperative morbidity of anterior cruciate ligament autografts versus allografts. *Arthroscopy.* 1993;9(5):519-524.
58. Scheffler S. The cruciate ligaments: anatomy, biology, and biomechanics. In: Bonnin M, Amendola AM, S, Bellemans J, et al., eds. *The Traumatic Knee*: Springer Verlag; 2009.
59. Scheffler S, Fiedler A, Schmidt T, et al. Histologische Untersuchung des Bandremodelings humaner autologer Hamstringsehnen bis zu 10 Jahre nach vorderem Kreuzbandersatz. Paper presented at: 26. AGA Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Arthroskopie; 17.-19. September 2009, 2009; Leipzig, Deutschland.

60. Scheffler SU, Keshlaf S, Smith M, et al. Die Electron Beam Sterilisation führt zum Erhalt signifikant verbesserter biomechanischer Eigenschaften von Weichteiltransplantaten nach Hochdosisbestrahlung (34 kGy) im Vergleich zur herkömmlichen Gamma Bestrahlung. Paper presented at: 25. Jahreskongress der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA); 25.09. - 27.09.2009, 2008; Interlaken, Schweiz.
61. Scheffler SU, Keshlaf S, Smith M, et al. A novel sterilization process based on electron beam radiation does not impair the biomechanical properties of soft tissue allografts. Paper presented at: 13th ESSKA 2000 Congress; May 21-24, 2008, 2008; Porto, Portugal.
62. Scheffler SU, Schmidt T, Gangey I, et al. Fresh-frozen free-tendon allografts versus autografts in anterior cruciate ligament reconstruction: delayed remodeling and inferior mechanical function during long-term healing in sheep. *Arthroscopy*. Apr 2008;24(4):448-458.
63. Scheffler SU, Sudkamp NP, Gockenjan A, et al. 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*. Mar 2002;18(3):304-315.
64. Scheffler SU, Unterhauser FN, Keil J, et al. Comparison of tendon-to-bone-healing after soft-tissue autograft and allograft ACL reconstruction in a sheep model. Paper presented at: 12th ESSKA 2000 Congress; May 24-27, 2006, 2006; Innsbruck, Austria.
65. Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A. Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. Sep 2008;16(9):834-842.
66. Scherzer T. Electron Beam Curing of Methacrylated Gelatin. I. Dependence of the Degree of Crosslinking on the Irradiation Dose. *J Appl Polym Sci*. 1997(63):1303-1312.
67. Schmidt T, Hoburg A, Broziat C, et al. Untersuchung des Einflusses des Electron Beam Sterilisationsverfahrens auf die Revaskularisierung und Biomechanik während des frühen Bandremodeling allogener Kreuzbandtransplantate am Schafsmodell. Paper presented at: 25. Jahreskongress der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA); 25.-27. September 2009, 2009; Leipzig, Deutschland.
68. Shelton WR. Arthroscopic allograft surgery of the knee and shoulder: indications, techniques, and risks. *Arthroscopy*. Dec 2003;19 Suppl 1:67-69.
69. Shino K, Horibe S. Experimental ligament reconstruction by allogeneic tendon graft in a canine model. *Acta Orthop Belg*. 1991;57 Suppl 2:44-53.
70. Shino K, Kawasaki T, Hirose H, et al. Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br*. Nov 1984;66(5):672-681.
71. Sprössig M, Mücke H. Die Virusdesinfektion durch Peressigsäure in Gegenwart von Alkoholen [Virus disinfection with peracetic acid presence of alcohol]. *Wiss. Z. Humboldt-Univ., Math. -Nat. R.* 1969;18:1171-1173.

72. Starke R, Hackensellner HA, von Versen R. [Experimental studies of the sterilization of transplantation material with peracetic acid]. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe*. 1984;17(5):254-258.
73. Suarez LS, Richmond JC. Overview of procurement, processing, and sterilization of soft tissue allografts for sports medicine. *Sports Med Arthrosc*. Sep 2007;15(3):106-113.
74. Sun K, Tian S, Zhang J, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction with BPTB autograft, irradiated versus non-irradiated allograft: a prospective randomized clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. May 2009;17(5):464-474.
75. Tayton E, Verma R, Higgins B, et al. A correlation of time with meniscal tears in anterior cruciate ligament deficiency: stratifying the risk of surgical delay. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. Jan 2009;17(1):30-34.
76. Tohyama H, Yoshikawa T, Ju YJ, et al. Revascularization in the tendon graft following anterior cruciate ligament reconstruction of the knee: its mechanisms and regulation. *Chang Gung Med J*. Mar-Apr 2009;32(2):133-139.
77. Tomita F, Yasuda K, Mikami S, et al. Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. May 2001;17(5):461-476.
78. Vangsness CT, Jr. Soft-tissue allograft processing controversies. *J Knee Surg*. Jul 2006;19(3):215-219.
79. Vangsness CT, Jr., Wagner PP, Moore TM, et al. Overview of safety issues concerning the preparation and processing of soft-tissue allografts. *Arthroscopy*. Dec 2006;22(12):1351-1358.
80. Vangsness Jr C. Overview of allograft soft tissue processing. *Bulletin, AAOS*. 2004:33-36.
81. Vasseur PB, Rodrigo JJ, Stevenson S, et al. Replacement of the anterior cruciate ligament with a bone-ligament-bone anterior cruciate ligament allograft in dogs. *Clin Orthop Relat Res*. Jun 1987(219):268-277.
82. Wallhäuser KH. *Praxis der Sterilisation, Desinfektion und Konservierung*. Vol 5. Ausgabe. Stuttgart: Thieme; 1995:394.
83. Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ, et al. Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy*. Feb 2002;18(2):124-135.
84. Weiler A, Peters G, Maurer J, et al. Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep. *Am J Sports Med*. Nov-Dec 2001;29(6):751-761.
85. Weiler A, Unterhauser FN, Bail H-J, et al. alpha-Smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *Journal of Orthopaedic Research*. 2002;20(2):310-317.

- 86.** Yoshiya S, Nagano M, Kurosaka M, et al. Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res.* Jul 2000(376):278-286.
- 87.** Yusof N. *Radiation in Tissue Banking - Basic Science and Clinical Applications of Irradiated Tissue Allografts.* Singapore: World Scientific Publishing Co. Ptc. Ltd.; 2006.
- 88.** Zantop T, Diermann N, Schumacher T, et al. Anatomical and nonanatomical double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction: importance of femoral tunnel location on knee kinematics. *Am J Sports Med.* Apr 2008;36(4):678-685.

## **Abkürzungsverzeichnis**

AMG:            Arzneimittelgesetz

EBEAM:         Electron Beam

PES:            Peressigsäure-Ethanol Sterilisationsverfahren

TPG:            Transplantationsgesetz

VKB:            Vorderes Kreuzband

## **Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Chef und Lehrer, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. hc. Norbert P. Haas bedanken. Erst seine Führung, Ausbildung und Vorbildfunktion im täglichen klinischen Arbeiten, wie auch im wissenschaftlichen Schaffen, haben mir die Möglichkeit gegeben, die Arbeiten zur Habilitation erfolgreich durchführen zu können.

Ich möchte mich ferner bei Herrn PD Dr. Axel Pruss, Leiter der Gewebebank der Charité Berlin, bedanken, der mich unermüdlich unterstützt hat durch fachlichen Rat und logistische Unterstützung, welche Grundvoraussetzungen waren für das erfolgreiche Durchführen einer Vielzahl der in dieser Habilitation eingeschlossenen Studien.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Andreas Weiler bedanken, der zu einem frühen Zeitpunkt meiner Ausbildung mir ein unabhängiges wissenschaftliches Arbeiten erlaubt hat und in seinem zielorientierten und disziplinierten Arbeiten im wissenschaftlichen und klinischen Bereich ein Vorbild war.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Dipl.-Ing. Georg Duda, Leiter des Julius-Wolff-Instituts, der eine eindrucksvolle Einrichtung der Grundlagenforschung an unserer Klinik erschaffen hat, die mir überhaupt erst die Infrastruktur geboten hat, meine grundlagenwissenschaftlichen Studien durchführen zu können. Ferner möchte ich mich bei ihm für seine Bereitschaft, jederzeit als Ansprechpartner und hochkompetenter Ratgeber zur Verfügung zu stehen, ausdrücklich bedanken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Carsten Perka möchte ich für das Vertrauen danken, dass er mir das selbstverantwortliche klinische und operative Arbeiten gestattet und unterstützt hat, welches Grundvoraussetzung für das Verständnis der relevanten Fragestellungen ist, die erst eine sinnhafte Forschung erlauben.

Mein Dank gilt den ärztlichen Kollegen der Klinik für Unfall-, Wiederherstellungschirurgie und Orthopädie, und hier im Speziellen Dr. med. Arnd Hoberg, Dr. Michael Dahne, Dr. med Stefan Greiner und Dr.med. Frank Unterhauser, die mich tatkräftig in verschiedenen Phasen der Projektdurchführung der verschiedenen Studien unterstützt haben.

Danken möchte ich meinen ehemaligen und aktuellen Doktoranden, ohne deren unermüdliche Arbeit, Unterstützung, Kritik und Zeit diese vorliegenden Arbeiten nicht

im Ansatz möglich gewesen wären. Namentlich sind dies: Dr. med. Moritz Dustmann, (Unfallchirurgie, Klinikum Stuttgart), Insa Gangey (Klinik für Orthopädie, Klinikum Birkenwerda), Dr.med. vet. Judith Keil (Veterinärmedizinerin, private Praxis Berlin), Dr. med. vet. Tanja Schmidt (Julius-Wolff-Institut, Charité Berlin), Tassilo Böhm (Klinik für Unfallchirurgie, Sankt-Gertrauden Krankenhaus Berlin), Dr. med. Johannes Gonnermann (Klinik für HNO, Universität Düsseldorf), Dr. med. Julia Kamp (Klinik für Radiologie, Charité Berlin), Sebastian Metzloff (Klinik für Unfallchirurgie, Martin-Luther Krankenhaus Berlin), Dipl.-Ing. Keshlaf Salahedeen (Technische Universität Berlin), Anja Fiedler (Medizinstudentin, Charité Berlin), Christine Broziat (Medizinstudentin, Charité Berlin)

Ohne die finanzielle Unterstützung der Forschungskommission der Charité, der Forschungstiftung der Musculoskeletal Transplant Foundation, des Deutschen Instituts für Zell- und Gewebeersatzes wäre die Durchführung der Experimente nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich herzlich bedanken

Zuallerletzt mochte ich mich bei meiner Ehefrau, Dr. Maria Apreleva Scheffler, bedanken, die mich in den zeitweise sehr zeitintensiven Abschnitten meiner klinischen und grundlagenwissenschaftlichen Arbeit immer unterstützt und entsprechende Freiräume geschaffen hat, so dass das Nebeneinander von ärztlichem und privatem Leben weitestgehend harmonisch möglich war.

## **Erklärung**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

-----  
Datum

-----  
Unterschrift