

Aus dem Julius Wolff Institut  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Histologische Untersuchung des frühen Remodeling allogener  
Kreuzbandtransplantate nach Sterilisation mit fraktionierter  
Elektronenstrahlung am in-vivo Schafsmodell*

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elsa Dominique Grabau

aus Freital

Datum der Promotion: 06.09.2019

# Vorwort

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden vorab veröffentlicht in:

Schmidt, T., Grabau, D., Grotewohl, J.H., Gohs U, Pruß A, Smith M, Scheffler S, Hoburg A.  
Does sterilization with fractionated electron beam irradiation prevent ACL tendon allograft from tissue damage? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2017) 25: 584. doi:10.1007/s00167-016-4240-9

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abstrakt .....	1
Einleitung .....	3
1.1    Das vordere Kreuzband .....	5
1.1.1    Makroskopische Anatomie .....	5
1.1.2    Mikroskopische Anatomie .....	6
1.1.3    Funktion .....	7
1.2    Kreuzbandverletzung .....	7
1.2.1    Epidemiologie und Verletzungsmechanismus .....	7
1.2.2    Therapie .....	8
1.3    Transplantatauswahl für den VKB Ersatz .....	9
1.3.1    Der allogene Kreuzbandersatz .....	10
1.4    Sterilisationsverfahren .....	11
1.5    Transplantatremodeling .....	14
1.6    Myofibroblasten .....	16
1.7    Revaskularisierung .....	17
1.8    Fragestellung und Hypothese .....	18
2.    Material und Methoden .....	19
2.1    Tiermodell .....	19
2.2    Studiendesign .....	19
2.3    Sterilisation der Transplantate .....	21
2.4    Operatives und postoperatives Vorgehen .....	22
2.4.1    Vorbereitung und Anästhesie .....	22
2.4.2    operativer Verlauf .....	23
2.4.3    postoperatives Vorgehen .....	26

2.5	Gewebeentnahme.....	26
2.6	Histologische Aufarbeitung des Gewebes .....	27
2.7	Färbemethoden .....	28
2.7.1	konventionelle Färbungen .....	28
2.7.2	Immunhistochemische Färbungen.....	29
2.8	Polarisationsmikroskopie.....	32
2.9	Auswertung der Daten .....	33
2.9.1	Zellen (deskriptiv und quantitativ).....	33
2.9.2	Myofibroblasten (deskriptiv und quantitativ) .....	33
2.9.3	Gefäße (deskriptiv und quantitativ).....	33
2.9.4	Kollagencrimp und Kollagenanordnung (deskriptiv und quantitativ) .....	33
2.9.5	Statistische Auswertung .....	34
3.	Ergebnisse .....	35
3.1	Allgemeine Bemerkungen .....	35
3.2	Makroskopische Auswertung .....	35
3.3	Deskriptive Auswertung Hämatoxylin-Eosin und Masson Goldner Färbung.....	36
3.3.1	Native Strukturen .....	36
3.3.2	Fresh Frozen Allografts.....	37
3.3.3	Fraktioniert Ebeam bestrahlte Allografts .....	38
3.3.4	Zusammenfassender Vergleich aller Gruppen .....	39
3.4	Immunhistologische Auswertung .....	39
3.4.1	$\alpha$ SMA- Immunhistologie – Zellzahl, Myofibroblasten.....	39
3.4.2	Faktor VIII Immunhistologie – Gefäßdichte.....	45
3.5	Polarisationsmikroskopie.....	47
3.5.1	Deskriptive Auswertung .....	47
3.5.2	Auswertung Kollagencrimp .....	49
4.	Diskussion .....	51

4.1	Remodeling.....	51
4.1.1	Revaskularisierung .....	53
4.1.2	Myofibroblasten und Kollagencrimp .....	54
4.2	Ergebnisse der Arbeitsgruppe im Zusammenhang.....	56
4.3	Limitationen der Studie .....	57
4.4	Schlussfolgerung und klinische Bedeutung.....	58
5.	Literaturverzeichnis.....	59
6.	Anhang .....	69
6.1.	Abbildungsverzeichnis .....	69
6.2.	Tabellenverzeichnis .....	69
6.3.	Geräte und Materialien .....	70
7.	Eidesstattliche Versicherung .....	73
7.1.	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	74
8.	Lebenslauf .....	75
9.	Publikationsliste .....	77
10.	Danksagung.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\alpha$ -SMA	Alpha Smooth muscle Actin
$\mu$ m	Mikrometer
AATB	American Association of Tissue Banks
AB-Komplex	Avidin- Biotin Komplex
ACL	anterior cruciate ligament
AP	Alkalische Phosphatase
BPTB	bone-patellar-tendon-bone
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ebeam	Elektronenstrahlung
EZM	Extrazellulärmatrix
fEbeam	fraktionierte Elektronenstrahlung
FFA	Fresh frozen Allograft
FSN	Flexorsehne
FVIII	Faktor VIII
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
kGy	Kilo Gray

kg	Kilogramm
l/min	Liter pro Minute
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
min	Minute
MeV	Megaelektronenvolt
MG-Färbung	Masson Goldner Färbung
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mg	Milligramm
MRT	Magnetresonanztomographie
HCl	Salzsäure
N. tibialis	Nervus tibialis
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
sek	Sekunden
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VKB	vorderes Kreuzband
VKBn	natives vorderes Kreuzband
WHO	World Health Organisation

## **Abstrakt**

Allografts werden besonders im angloamerikanischen Raum, eingeschränkt auch in Europa und Asien für den primären und Revisionsersatz des vorderen Kreuzbandes verwendet. Problematisch ist jedoch das, wenn auch geringe, Risiko der Krankheitsübertragung durch das Spendergewebe. Daher ist ein geeignetes Sterilisationsverfahren wünschenswert, welches eine terminale Sterilisation gewährleistet, jedoch ohne Einfluss auf die biomechanischen und biologischen Eigenschaften des Spendergewebes zu nehmen. Die Sterilisation von Allografts mit fraktionierter Elektronenstrahlung (fEbeam) gewährleistet eine ausreichende Keimreduktion und zeigt in-vitro eine geringe Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften im Vergleich zu fresh frozen Allografts (FFA). Das Heilungsverhalten fEbeam sterilisierter Sehnen wurde bisher noch nicht am in-vivo Modell untersucht. Ziel dieser Studie war es daher, das frühe biologische Remodeling von VKB Transplantaten, die mit fEbeam behandelt wurden mit nicht sterilisierten FFA am in-vivo Schafsmodell zu vergleichen.

Dazu erfolgte bei 18 Merino-Mix Schafen der vordere Kreuzbandersatz. 16 Schafe erhielten ein Transplantat nach fEbeam Sterilisation (8x3,4kGy) und zwei Tiere mit einem FFA. Für die FFA-Kontrollgruppe wurden Ergebnisse aus einer Vorläuferstudie mit identischem operativem Vorgehen und histologischer Analyse hinzugezogen. Außerdem dienten native Flexorsehnen und vordere Kreuzbänder (VKB) als Kontrollen. Jeweils acht Tiere wurden nach sechs und zwölf Wochen Standzeit getötet. Es erfolgte die histologische Auswertung der intraartikulären Kreuzbandabschnitte zur deskriptiven Analyse, Bestimmung der Gefäß- und Myofibroblastendichte sowie des Kollagencrimps.

Die fEbeam sowie FFA Transplantate zeigten eine signifikante Zunahme der Gesamtzellzahl von 6 nach 12 Wochen. Die Zellzahl der fEbeam verdoppelte sich nach 12 Wochen im Vergleich zu den FFA. Die Gefäßdichte der fEbeam war nach 12 Wochen signifikant niedriger als in den FFA. Die Myofibroblastenanzahl nahm bei den FFA von 6 nach 12 Wochen signifikant zu. Der Kollagencripp der fEbeam ist zum 12 Wochen Zeitpunkten signifikant kleiner als der der FFA. Zusammenfassend beeinträchtigt die Sterilisation von Allografts mit fraktionierter Elektronenstrahlung das frühe Sehnenremodeling nach vorderem Kreuzbandersatz im in-vivo Schafsmodell. Aufgrund dieser Studienergebnisse und der in einer weiteren Studie festgestellten Beeinträchtigung der mechanischen Funktion von fEbeam behandelten Kreuzbandtransplantaten, kann diese Methode nicht für den klinischen Alltag empfohlen werden.



## Abstract

Allografts are frequently used for anterior cruciate ligament (ACL) reconstructions especially in the Anglo-American region, there is also limited use in Europe or Asia. Even though the risk of disease transmission from the donated tissue is low, a proper graft sterilization method is desirable. This method should provide terminal sterilization without impairing biomechanical properties and graft healing of the tissue. Fractionation of electron beam (fEbeam) showed sufficient sterilization of graft tissue without impairing biomechanical properties in-vitro compared to fresh frozen allografts (FFA). So far no data exist on the in-vivo graft healing behavior after fEbeam sterilization. Therefore, the aim of this study was to evaluate the early remodeling of fEbeam processed grafts in comparison to unsterilized FFA in an in-vivo sheep model.

ACL reconstruction was performed in 18 female merino mix sheep. Sixteen received reconstruction with fEbeam irradiated grafts (8x3,4 kGy) and two with a FFA. Data from a previous study on FFA using the identical animal model, surgical reconstruction technique and histological analysis served as controls. Half of the animals were sacrificed after six and twelve weeks. Descriptive analysis, cell count, myofibroblasts, vessel density and crimp pattern were assessed.

fEbeam and FFA showed a significant increase in cell count from six to twelve weeks. Cell count of fEbeam was nearly twofold more than in FFA at twelve weeks. Vessel density at twelve weeks was significantly decreased in fEbeam compared to FFA. FFA showed a significant increase of myofibroblast density from six to twelve weeks. Crimp length was significant shorter at twelve weeks in fEbeam compared to FFA.

In conclusion, fEbeam sterilization of allografts used for ACL reconstruction significantly alters the early remodeling of soft tissue grafts in-vivo. Based on these results and the impairment of the biomechanical properties of fEbeam processed ACL grafts, found in a previous study, this method cannot be recommended for clinical practice.

## Einleitung

Das vordere Kreuzband ist die am häufigsten verletzte ligamentäre Struktur des Kniegelenkes. Sportler, die so genannte Risikosportarten betreiben (unter anderem Fußball, Tennis, Handball, Alpin Ski) sind besonders betroffen.

Aufgrund der schlechten Selbstheilungstendenz der Kreuzbänder ist in den meisten Fällen zur Wiederherstellung der Kniestabilität eine operative Versorgung indiziert. Zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes wird in Deutschland aktuell vor allem körpereigenes Sehnenmaterial verwendet. Bei Revisionseingriffen oder Multiligamentverletzungen bietet Sehnenmaterial von humanen Spendern, sogenannte Allografts eine sinnvolle Alternative. Hierzulande ist die Bedeutung von allogenen Transplantaten in der operativen Versorgung von Kreuzbandverletzungen gering. Grund hierfür ist die begrenzte Verfügbarkeit sowie die rechtlichen nationalen Vorgaben, die in Deutschland zwingend die Sterilisation bei Herstellung einer Spendersehne erfordern. In den USA ist die Verwendung von allogenen Transplantaten in der traumatologischen und in der orthopädischen Chirurgie jedoch ein Standardverfahren.

Zur Erhöhung der Patientensicherheit, insbesondere zur Risikominimierung der Krankheitsübertragung durch das Sehngewebe, wurden über Jahre zahlreiche Untersuchungen durchgeführt um ein geeignetes Sterilisationsverfahren zu finden. Es wurden unter anderem chemischen Sterilisationsverfahren mit Ethylenoxid oder Peressigsäure sowie Gammastrahlung oder Elektronenstrahlung erprobt [2-5]. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl chemische Sterilisationsverfahren als auch die Bestrahlungsverfahren mit einer Beeinträchtigung der histologischen und biomechanischen Eigenschaften der Spendersehnen in der Kreuzbandchirurgie verbunden sind [4-6].

Durch die Bestrahlung des Sehngewebes kommt es neben den gewünschten Effekten zur Eliminierung der Virus- und Bakterienlast auch zur Beeinträchtigung der Tertiärstruktur des Kollagens und damit zur Verminderung der biomechanischen Belastbarkeit der Sehne [3, 7]. Diese Effekte sind dosisabhängig und treten sowohl bei Gamma- als auch bei Elektronenstrahlung auf [3]. In der klinischen Praxis kann dies zu einer erhöhten Re-Rupturrate der allogenen Kreuzbandtransplantate führen.

Bei der Anwendung von Elektronenstrahlung zur Sterilisation von Sehngewebe wird auf Grund der akkurat möglichen Applikation eine geringere Dosisabweichung sowie Reduktion der Bestrahlungszeit im Vergleich zu Gammastrahlung erreicht [8]. Dennoch hat auch die Elektronenstrahlung negative Auswirkung auf das Remodeling sowie die biomechanische Belastbarkeit von allogenen Kreuzbandtransplantaten [4]. Bei einer Aufteilung der Bestrahlungsdosis auf mehrere Einzelgaben, also eine Fraktionierung der Bestrahlung, vermutet man eine Verminderung der Radikalbildung. Dadurch soll die Kollagenstruktur der Sehnen transplantate geschont und so die biomechanische Belastbarkeit weniger beeinflusst werden. Dies konnte in in-vitro Untersuchungen bestätigt werden [9, 10]. Eine terminale Sterilisation ist trotz Fraktionierung der Strahlung gewährleistet [11]. Dieses Verfahren findet auch Anwendung im Bereich der Onkologie und hat dort zu einer reduzierten Sekundärschädigung von gesundem Gewebe in der Strahlentherapie geführt [12].

Die Sehnen transplantate nach vorderem Kreuzbandersatz unterliegen Umbauprozessen, die das Transplantat dem nativen Kreuzband angleichen [13]. Da sich bereits gezeigt hat, dass das Remodeling durch die Bestrahlung mit Elektronenstrahlung beeinflusst wird, sind vielversprechende in-vitro Ergebnisse nicht ausreichend um eine Aussage über die klinische Anwendbarkeit des Verfahrens zu treffen. Ergänzend sind in-vivo Untersuchungen notwendig um die Auswirkung der fraktionierten Elektronenstrahlung auf den Remodelingprozess der Sehnen transplantate sowie die biomechanischen Eigenschaften zu beurteilen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher, den Effekt von fraktionierter Elektronenbestrahlung auf das histologische Remodeling allogener Kreuzbandtransplantate in einem in-vivo Schafsmodell zu untersuchen.

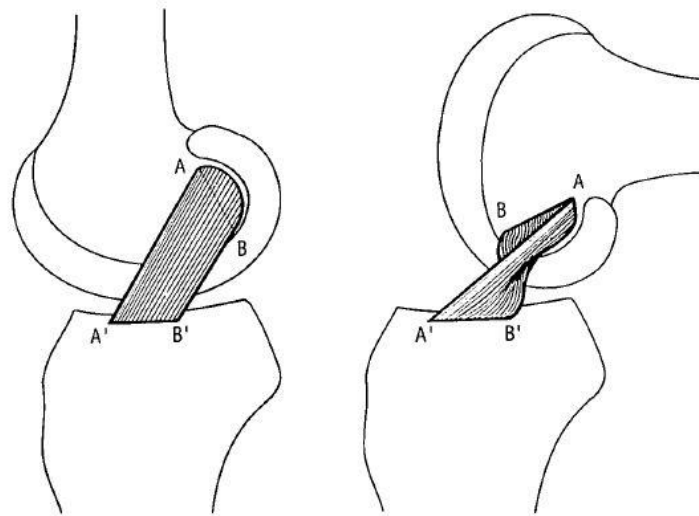
## 1.1 Das vordere Kreuzband

### 1.1.1 Makroskopische Anatomie

Die Kreuzbänder gehören zu den Kniebinnenstrukturen und haben eine wichtige Funktion für die Stabilisierung des Kniegelenkes. Sie befinden sich intraartikulär, also innerhalb der Gelenkkapsel, aber extrasynovial, da sie zum Teil von Synovialzellen bedeckt sind. Genauer wird das vordere Kreuzband nur vorn und seitlich von Synovialis bedeckt [14].

Das vordere Kreuzband hat seinen Ursprung posteromedial des lateralen Femurkondylus [1, 15]. Dort entspringt es halbmondartig von einer Fläche mit 18 mm Längsdurchmesser und 11 mm Querdurchmesser [1]. Von der lateralen Femurkondyle verläuft das vordere Kreuzband (VKB) nach distal vorn und inseriert medial in der Fossa intercondylaris der Tibia [1, 14]. Die Form der tibialen Insertionszone variiert, hat allerdings eine größere Fläche als die Ursprungsstelle mit ca. 30 mm anteriorposteriorer Ausdehnung und ca. 11 mm Breite [1]. Das VKB ist durchschnittlich ungefähr 35 mm lang [1, 16]. Makroskopisch werden zwei funktionell verschiedene Faserbündel unterschieden - das anteromediale und das posterolaterale Bündel. Die Klassifizierung erfolgt ausgehend von der tibialen Insertionszone [15]. Bei Extension im Kniegelenk ist der Faserverlauf des VKB nahezu parallel [15, 17]. Mit zunehmender Flexionsbewegung kommt es zu einer leichten Rotation der Faserbündel um die longitudinale Achse (siehe auch Abbildung 1) [15, 17].

Die Blutversorgung erfolgt über einen Ast der Arteria poplitea. Dieser bildet ein Gefäßnetz in der Synovialis, von da aus ziehen die Gefäße in Septen aus lockerem Bindegewebe in das VKB [17]. Die Gefäßversorgung des vorderen Kreuzbandes ist ungleichmäßig, so befinden sich im Bereich der Insertion kaum Gefäße [14, 17]. Die Innervation erfolgt über posteriore Anteile des N.tibialis [17].



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Rotation des vorderen Kreuzbandes in der Längsachse bei zunehmender Flexion (aus Girgis et al. [1])

### 1.1.2 Mikroskopische Anatomie

Das vordere Kreuzband besteht aus straffem Bindegewebe [18]. Die makroskopische Unterscheidung in ein anteromediales und posterolaterales Bündel kann histologisch nicht getroffen werden [14]. Der Übergang vom vorderem Kreuzband in den Knochen wird als chondrale apophysäre Insertion bezeichnet [18]. Dort findet sich auch das knorpeltypische Kollagen II [17]. Im anterior tibialen Bereich kommt es nahe der Insertionsstelle zum Impingement zwischen dem VKB und Knochen. Dort wird das VKB statt mit Synovia von dichtem Bindegewebe bedeckt [17, 18]. Zudem finden sich histologisch zwischen den Kollagenfaserbündeln Chondrozyten. Die Bandstruktur in diesem Bereich ähnelt Faserknorpel als Anpassung an die hohe Druck- und Schubbeanspruchung [14, 17, 18].

Die Kollagenmatrix macht dreiviertel des Trockengewichtes des VKB aus und besteht zu 90 % aus Typ I Kollagen und zu 10 % aus Typ III [19]. Die restlichen Bestandteile sind Fibroblasten/Fibrozyten, Chondroblasten, Elastin und Proteoglykane [19]. Die Kollagenfibrillen werden durch lockeres Bindegewebe in Kollagenbündel unterteilt. Diese haben durchschnittlich einen Durchmesser zwischen 70 und 150  $\mu\text{m}$  [18]. Diese orientieren sich parallel zur longitudinalen Achse des VKB [18, 20]. Die Kollagenfasern zeigen eine leichte sinusförmige Wellenstruktur, auch als Crimp bezeichnet [20]. Damit wird eine leichte Elastizität des Kollagens ermöglicht, welches eine gewisse Längenänderung toleriert, ohne dass permanente

Schäden der Kollagenstruktur auftreten [17]. Fibroblasten mit einem eher ovoiden Zellkern und die inaktiven Fibroblasten bezeichnet als Fibrozyten bilden den Hauptanteil der zellulären Bestandteile [17, 21]. Sie besitzen ein geringes Proliferationspotenzial [21]. Myofibroblasten – spezialisierte Fibroblasten mit kontraktile Eigenschaften wurden ebenfalls im VKB nachgewiesen [20]. Auf diese wird im Kapitel 1.6 näher eingegangen. Fibrozyten sind über zahlreiche Ausläufer mit Hilfe von Gap junctions miteinander verbunden und bilden ein ausgeprägtes Informationssystem [21]. Auch das Vorkommen zahlreicher Mechanorezeptoren (Ruffini-Körperchen, Vater-Pacini-Körperchen) sowie freie Nervenenden wird beschrieben [17].

### **1.1.3 Funktion**

Die Kreuzbänder haben eine große Bedeutung für die Kniestabilität. Das VKB verhindert die Translationsbewegung zwischen Femur und Tibia nach anterior, am effektivsten zwischen 20° und 30° Flexion sowie limitiert die Innenrotationsbewegung des Unterschenkels [14]. Die zuvor beschriebenen makroskopisch unterscheidbaren Bündel des VKB sind in verschiedenen Gelenkstellungen gespannt. Das anteromediale Bündel ist bei 90° Flexion vollständig angespannt, das posterolaterale hingegen beim Erreichen der vollen Extension [19].

Die Mechanorezeptoren im VKB sind wichtig für die Propriozeption und damit die Kinematik des Kniegelenkes [14, 19]. Sie bilden den afferenten Strang für ein Feedback System zwischen VKB und der ischiokruralen Muskulatur. So ergab eine Untersuchung von Tsuda et al., dass bei einer Stimulation des VKB mit elektrischen Impulsen ein Anstieg der Aktivität in dieser Muskelgruppe erreicht wird [22]. Eine übermäßige Dehnung des VKB führt zu einer Aktivierung der ischiokruralen Muskulatur, die nun den Unterschenkel wieder zentriert und gleichzeitig die Spannung des VKB reduziert, dies wird als Schutzreflex des vorderen Kreuzbandes beschrieben [14, 23]. Eine Anspannung des Musculus quadriceps hingegen erhöht die Spannung im vorderen Kreuzband erheblich [14].

## **1.2 Kreuzbandverletzung**

### **1.2.1 Epidemiologie und Verletzungsmechanismus**

Die Verletzung des Kreuzbandes gehört zu den häufigsten Verletzungen der unteren Extremität, insbesondere im Rahmen von sportlicher Tätigkeit [24, 25]. So kommt es in Deutschland pro Jahr zu ca. 35.000 VKB Rupturen [26]. Laut epidemiologischen Untersuchungen beträgt das Risiko der vorderen Kreuzbandruptur bei sportlich Aktiven zwischen 36,9 und 60,9 pro 100.000 Personen [27, 28]. Die Inzidenz ist insbesondere bei Teenagern oder jungen Erwachsenen erhöht [26, 29]. Studien haben außerdem gezeigt, dass das Risiko eines Kreuzbandrisses für

Frauen bei der gleichen Sportart mit gleichem Aktivitätslevel im Vergleich zu Männern vier bis sechs fach erhöht ist [30, 31]. Als Risikosportarten werden unter anderem Fußball, Handball, Basketball, Alpinski und Tennis bezeichnet [25, 31, 32].

Zu Verletzungen des VKB kommt es am häufigsten ohne Fremdkontakt, nach Landung von einem Sprung oder Abstoppbewegungen mit Richtungswechsel [33, 34]. In einer Videostudie konnte gezeigt werden, dass sich das Kniegelenk hierbei in nahezu voller Extension sowie Valgusstellung bei tibialer Innen- oder Außenrotation befindet [33-35].

Kreuzbandverletzungen sind häufig auch mit Verletzungen weiterer Kniebinnenstrukturen assoziiert, insbesondere einer medialen Meniskusläsion [25, 36].

### **1.2.2 Therapie**

Die Verletzung des vorderen Kreuzbandes führt häufig zur Instabilität im Kniegelenk und damit zur Einschränkung von sportlicher Aktivität sowie dem früheren Auftreten von degenerativen Veränderungen im Kniegelenk [36, 37]. Die Diagnose erfolgt nach klinischer Untersuchung (Lachmann und Pivot shift Test) und wird schließlich im MRT bestätigt oder gegebenenfalls widerlegt. In den USA unterziehen sich ca 90 % der Patienten mit VKB Verletzung einer operativen Rekonstruktion [38]. Der Entschluss, ob eine operative Therapie erfolgen sollte, muss individuell insbesondere in Abhängigkeit vom Alter, dem angestrebten Aktivitätslevel sowie der bestehenden Knieinstabilität getroffen werden [37].

1903 erfolgte die erste Publikation zur Rekonstruktion des VKB von Robson. In dieser beschrieb er die Methode der direkten Kreuzbandnaht indem er die distalen Stumpfanteile mit den verbliebenen proximalen Anteilen sowie der Synovia vernähte [39]. Daraufhin folgende Studien zeigten, dass diese Versorgung häufig insuffizient ist [40, 41]. Hey Groves publizierte erstmals 1917 den VKB Ersatz mittels Sehnen transplantaten [40, 42]. Damals wurde die Fascia lata oder die Sehne des Musculus gracilis als Sehnen transplantat verwendet [42]. Es folgten weitere Publikationen mit Sehnen transplantaten aus der Quadricepssehne [40]. Bereits 1980 erfolgte der erste Kreuzbandersatz in der arthroskopischen Technik, seitdem hat sich diese stetig weiter entwickelt und verbessert [43].

Die Rekonstruktion des VKB mit Sehnen transplantaten hat sich als gute Option erwiesen, um das vorher bestandene Aktivitätslevel zu erreichen und eine suffiziente Kniestabilität wiederherzustellen [44]. In biomechanischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede in der

Kinematik der unteren Extremität mit rekonstruiertem VKB im Vergleich zur gesunden Seite festgestellt werden [37].

Bei einer vorderen Kreuzbandruptur ist der operative Ersatz, zur Wiederherstellung der Kniestabilität, die Therapie der ersten Wahl. Entscheidend für den Erfolg der Rekonstruktion ist die anatomische Platzierung des Kreuzbandersatzes bei Anlage der tibialen sowie femoralen Bohrkanäle und damit die Verhinderung von Impingement sowie die suffiziente Transplantatheilung [13, 45]. Dies gilt als Voraussetzung dafür, dass nach erfolgter Rekonstruktion die vorherige Funktion, Beweglichkeit und Belastbarkeit wiederhergestellt werden kann [37]. Trotz stetiger Verbesserung der Operationsverfahren wird eine Fehlerrate von ca. 5% beschrieben [44].

### **1.3 Transplantatauswahl für den VKB Ersatz**

Optionen für den operativen vorderen Kreuzbandersatz bieten neben körpereigenen Sehnen (Autografts) auch körperfremdes Sehnenmaterial (Allografts).

Die amerikanische Vereinigung von Gewebebanken verzeichnet einen steigenden Bedarf an allogenen Transplantaten im Bereich des muskuloskelettalen Systems [46]. Entsprechend einer deskriptiven Studie zur Transplantatwahl in Deutschland werden primär autologe Transplantate verwendet [47]. Allen voran die Semitendinosus und Gracilis Sehne (auch bezeichnet als Hamstrings oder ischiokrurale Muskulatur) gefolgt von der Patellarsehne und erst an vierter Stelle die Allografts [47]. Die Sehnentransplantate kann man weiterhin in freie und knochenblocktragende Transplantate unterteilen. So handelt es sich bei den Hamstring Sehnen um freie Sehnentransplantate, die meist in Quadrupeltechnik implantiert werden. Das Transplantat hat eine ähnliche Stärke wie ein natives Kreuzband und ist leicht zu explantieren [37]. Es gibt jedoch Einschränkungen beim Transplantatremodeling auf Grund der Sehnen-Knochen Einheilung [37, 48]. Zudem kommt es zur Kraftreduktion der ischiokruralen Muskulatur [37, 49-51].

Die Patellarsehne wird mit Knochenblöcken verwendet, daher auch als bone-patellar-tendon-bone (BPTB) Transplantat bezeichnet. Dies ermöglicht eine bessere Transplantateinheilung, da sie den nativen Kreuzbandinsertionen ähneln [14, 37]. Bei der Entnahme besteht das Risiko der Fraktur der Kniescheibe, zudem tritt häufiger ein vorderer Knieschmerz auf [37].

Mehrere Studien haben die klinischen Ergebnisse nach einer VKB Rekonstruktion mit Allografts beziehungsweise Autografts untersucht. Laut Carey et al. zeigen sich keine signifikanten



Unterschiede bei frühen Nachuntersuchungen nach VKB Plastik mit Allografts im Hinblick auf die klinische Untersuchung (Lachman und Pivot Shift Test) sowie Bewegungsumfang und Belastung bei Bewegung [52]. Dies wurde auch in einer Meta Analyse von Zeng et al. gezeigt [53]. Studien mit einem längerem Untersuchungszeitraum bis hin zu 2 Jahren beschreiben allerdings eine erhöhte Re-Rupturrate der allogenen Sehnentransplantate besonders bei jungen aktiven Patienten mit nachfolgender Notwendigkeit eines Revisionseingriffs [54-56].

Rein vom funktionellen Aspekt nach erfolgreicher Rekonstruktion mit Allografts unterscheiden sich die Ergebnisse im Vergleich zu Autografts nicht [55].

### **1.3.1 Der allogene Kreuzbandersatz**

Laut statistischen Untersuchungen in den USA nimmt die Anzahl an verwendeten Allografts für die VKB Plastik stetig zu. So stieg der Anteil von 17,4% 2002 auf 45,8% im Jahre 2008 [57]. Ähnliche statistische Daten zur Verwendung in Deutschland existieren nicht.

Spezielle Indikationen für die Verwendung von Allografts stellen der Kreuzbandersatz bei Multiligamentverletzungen, die Revisionschirurgie, oder ein Patientenalter über 50 Jahre dar [58, 59]. Vorteil hierbei sind eine reduzierte Entnahmemorbidität, eine kürzere Operationszeit sowie kosmetische Aspekte [59, 60]. Allerdings verläuft die Transplantatheilung langsamer [60-62]. Dies spielt vermutlich eine Rolle beim Versagen der allogenen Kreuzbandplastik besonders bei jungen, sportlich aktiven Personen. Zudem besteht die Möglichkeit der Immunreaktion bei der Implantation von körperfremden Material, sowie das Risiko der Krankheitsübertragung [60, 61]. Dies führt zu Bedenken bei dem Einsatz von allogenen Transplantaten, nicht nur in der Kreuzbandchirurgie.

Laut Daten aus dem Jahr 2002 wurden bei ca. 900.000 implantierten Allografts lediglich 2 bakterielle Infektionen gemeldet [59]. Fälle einer HIV Infektionen im Zusammenhang mit Sehnentransplantationen sind seit 1995 nicht bekannt geworden [59]. Allerdings ist eine Meldung Allograft assoziierter Infektionen an die WHO oder die American Association of Tissue Banks (AATB) nicht zwingend erforderlich. Daher existieren keine absoluten Daten zum Risiko der Übertragung von HIV, Hepatitis B oder C [59].

Das Risiko der Krankheitsübertragung wird reduziert durch Risikoeinschätzung der Spender, serologische Tests, etablierte Desinfektions- und Sterilisationsprotokolle [59, 63, 64]. Von der AATB wurden hierzu Leitlinien entwickelt (AATB 13th Edition Standards for Tissue Banking).

Folgendes Procedere wird aktuell von der AATB gefordert: Aseptische Transplantatgewinnung, Waschung in Antibiotikallösungen, niedrigdosierte Gamma Bestrahlung sowie Spenderscreening.

In einer klinischen Studie von Greenberg et al. konnte kein erhöhtes Risiko für klinisch relevante Infektionen von Allografts im Vergleich zu Autografts festgestellt werden [65]. Die verwendeten allogenen Transplantate kamen aus einer AATB akkreditierten Gewebekbank [65]. Dennoch bleibt die Anwendung nicht terminal sterilisierter Sehnen in Deutschland sowie in Europa deutlich eingeschränkt und reglementiert. Die Grundlage hierfür bildet die Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlamentes und Rates mit der „Festlegung von Sicherheits- und Qualitätsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen“ sowie der Richtlinie 2006/17/EG. Festgelegt wurden unter anderem die Abläufe zum Spenderscreening, Rückverfolgungsverfahren sowie Organisation in Gewebekbanken, aber keine Protokolle zur Sterilisation [66].

#### **1.4 Sterilisationsverfahren**

Ein geeignetes Sterilisationsverfahren für Sehnen-transplantate ist notwendig um das Infektionsrisiko für den Empfänger mit viralen oder bakteriellen Erregern zu reduzieren [60, 67]. Mehrere Sterilisationsverfahren zeigen eine effektive Reduktion von Mikroorganismen. Generell unterscheidet man zwei Gruppen - chemische Sterilisationsmethoden und Bestrahlung. Dabei ist bei jedem Verfahren der Einfluss auf das zu sterilisierende Gewebe zu beachten, dies kann zu einer verstärkten Absorptionsrate in-vivo und damit schlechterer Transplantatheilung führen [67].

Behandlung des Gewebes mit antiseptischen Lösungen, wie Alkohol oder Antibiotika haben eine geringe Penetrationstiefe. Viren oder Bakterien werden somit nicht komplett entfernt [60].

##### *Chemische Sterilisationsverfahren*

Zu den chemischen Substanzen für die Sterilisation gehören Ethylenoxid und Peressigsäure. Bei beiden Substanzen zeigt sich eine suffiziente Sterilisation von Gewebe [2]. Zunächst fand diese Art der Sterilisation eine breite Anwendung in den Gewebekbanken der USA [60]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass es zur Beeinträchtigung der Kollagenstruktur und der elastischen Eigenschaften kommen kann. Dies entsteht durch das Auftreten von Kollagenkettenbrüche und eine Veränderung der Sekundärstruktur [67].

Klinische Studien haben außerdem gezeigt, dass mit Ethylenoxid sterilisierte Allografts als VKB Plastik zu intraartikulären Reaktionen führen können [59, 60]. Klinisch äußert sich dies mit anhaltender Synovialitis und Kniegelenkserguss [68]. Nach Resektion des Allografts kam es in den meisten Fällen zu einer Rückbildung der Synovialitis, so dass von einem direkten Zusammenhang mit der Sterilisationsmethode ausgegangen wird [68]. Ähnliche Komplikationen stellte man nach der Verwendung mit Peressigsäure sterilisierten Transplantaten fest [69]. In einer in-vivo Studie von Scheffler et al. am Schafsmodell zeigte sich eine Verzögerung des Remodelings sowie schlechtere biomechanische Eigenschaften im Vergleich zu nicht sterilisierten Allografts [5]. So dass diese den VKB Ersatz mit Peressigsäure sterilisierten Sehnen für die klinische Anwendung nicht empfehlen [5].

#### *Bestrahlung: Gammastrahlung, Elektronenstrahlung*

Die Sterilisation mit Bestrahlung wird schon längere Zeit für Medizinprodukte angewendet [70]. Angriffspunkt der Bestrahlung sind Nukleinsäuren der DNA und RNA [3]. Dabei entstehende Einzel- und Doppelstrangbrüche beeinflussen die DNA - sowie Proteinsynthese und verhindern so die Reproduktion von Bakterien und Viren [3, 60].

Unterschieden werden direkte und indirekte Wirkungen der Bestrahlung. Durch die Radiolyse von Wasser entstehen Hydroxylradikale, die ebenfalls zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen und damit den Effekt der direkten Strahlenwirkung verstärken [3]. Zudem geht man davon aus, dass in sauerstoffreicher Umgebung die Radikalbildung stärker erfolgt und somit die Wirkung der Bestrahlung zusätzlich verstärkt wird. Diese Prozesse führen nicht nur zur Eliminierung von Keimen, sondern auch zu einer Beeinträchtigung des Sehngewebes. In diesem Fall kommt es vor allem zur Auflösung der Kollagenquervernetzung, der Tertiärstruktur sowie zur Fragmentation des Kollagens [3, 64, 67]. Dies führt zur Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften [7, 67]. Diese negative Wirkung der Bestrahlung ist Dosis assoziiert – je höher die applizierte Strahlung desto stärker die Beeinträchtigung [64, 67].

Untersuchungen von Dziedzic-Goclawska an unter sterilen Bedingungen entnommenem Sehngewebe zeigten, dass bei einer *Gammabestrahlung* mit 25 kGy eine signifikante Reduktion der Gesamtkeimzahl erfolgt [3]. Problematisch ist jedoch die Inaktivierung des relativ strahlenresistenten HI-Virus. Pruss *et al.* zeigten, dass für eine ausreichende Inaktivierung in allogenen Knochen 34 kGy bei -30°C (+- 5 °C) notwendig sind [71]. Ähnliche Ergebnisse ergab die Untersuchung von Fideler an allogenen Patellarsehnen [70]. Hier waren Dosen von 30-

40 kGy notwendig [70]. Mehrere Studien zeigten jedoch eine Beeinträchtigung der mechanischen Belastbarkeit ab einer Dosis von 20-25 kGy [6, 72].

Insgesamt stellt die Wahl der Bestrahlungsdosis einen Kompromiss zwischen der Reduktion der Bakterien/Viren auf das möglichst niedrigste Niveau und einer Minimierung der Beeinträchtigung der strukturellen Eigenschaften des Gewebes dar [3].

In den Gewebebanken der USA wird eine niedrig dosierte Gammabestrahlung (18-21 kGy) angewendet, ausreichend für die Reduktion der bakteriellen Keimbelastung, aber nicht wirksam gegen strahlenresistente Viren [10]. Die Gammastrahlung ist zurzeit das Standardverfahren zur Sterilisation von Gewebe auf Grund der Verfügbarkeit, geringer Kosten sowie langjähriger Erfahrung in der Anwendung [9]. Gammastrahlung zeigt eine gute Penetration des Gewebes. Bei Wasser und beidseitiger Bestrahlung wurde eine Eindringtiefe von 30 cm gemessen [3]. Letztendlich ist dies jedoch abhängig von der Dichte des zu bestrahlenden Gewebes. Zur Sterilisation von Gewebe in gefrorenem Zustand wird bei gleicher Dicke eine höhere Strahlendosis benötigt [60].

*Elektronenstrahlung* (Ebeam) wird in der Sterilisation von medizinischen Produkten sowie in der Strahlentherapie angewendet [73]. Die Effektivität ist vergleichbar mit Gammastrahlung und so auch die direkte sowie indirekte Wirkung der Strahlung auf das Gewebe [3]. Die Eindringtiefe der Strahlung ist abhängig von der Energie. Bei 10 MeV und beidseitiger Bestrahlung beträgt diese 8 cm [3]. Eine akkurate Dosisapplikation im Gewebe sowie geringe Dosisabweichung führt zu einer Verringerung der Bestrahlungszeit [8, 10]. In-vitro Untersuchungen der biomechanischen Eigenschaften zum Zeitpunkt null nach Bestrahlung von humanen BPTB-Transplantaten mit 25 und 34 kGy Ebeam zeigten im Vergleich zu Gamma Strahlung positive Ergebnisse [72, 74]. So zeigten sich signifikant höhere Steifigkeiten nach Bestrahlung mit 25 und 34 kGy sowie signifikant höhere Versagenslasten nach 25 kGy Ebeam Bestrahlung im Vergleich zu Gammastrahlung [72, 74]. Eine weitere in-vitro Untersuchung mit BPTB-Sehnentransplantaten ergab lediglich bei einer Ebeam Bestrahlung mit 34kGy eine signifikante Beeinträchtigung der Versagenslast im Vergleich zu nicht sterilisierten Kontrollen [74]. Eine Untersuchung am in-vivo Schafsmodell zeigte im Heilungsverlauf der Sehnentransplantate einen deutlichen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften mit geringeren Versagenslasten sowie gesteigerten Remodeling nach Sterilisation mit 34 kGy Ebeam [4].

### *Bestrahlungsfractionierung*

Es ist bekannt, dass die Elektronenstrahlung sowie die Gammastrahlung über direkte und indirekte Strahleneffekte neben der Sterilisation auch zu einer Beeinträchtigung der Ultrastruktur des Sehnenmaterials führt [3]. Dabei entstehen Doppelstrangbrüche in der Kollagenquervernetzung durch die Bildung von Radikalen. Diese führen zu einer Reduktion der biomechanischen Belastbarkeit. Man nimmt an, dass durch Fraktionierung der Elektronenstrahlung in Einzeldosen die negativen Strahleneffekte reduziert werden können und so die strukturellen Eigenschaften der Sehnen geschont werden.

Diese Annahme wird von biomechanischen Ergebnissen einer in-vitro Studie gestützt, die nach fraktionierter Ebeam Bestrahlung (10x3,4 kGy) signifikant höhere Versagenslasten im Vergleich zu 34 kGy Gammastrahlung und Hochdosis Ebeam Bestrahlung zeigen konnte [9].

Eine Studie von Wei et al. zeigte, dass mit einer Fraktionierung der Bestrahlungsdosis, der schädliche Einfluss der Strahlung im Vergleich zu einer Einmaldosis reduziert werden kann [10]. Mögliche Ursachen sind die geringere Strahlendosis im Gewebe pro Zeiteinheit und die damit verbundene Verringerung der radiochemischen Reaktionen (Kollagenstrangbrüche) sowie Apoptoseraten [10]. In einer in vitro Untersuchung unserer Arbeitsgruppe an humanen Patellarsehnen zum Zeitpunkt null zeigten sich signifikant höhere Versagenslasten von fraktioniert Ebeam bestrahlten Sehnenmaterial im Vergleich zu Gamma- und einmal Ebeam bestrahlten Sehnen [9].

Sowohl bei Sterilisation mit 34 kGy Ebeam als auch fraktionierter Bestrahlung (10x3,4 kGy) zeigte sich eine suffiziente Virusinaktivierung [11]. Damit könnte die fraktionierte Elektronenstrahlung eine geeignete Methode zur Sterilisation von allogenen Sehngewebe sein, die zu einer ausreichenden Sterilität bei gleichzeitiger Schonung der biomechanischen Eigenschaften führt. Zur Beurteilung des Potenzials für die klinische Anwendung sind Untersuchungen zu den Umbauprozessen sowie biomechanischen Eigenschaften in-vivo notwendig.

## **1.5 Transplantatremodeling**

Es ist notwendig sich mit den Umbauprozessen eines Kreuzbandtransplantates nach Implantation auseinander zu setzen, da diese aktiv die mechanischen Eigenschaften beeinflussen und damit wichtig für Belastbarkeit und Funktion sind. Sowohl allogene als auch autologe Kreuzbandtransplantate unterscheiden sich histologisch sowie biomechanisch vom körpereigenen VKB [13].

Bereits in den 1980er Jahren wurden experimentelle Studien zur Sehnenheilung durchgeführt [75]. Laut Menetrey et al. folgt sie einem regelmäßigen Ablauf [13]. Insgesamt ist das Remodeling ein dynamischer Prozess bei der es laut Bosch et al. zu einer Adaptation der transplantierten Sehne an das vordere Kreuzband kommt, aber zu keinem identischen Ersatz [76]. Störungen in diesem Ablauf können zu histologischen Strukturveränderung führen und damit zu einer biomechanischen Instabilität mit Re-Ruptur des VKB [13]. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Revaskularisierung sowie Zellularisierung des Gewebes. Besonders mechanische Reize beeinflussen dabei den Kollagenaufbau und -umbau, so dass es letztendlich sogar zu einem höheren Kollagengehalt als im nativen VKB kommen kann [77]. Die Revaskularisierung erfolgt ausgehend vom Hoffa'schen Fettkörper und den posterioren Synoviaanteilen [13]. Ein Begriff, der in der Beschreibung des Transplantatremodelings immer wieder genannt wird, ist die Ligamentation. Diese von Amiel et al. geprägte Bezeichnung beschreibt den histologischen und biomechanischen Umbauprozess des Sehnen transplantates zum Ligament in der spezifischen Umgebung des nativen vorderen Kreuzbandes [77, 78].

Bei den histologischen Umbauprozessen werden verschiedene Phasen unterschieden.

Die folgende Darstellung orientiert sich an Scheffler et al. [79]:

#### *Frühe Phase (bis 4. postoperative Woche)*

Vorherrschend ist eine zentrale Nekrose des Gewebes mit generalisierter Hypozellularität. Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zur Anregung der Zellmigration sowie Proliferation und damit beginnender Produktion der Extrazellulärmatrix. Bereits in den ersten Wochen sieht man eine von peripher beginnende Zellmigration [80]. Ursprünglich stammen diese vermutlich aus der Synovialflüssigkeit, Resten des nativen VKB Stumpfs, oder dem Knochenmark [81]. Zudem kommt es vor allem über einziehende Bindegewebssepten zu einer langsamen Einsprossung von Gefäßen. Relevant für die Biomechanik zeigt sich eine ungenügende Transplantateinheilung am knöchernen Ansatz und damit verbundene Gefahr der Auslockerung des Transplantates („pull out“) aus den Knochenkanälen [81, 82].

#### *Proliferationsphase (4. – 12. postoperative Woche)*

Kennzeichnend ist eine Zunahme der Zellmigration, Vaskularisierung und Veränderung der Extrazellulärmatrix. Die ausgeprägten Umbauprozesse führen zur Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften und damit der Belastbarkeit des Transplantates [81].

Die Gewebsnekrose nach Transplantation führt zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die die Zellmigration und Angiogenese anregen [83, 84]. Diese erfolgen von peripher nach zentral [85]. Die Zellaktivität sowie Veränderungen der Extrazellulärmatrix sind in dieser Phase besonders ausgeprägt. Es kommt zu einer Zunahme an Myofibroblasten, spezialisierte Fibroblasten die isometrische Spannung auf die EZM ausüben können. Die Zellzahl nimmt im Verlauf wieder ab und zeigt eine gleichmäßigere Verteilung entsprechend dem nativen VKB. Betrachtet man die Zellzahl absolut, so liegt diese noch über dem Niveau des nativen VKB [81]. Das Kollagen zeigt noch keine strenge Orientierung und damit bleibt die mechanische Beanspruchbarkeit weiterhin eingeschränkt.

#### *Heilungsphase / Ligamentations Phase*

Charakteristisch für diese Phase sind die Umbauprozesse die das Transplantat morphologisch und biomechanisch dem nativen VKB annähern.

Generell zeigen sich die Fibroblasten metabolisch weniger aktiv, kennzeichnend dafür der spindelförmige Zellkern. Die Zellularität nähert sich zwischen drei und sechs Monaten postoperativ und die Vaskularität ca. sechs bis zwölf Monate postoperativ dem nativen Kreuzband an [81, 86]. Die Kollagenstruktur wird wiederaufgebaut. Es bilden sich Kollagenbündel mit klarer Orientierung und Anpassung der Crimpfrequenz. Die histologische Struktur nähert sich ca. sechs bis zwölf Monate nach Rekonstruktion dem nativen VKB an, ein absoluter Endpunkt konnte bisher jedoch noch nicht definiert werden [13].

Es ist zu beachten, dass die Heilungsphasen größtenteils anhand von Tiermodellen charakterisiert wurden. Biopsieentnahmen nach VKB Rekonstruktion am Menschen haben gezeigt, dass es Unterschiede in den Umbauprozessen besonders in der Proliferationsphase gibt [79]. Die Ligamentationsphase scheint ähnlich abzulaufen [79, 87]. Die ausgeprägte Transplantatnekrose im Tiermodell konnte in Biopsien aus menschlichen Kreuzbandtransplantaten nicht nachgewiesen werden [79, 88]. Es hat sich gezeigt, dass der Nekroseanteil nicht mehr als 30% beträgt [89]. Insgesamt dauert der Remodeling Prozess länger als in Tiermodellen beschrieben [88, 90]. So zeigte die histologische Untersuchung von Biopsien autologer Kreuzbandtransplantate des Menschen, dass die Zellzahl sowie Myofibroblastenzahl über 2 Jahre nach Transplantation höher als im nativen Kreuzband sind [88].

## **1.6 Myofibroblasten**

Myofibroblasten sind spezialisierte Fibroblasten, die auf Grund von Actinfilamenten in der Zellmatrix kontraktile Eigenschaften besitzen [20, 91].

Sie spielen eine wichtige Rolle für die Kontraktion während der Wundheilung, aber auch bei der Entstehung von Krankheiten wie der Dupuytren Kontraktur, Organfibrose oder Arthrofibrose [91, 92].

Wesentliche Bestandteile von Myofibroblasten neben den Aktin Filamenten, sind gute Zell-Stroma Verbindungen und Gap junctions [93]. Diese Verbindung zur Extrazellulärmatrix ist notwendig zur Übertragung der Kontraktion auf das umgebende Bindegewebe [93, 94]. Kennzeichnend ist die Aktin Isoform alpha – Smooth muscle Actin ( $\alpha$ -SMA), welche auch als histologischer Marker dient. Dieses kommt außerdem auch in Perizyten und glatten Muskelzellen vor [94].

Myofibroblasten wurden sowohl im nativen als auch im rupturierten Kreuzband nachgewiesen [20]. Studien haben gezeigt, dass sie einen wichtigen Einfluss auf die Wellenlänge des Kollagens haben [20, 95]. Weiss et al. konnten in einer histologischen Untersuchung mehrerer Sehnen inklusive des humanen vorderen Kreuzbandes zeigen, dass es eine Korrelation zwischen Myofibroblasten pro Quadratmillimeter und der Crimp Frequenz gibt [95]. Das heißt Regionen mit geringer Wellenlänge des Kollagens haben eine größere Anzahl von Myofibroblasten [95, 96].

Des Weiteren konnte man auch Veränderungen der Myofibroblastenanzahl während des Sehnenremodelings nachweisen und vermutet, dass sie einen Einfluss auf die Ligamentation haben und als Indikator für diesen Prozess dienen [96-98].

## **1.7 Revaskularisierung**

Die Revaskularisierung ist wichtig für den Remodelingprozess und die Integration des Transplantates [99]. Sie beginnt ausgehend von Gefäßen der Synovialis, des Hoffa'schen Fettkörpers sowie dem tibialen Bandstumpf [85, 99-101].

Die Sehnen transplantate sind zunächst frei von Gefäßversorgung sowie Synovialis [85]. Eine synoviale Deckschicht bildet sich in den ersten Wochen nach Sehnen transplantation [85].

Aus dem entstehenden periligamentären Gefäßnetz sprossen die Gefäß transversal in das Transplantat ein [99]. In einer Untersuchung am in-vivo Schafsmodell zeigten Unterhauser et al., dass diese von peripher nach zentral meist entlang von Bindegewebssepten fortschreitet [85]. Die größte Gefäßdichte tritt ca. sechs Wochen postoperativ auf [85]. Einhergehend mit der Vaskularisierung kommt es auch zur Zunahme der Zelldichte des Transplantates [100].

Einigkeit zum Endpunkt des Revaskularisierungsprozesses existiert nicht. In histologischen Studien am Tiermodell sah man eine mit dem nativen Kreuzband vergleichbare Vaskularisierung



nach 12 bis 24 Monaten [85, 100]. In einer Untersuchung von Janssen et al. an Biopsien nach VKB Ersatz im Menschen zeigte, dass die Gefäßdichte über die Dauer von zwei Jahren zunimmt, aber nicht das Niveau des nativen VKB erreicht [88]. Hingegen fanden Folconiero et al. 12 Monate nach autologem Kreuzbandersatz beim Menschen keine statistisch signifikanten Unterschiede zum nativen Kreuzband [102].

Betrachtet man den Prozess der Vaskularisierung von Autografts und Allografts schreitet sie bei beiden Gruppen von peripher nach zentral vor allem entlang von Bindegewebssepten fort [103]. Jedoch scheint die Revaskularisierung bei Allografts später einzusetzen und insgesamt langsamer zu erfolgen. So zeigten Scheffler et al. in einem in-vivo Schafsmodell, dass im allogenen Transplantat auch nach 52 Wochen Indikatoren eines verstärkten Remodelings bestehen, während Autografts dem nativen VKB gleichen [103].

## **1.8 Fragestellung und Hypothese**

Den Ergebnissen der zitierten in-vitro Studien entsprechend, könnte die fraktionierte Elektronenstrahlung ein geeignetes Verfahren zur Sterilisation freier Sehnentransplantate für den vorderen Kreuzbandersatz darstellen. Aufgrund fehlender in-vivo Untersuchungen zum Remodeling von Sehnentransplantaten als VKB Ersatz war es daher Ziel dieser Studie den Einfluss fraktionierter Ebeam Bestrahlung auf das frühe Sehnenremodeling nach vorderem Kreuzbandersatz im in-vivo Schafsmodell zu untersuchen. Es wurde folgende Studienhypothese formuliert: Die Sterilisation mit fraktionierter Ebeam Bestrahlung beeinflusst das Transplantatremodeling nach vorderem Kreuzbandersatz im Vergleich zu nicht sterilisierten Allografts positiv.

Mit Erkenntnissen über den Heilungsverlauf kann eine Aussage über die klinische Anwendbarkeit dieses Sterilisationsverfahrens getroffen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

Merino Schafe sind ein beliebtes Tiermodell für die Kniegelenkschirurgie, da sie anatomisch dem menschlichen Kniegelenk ähneln [104]. Hunt *et al.* konnten zeigen, dass die Entnahme der Musculus flexor digitorum Sehne sowie der vordere Kreuzbandersatz gut toleriert werden [105]. Die Schafe zeigen eine rasche Aufbelastung des Kniegelenkes sowie wenige Tage nach Operation ein physiologisches Gangbild. Weiterhin ist der tierpflegerische Umgang mit ihnen unproblematisch.

Das für diesen Versuch herangezogene Tiermodell wurde in Vorstudien dieser Arbeitsgruppe etabliert und gleicht sich im operativen und postoperativen Vorgehen, sowie der histologischen Aufarbeitung und Auswertung [103, 105].

### 2.2 Studiendesign



**Abbildung 2** Merino-Mix Schafe in der Stallung der tiermedizinischen Einrichtung der Charité – Universitätsmedizin Berlin

In dieser Studie erhielten 18 weibliche Merino-Mix Schafe einen operativen Ersatz des vorderen Kreuzbandes am linken Hinterlauf.

Vor Einschluss der Schafe in die Studie erfolgte eine veterinärmedizinische Untersuchung. Dabei wurde der allgemeine Gesundheitszustand erhoben und dokumentiert. Tiere ab 2,5 Jahren wurden in die Studie aufgenommen. Zudem erfolgten die Bestimmung des präinterventionellen

Gewichtes sowie die Gabe von Antihelminthika. Das mittlere Gewicht der Tiere lag bei 73,5 kg (Min 59,5 kg; Max 92,5 kg). Als Transplantate für den Kreuzbandersatz dienten die Sehnen des Musculus flexor digitorum artgleicher Tiere. Diese lassen sich intraoperativ gut präparieren und der Verlust wird von den Schafen gut toleriert [105].

Bei 16 Tieren erfolgte der Kreuzbandersatz mit fraktioniert Ebeam sterilisierten Flexorsehnen und 2 Tiere erhielten einen Ersatz mit *fresh frozen* Allografts (FFA). Um die frühe Phase der Umbauprozesse im Transplantat zu bestimmen wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine mit einer Standzeit von 6 Wochen, die andere mit 12 Wochen. Der Zeitpunkt nach 6 Wochen wurde gewählt, da die Transplantate hier eine für das frühe Remodeling typische beginnende Rezellularisierung und Revaskularisierung in den peripheren Transplantatregionen zeigen, wohingegen zentral eine Transplantatnekrose überwiegt. Nach 12 Wochen finden die Umbauprozesse in allen Transplantatregionen statt und eine beginnende Reorganisation des Kollagens sowie Ligamentation ist zu erwarten, so dass eine Dynamik des Remodelings beurteilt werden kann. Als Vergleichsgruppen zu den fEbeam und FFA wurden native Kreuzbänder und Flexorsehnen gewonnen. Für die Kontrollgruppe der FFA, VKB nativ sowie Flexorsehnen wurden Ergebnisse aus einer Vorstudie dieser Arbeitsgruppe ergänzend verwendet [98]. Die Methodik sowie der Auswertungsprozess waren identisch zu dem im Folgenden dargestellten.

Diese Studie wurde beim Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin beantragt und genehmigt (G0023/12).

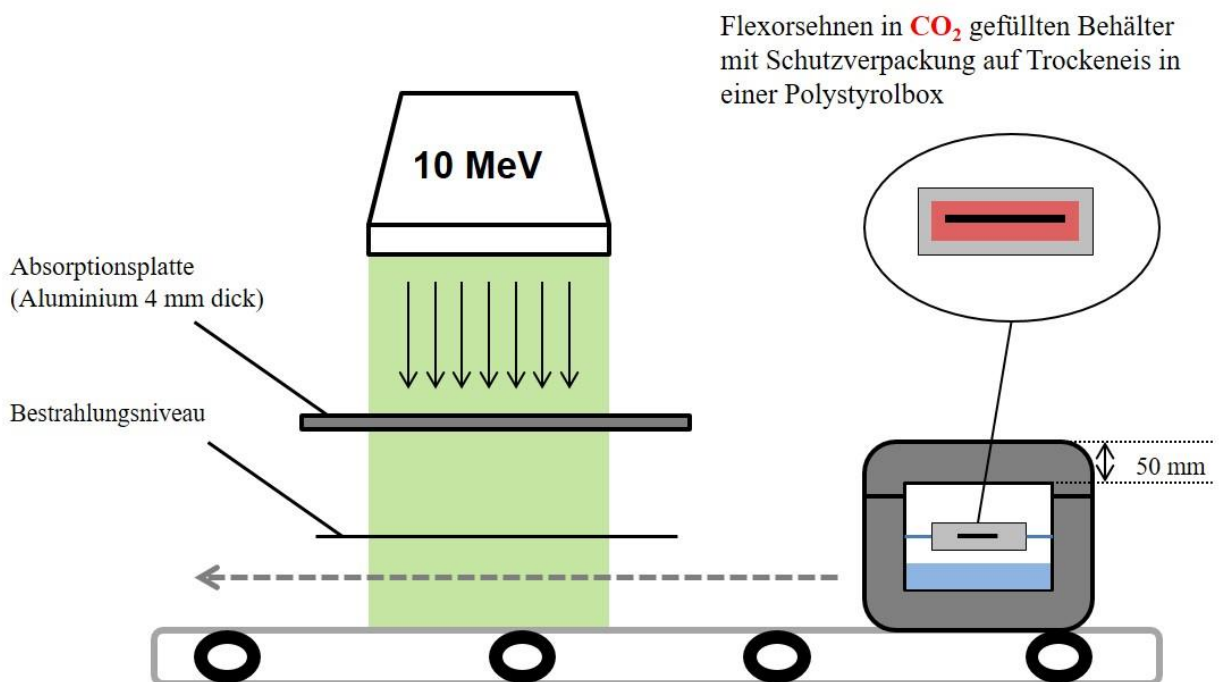
	fEbeam	FFA	VKB nativ	FSN
6 Wochen	N=8	N=0 (+ 8)		
12 Wochen	N=8	N= 2 (+6)		
			N=2 (+6)	N= 2 (+6)

**Tabelle 1** Übersicht über die Versuchsgruppen. Je 8 Tiere mit einer Standzeit von 6 und 12 Wochen nach fraktionierter Ebeam Bestrahlung (fEbeam) und nichtsterilisierte Allografts (FFA). Jeweils 8 native Kreuzbänder (VKB nativ) und Flexorsehnen (FSN) dienten zusätzlich als Kontrollen. Die Anzahl der Versuchstiere in Klammern sind Ergebnisse aus einer Vorstudie unserer Arbeitsgruppe die zur Auswertung hinzugezogen worden [98]

### **2.3 Sterilisation der Transplantate**

In Vorbereitung der Studie wurden die Flexorsehnentransplantate unmittelbar postmortem weiblichen Merino-Mix Schafen unter aseptischen Bedingungen entnommen. Die gewonnenen freien Sehnentransplantate wurden umgehend in sterile Polyesterolbehälter verpackt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Vor der Bestrahlung wurden die Transplantatbehälter mit  $\text{CO}_2$  angereichert um den  $\text{O}_2$  Gehalt auf ein Minimum zu reduzieren. Damit sollen Strahlenschäden auf Grund von Radikalbildung vermindert werden [11]. Die Sehnen wurden auf Trockeneis zur Elektronenbestrahlungsanlage GSE80 der Gamma Product Services GmbH in Radeberg, Deutschland gebracht. Dort erfolgte die fraktionierte Bestrahlung mit Elektronen in 8 Zyklen a 3,4kGy. Damit wurde eine Gesamtdosis von 27,2kGy erreicht (siehe Abbildung 3). Diese Dosis stellt, wie in einer Voruntersuchung herausgefunden, die kleinstmögliche Bestrahlungsdosis dar um eine Virusabreicherung um 3 Logstufen zu erreichen und damit eine ausreichende Sterilisation zu gewährleisten [11]. Je 5 Sehnen wurden in einer Polystyrolbox auf Trockeneis für den Sterilisationsprozess gelagert. Ein Bestrahlungszyklus dauerte 30 Sekunden. Anschließend wurden die sterilisierten Sehnen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zum Tag der Operation gelagert.



**Abbildung 3** schematische Darstellung des Bestrahlungsvorganges . Je 5 Transplantate wurden in einem  $\text{CO}_2$  gefüllten Behälter in einer Polystyrolbox auf Trockeneis gelagert. Es erfolgte die Bestrahlung in 8 Zyklen mit je 3,4 kGy. Damit wurde eine Gesamtdosis von 27,2kGy erreicht. Ein Bestrahlungszyklus dauerte 30 Sekunden.

## 2.4 Operatives und postoperatives Vorgehen

### 2.4.1 Vorbereitung und Anästhesie

Dem zu operierenden Schaf wurde zunächst eine Venenverweilkanüle am rechten Vorderlauf in die Vena cephalica gelegt. Nach Vergewisserung der intravenösen Lage wurde eine Kurzzeitnarkose mit Thiopental in einer Dosierung von 15 mg/kg durchgeführt. Es erfolgte die Intubation des Schafes mittels Laryngoskop mit einem langen Spatel und einem 9er Tubus in Seitenlage. Nach Kontrolle der intratrachealen Lage wurde der Tubus geblockt und fixiert. Daraufhin wurde die Narkose mit Isofluran (1,5-1,8%), Sauerstoff und Lachgas (4:1) fortgeführt. Die Tiere wurden mit einer Atemfrequenz von 10-12/min und einem Atemminutenvolumen von 8-10 l/min beatmet. Nach erfolgreicher Narkotisierung wurde eine Magensonde zur Entlastung der Gasproduktion in den Pansen gelegt. Die Lagerung des Schafes erfolgte in rechter Seitenlage. Der linke Hinterlauf wurde bis zum Beckenbereich geschoren, gewaschen und rasiert. Es erfolgte die Desinfektion des Operationsbereiches mit Iod-haltiger Lösung sowie die sterile Abdeckung. Präoperativ erfolgte die Antibiotikaphylaxe mit Unacid® 3g intravenös und intraoperativ eine Analgesie mit Fentanyl 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  alle 30-45 Minuten. Das intraoperative Monitoring wurde mittels Pulsoxymetrie,  $\text{CO}_2$  Messung und Blutdruckmessung durchgeführt.

### 2.4.2 operativer Verlauf

#### *Entnahme der Sehne des Musculus flexorum superficialis*

Es erfolgte ein Hautschnitt lateral im Bereich der Achillessehne des linken Hinterlaufs. Mittels stumpfer Präparation wurde zunächst das Peritendineum dargestellt und anschließend eröffnet. Daraufhin erfolgte die Identifikation der Sehne des Musculus flexorum superficialis (siehe Abbildung 4). Die Sehne wurde am muskulären Übergang und nahe der knöchernen Insertion abgesetzt. Das Peritendineum wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial vernäht und die Hautnaht erfolgte fortlaufend mit einem nicht resorbierbaren Kunststofffaden. Die entnommene Sehne wurde umgehend bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und für nachfolgende Projekte verwendet.



**Abbildung 4** Darstellung der präparierten Sehne des Musculus flexorum superficialis (Bildquelle AG Scheffler)

#### *Präparation des Transplantates*

Die fraktioniert Ebeam bestrahlte Sehne wurde ca. eine Stunde vor Operationsbeginn aus der  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  Tiefkühlung genommen und zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und in steriler physiologischer Kochsalzlösung gelagert. Nach dem Auftauen wurde der Durchmesser der Sehne ermittelt und es erfolgte die Präparation der Sehne. Die Sehne wurde zunächst auf eine Länge von 6,5-7 cm gebracht. Anschließend erfolgte die Präparation der Sehne in Baseballstitch-Technik mit nicht resorbierbaren Fäden (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5** Präparation des Transplantates in Baseballstich-Technik.  
(Bildquelle AG Scheffler)

### *Eröffnung des Kniegelenks und Resektion des vorderen Kreuzbandes*

Zunächst erfolgte ein medialer Hautschnitt über dem Kniegelenk. Danach wurde schichtweise präpariert und die Fascia lata femoris eröffnet. Die Sehnenplatte des Musculus vastus medialis wurde durchtrennt und die Gelenkkapsel eröffnet. So konnte die Patella mobilisiert und nach lateral luxiert werden. In Flexionsstellung wurden Teile des Hoffa'schen Fettkörpers reseziert bis die Sicht auf die Kreuzbänder frei war. Es folgte die Identifikation des vorderen Kreuzbandes und die ansatznahe Resektion des Bandes mittels Cauter.

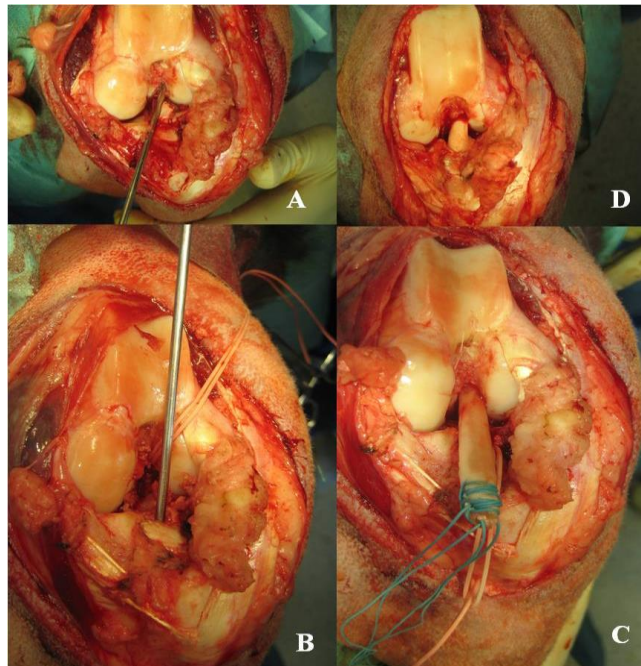
### *Bereitung der Knochenkanäle und Einbringen des Kreuzbandersatzes*

Orientierend an der Insertionsstelle des nativen VKB erfolgte zunächst die Bohrung des femoralen Knochenkanals. Der Bohrkanal wurde ausgehend von der ursprünglichen Insertionsstelle des VKB in Richtung kranial lateral gewählt – anatomisch proximal der lateralen Femurkondyle (Abbildung 6 A). Anschließend erfolgte die Dilatation des Kanals über den eingebrachten Führungsdraht auf den Durchmesser des Transplantates. Als nächstes erfolgte die Bohrung des tibialen Knochenkanals, ausgehend von der Diaphyse bis etwas medial der Tuberositas tibiae (Abbildung 6 B). Dort wurde zusätzlich in ein Zentimeter Entfernung ein zweiter Bohrkanal angelegt. Dieser dient als Knochenbrücke zur Fixation des Transplantates. Anschließend wurde das Gelenk ausgiebig mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Daraufhin wurde das Transplantat über Führungsfäden in die Knochenkanäle eingebracht und unter Zug in Position gebracht (Abbildung 6 C).

### *Fixierung des Transplantates*

Es erfolgte zuerst die Fixierung des femoralen Anteils mittels Endobutton. Unter mehrmaliger maximaler Flexion/Extension wurde die optimale Lage überprüft und daraufhin die tibiale Fixierung über die Knochenbrücke in 30° Flexion vorgenommen (Abbildung 6 D). Anschließend wurde das Gelenk nochmals mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Der Verschluss der Gelenkkapsel und der Muskulatur erfolgte mit Einzelknopfnähten bzw. U-Nähten mit

resorbierbarem Nahtmaterial. Das patellofemorale Band, sowie die Oberschenkelfaszie wurden mit Einzelknopfnähten und ebenfalls resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Es erfolgte eine fortlaufende subkutane Naht. Für die fortlaufende Hautnaht wurde nicht resorbierbares Material verwendet. Anschließend erfolgte die nochmalige Desinfektion der Hautwunde mit iodhaltiger Lösung und die Anlage eines sterilen Wundverbandes.



**Abbildung 6** Darstellung des Operationsablaufs. A Bohrung des femoralen Knochenkanals und Darstellung der Bohrrichtung. B Bohrung tibialer Knochenkanal und Darstellung der Bohrrichtung. C Einzug des Transplantats. D Transplantat in situ. (Bildquelle AG Scheffler)



### **2.4.3 postoperatives Vorgehen**

Nach Beendigung der Operation wurde das Tier extubiert und anschließend wieder in den Stall der tierexperimentellen Einrichtung der Charité gebracht. Die frisch operierten Tiere verblieben für 24 Stunden in einer abgetrennten Box mit Sichtkontakt zur Herde. Somit konnte eine übermäßige Belastung und Verletzung in der Herde am ersten postoperativen Tag verhindert werden. Die Tiere wurden in den ersten 14 Tagen nach der Operation täglich visitiert. Dabei wurde der Allgemeinzustand und der Wundstatus der Tiere untersucht sowie die Körpertemperatur rektal bestimmt, um Frühinfekte zu erkennen. Bei Bedarf erfolgte ein Verbandwechsel. Ab dem 3. bis 4. postoperativen Tag wurde der Verband entfernt. Zur Analgesie erhielten die Tiere in den ersten drei Tagen Finadyne® 1,5 mg/kg subcutan. Die Dokumentation des Gangbildes erfolgte täglich über 14 Tage, dabei wurde der Grad der Belastung des operierten Hinterlaufs bewertet. Es wurden 5 Stufen unterschieden, von 0 - keine Belastung bis 4 - normales Gangbild. Ungefähr am 14. postoperativen Tag wurden die Hautfäden gezogen. Bei gutem Zustand des Tieres erfolgte dann der Transport auf den Bauernhof der Humboldt Universität für die restliche Standzeit bis 6 bzw. 12 Wochen postoperativ. Dort hatten die Schafe freien Auslauf.

### **2.5 Gewebeentnahme**

Zur Entnahme der Proben wurden die operierten Tiere nach Ablauf der Standzeit von 6 und 12 Wochen in die tierexperimentelle Einrichtung der Charité zurückgebracht. Es wurde zunächst erneut eine Venenverweilkanüle in die Vena cephalica des linken Vorderlaufes gelegt. Anschließend erfolgte eine tiefe intravenöse Narkose mit 20mg/kg Körpergewicht Thiopental. Nach Ausfallen der Schutzreflexe wurden dem Tier 100 ml Kaliumchlorid-Lösung intravenös appliziert. Die Feststellung des Todes erfolgte mit der Auskultation des Herzens und mit erneuter Prüfung der Reflexe.

Daraufhin wurde das Kniegelenk des operierten Hinterlaufs am mittleren Abschnitt von Femur und Tibia abgesetzt. Zunächst erfolgte eine Röntgenkontrolle des Gelenks in anterior-posterior und lateraler Aufnahme sowie die klinische Untersuchung. Anschließend wurde das Transplantat biomechanisch getestet. Es erfolgte die Untersuchung der Belastungsfähigkeit in mehreren Zyklen zunächst mit Weichteilmantel, mit erhaltenem vorderen und hinteren Kreuzband sowie nur noch mit erhaltenem VKB. Dazu wurden Schubladentests und final eine Testung der Versagenslast des transplantierten Kreuzbandes durchgeführt. Die Untersuchung und Ergebnisse der biomechanischen Testung sind kein Bestandteil dieser Arbeit. Sie werden jedoch im Zusammenhang mit den histologischen Ergebnissen in Kapitel 4.2 diskutiert.

Nach Abschluss der Belastungstests wurde das Sehngewebe des VKB zur histologischen Aufbereitung aus dem intraartikulären Anteil des Transplantates gewonnen. Zudem wurde aus dem nicht operierten Hinterlauf natives Sehnenmaterial des intraartikulären VKB und der Flexorsehne als Kontrollen entnommen.

## 2.6 Histologische Aufarbeitung des Gewebes

Das Sehnenegewebe wurde in entsprechend beschriftete *tissue teks* gegeben und anschließend für 3 Tage in 4%igem Formalin fixiert. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten kalt gewässert. Es erfolgte die Anfertigung von Längs- und Querschnitten der Sehnen. Diese wurden in separate *tissue teks* gegeben. Daraufhin erfolgte die Entwässerung der Proben mit dem Entwässerungsautomaten von Leica über 72 Stunden (siehe Tabelle 2). Danach wurden die Sehnenanschnitte in Paraffin eingebettet. Nach Kühlung der Paraffinblöcke wurden 3 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom angefertigt. Diese wurden auf Adhäsions-Objektträger gezogen und anschließend getrocknet.

Reagenzien	Dauer
70% Alkohol	8 h
80% Alkohol	5 h
80% Alkohol	4 h
96% Alkohol	8 h
96% Alkohol	10 h
100% Alkohol	10 h
100% Alkohol	10 h
100% Alkohol	10 h
Xylol	1,5 h
Xylol	1,5 h
Paraffin	2 h
Paraffin	2 h

**Tabelle 2** Verweildauer der Proben in den entsprechenden Reagenzien während der Entwässerung in dem Entwässerungsautomaten (Leica TP 1020) über 72 Stunden.

## 2.7 Färbemethoden

### 2.7.1 konventionelle Färbungen

Als Übersichtsfärbungen wurden die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) sowie die Masson-Goldner Trichromfärbung durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte mit Xylol für je zweimal 10 Minuten entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% für je 2 Minuten) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 2 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Der Ablauf der Färbungen ist in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

In der HE-Färbung werden durch den basischen Farbstoff Hämalan des Hämatoxylins vor allem saure bzw. basophile Strukturen (zum Beispiel Zellkerne) blau dargestellt. Das Eosin färbt vor allem basische bzw. acidophile Strukturen (zum Beispiel Zytoplasma oder Kollagen) an. Somit lassen sich mit der HE-Färbung die Zellkernmorphologie sowie die Zellkernverteilung beurteilen.

Mit der Masson-Goldner Trichromfärbung (MG-Färbung) bestehend aus den Farbstoffen Säurefuchsin-Ponceau, PMS-Orange-G und Lichtgrün lässt sich die Extrazellulärmatrix differenzierter darstellen. Zellkerne stellen sich schwarz, Bindegewebe grün, Erythrozyten orangerot und Zytoplasma ziegelrot dar. Die Kollagenanordnung kann mit dieser Färbung gut beurteilt werden.

Färben mit Hämatoxylin nach Harris	7 min
Spülen mit Aqua dest.	3x 2 sek
Spülen mit HCl-Alkohol (0,25 %)	2 sek
Differenzieren in Leitungswasser	10 min
Färben mit Eosin	2 min
Entwässern mit 96 % Alkohol	2x 2 min
Entwässern mit 100% Alkohol	2 x 2 min
Xylol	2 x 2 min
Eindecken mit Vitro-Clud®	

**Tabelle 3** Darstellung des Ablaufs zur Hämatoxylin-Eosin Färbung nach entparaffinieren (Xylol) und rehydrieren der Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe.

Weigert`s Eisenhämatoxylin	4 min
Spülen mit Leitungswasser	10 min
Säurefuchin-Ponceau	5 min
1% Essigsäure	abspülen
Differenzieren unter Sichtkontrolle in PMS-Orange-G	30 min
1% Essigsäure	abspülen
Spülen mit Aqua dest	2 sek
Lichtgrün	10 min
1% Essigsäure	abspülen
100 % Alkohol	3 x kurz
Xylol	2 x 2 min
Eindecken mit Vitro-Clud®	

**Tabelle 4** Darstellung des Ablaufs zu Masson- Goldner Trichromfärbung nach entparaffinieren (Xylol) und rehydrieren der Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe.

## 2.7.2 Immunhistochemische Färbungen

### 2.7.2.1 Theorie der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine spezifische Methode um Gewebeeigenschaften nachzuweisen. Seit den 80iger Jahren ist die Immunhistologie ein wichtiger Bestandteil in histologischen Untersuchungen [106]. Das Prinzip beruht dabei auf einer spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion. Antigene sind Substanzen, wie zum Beispiel Aminosäuregruppen, oder Saccharidketten, an die ein Antikörper speziell bindet.

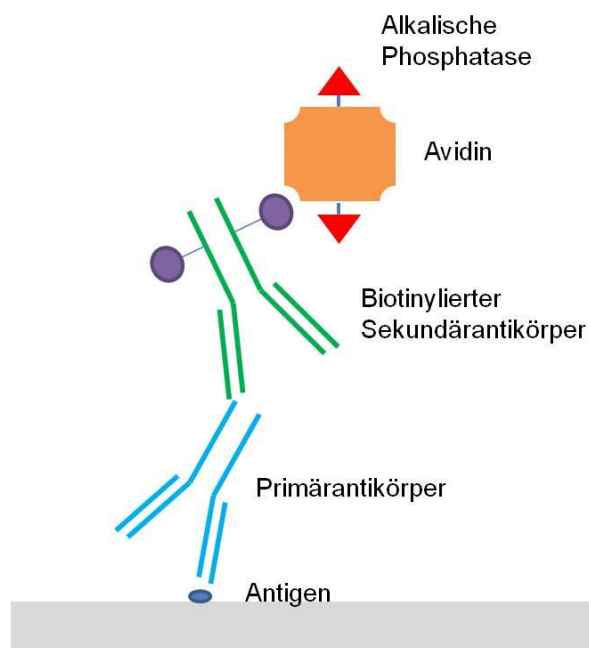
Die Qualität der Immunhistologie ist abhängig von der Spezifität des Antikörpers und der Stabilität des Antigen-Antikörperkomplexes.

Der Antikörper der das Gewebe-Antigen bindet wird in der Immunhistologie als Primärantikörper bezeichnet. Man unterscheidet monoklonale und polyklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper kommen von einer Plasmazelle und sind nur gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet. Epitope sind kleine Molekülabschnitte des Antigens. Polyklonale Antikörper hingegen stammen von verschiedenen Plasmazellen und sind gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet, das bedeutet sie haben eine größere Sensitivität um das Antigen zu binden. Die Primärantikörper werden in Zellkulturen einer Tierart gewonnen.

Man unterscheidet eine direkte von einer indirekten Immunhistologie. Bei beiden Methoden wird zunächst ein Primärantikörper aufgetragen der das Gewebeantigen bindet. In der direkten

Methode ist dieser mit einem Enzym oder einer fluoreszierenden Substanz gekoppelt und wird direkt detektiert. In der heute vor allem angewendeten indirekten Methode, wird ein Sekundärantikörper verwendet. Dieser erkennt die Epitope des konstanten Anteils des Primärantikörpers und bindet diesen. An den Sekundärantikörper gekoppelt ist ein Enzym, welches nach Aufbringen eines entsprechenden Substrates (Chromogen) zur Farbreaktion führt.

Um diese Farbreaktion zu verstärken kann man die Avidin- Biotin Methode verwenden. Avidin ist ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß. Dieses verfügt über mehrere Bindungsstellen. Zum einen für Biotin, welches kovalent an den Sekundärantikörper gebunden ist und für die Alkalische Phosphatase (AP). Die AP ist ein Enzym, dass im alkalischen pH-Wert Bereich entsprechendes chromogenes Substrat in ein detektierbares Farbsignal umwandelt. Zur schematischen Darstellung siehe Abbildung 7.



**Abbildung 7** Schematische Darstellung der indirekten Immunhistologie (AB-Komplex Methode). Ein spezifischer Primärantikörper bindet an das darzustellende Antigen. Um diese Reaktion zu verstärken wird ein Sekundärantikörper aufgetragen, der an den konstanten Anteil des Primärantikörpers bindet und über eine Avidin-Biotin Bindung die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase verstärkt.

### **2.7.2.2 Faktor VIII/ von-Willebrand-Faktor – Immunhistochemie**

Faktor VIII oder auch von-Willebrand-Faktor genannt ist ein Glykoprotein und ein Bestandteil der Gerinnungskaskade. Er wird auf dem Gefäßendothel exprimiert. Dies kann immunhistochemisch genutzt werden, um mit einem Antikörper das Gefäßendothel anzufärben.

Dazu wurden die paraffinfixierten Querschnitte der Sehnenpräparate zunächst wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Danach erfolgte zunächst die Vorbehandlung mit 0,1 % Pepsin (in 0,01 HCl). Die Sehnenpräparate wurden für 30 Minuten bei 37°C mit dem Enzym inkubiert, um eine ausreichende Demaskierung der Antigene zu erreichen. Anschließend wurden die Objektträger in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Sofern nicht anders angegeben wurde PBS mit einem pH von 7,2-7,4 und in einer Verdünnung von 1:10 verwendet (1 Teil PBS Konzentrat, 9 Teile Aqua dest.). Anschließend folgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Normalserum der Ziege, da der später verwendete biotinylierte Sekundärantikörper in Zellen dieser Tierspezies produziert wurde. Damit sollen unspezifische Bindungen an Gewebsproteine gesättigt werden. Anschließend wurde ohne Spülen der Primärantikörper, ein polyklonaler Antikörper gegen FVIII in einer Konzentration von 1:200 aufgetragen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Parallel hierzu wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, indem anstatt des Primärantikörpers Antikörperdiluent verwendet wurde. Die weiteren Arbeitsschritte waren identisch.

Am Folgetag wurden die Objektträger in PBS gespült und anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinyliertem Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:200 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut für zweimal 5 Minuten in PBS gespült und danach die Proben mit dem AB-Komplex und gebundener alkalischer Phosphatase (AP) für 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Spülen erfolgte zur Vorbereitung der AP-Reaktion die Inkubation mit Chromogenpuffer und somit ein anheben des pH-Wertes auf alkalische Werte. Unmittelbar vor Verwendung wurde das AP-Substrat hergestellt. Die Entwicklung erfolgte unter Sichtkontrolle mit Beurteilung der Färbung. Die Dauer der Reaktionszeit betrug im Durchschnitt 15 Minuten. Die Reaktion wurde in PBS abgestoppt. Anschließend erfolgte die Kern-Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 2 Minuten.

### **2.7.2.3 $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Immunhistochemie**

$\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ SMA) ist eine Isoform des Actins und kommt vor allem in Perizyten, sowie Myofibroblasten vor. Die Immunhistochemie mit Anti- $\alpha$ SMA wird oft, so auch hier, genutzt um Myofibroblasten darzustellen. Auch ein Gefäßnachweis ist mit dieser Methode

möglich, jedoch werden hier nur Gefäße mit einer Muskularis und keine Kapillaren nachgewiesen.

Es wurden die paraffinfixierten Längsschnitte der Transplantate entparaffiniert und rehydriert. Nach Spülen in PBS (Konzentration und pH-Wert wie oben beschrieben) erfolgte auch ähnlich dem immunhistochemischen Nachweis von von-Willebrand Faktor die Inkubation mit Normalserum (hier von Pferden) für 30 Minuten bei Raumtemperatur, um mögliche Hintergrundreaktion mit dem späteren Zweitantikörper zu minimieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper gegen  $\alpha$ SMA mit einer Konzentration von 1:100 bei 4°C über Nacht.

Am darauffolgenden Tag wurde nach Spülen in PBS der biotinylierte Zweitantikörper aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde nach Spülen in PBS der AB-Komplex mit gebundener AP aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 50 Minuten bei Raumtemperatur, Spülen und Anheben des pH-Wertes in den alkalischen Bereich konnte das AP-Substrat aufgetragen werden. Die Entwicklung erfolgte unter Sichtkontrolle. Nach durchschnittlich 10 Minuten wurde die Reaktion in PBS abgestoppt. Es erfolgte die Kern-Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer.

## **2.8 Polarisationsmikroskopie**

Mit der Polarisationsmikroskopie kann die räumliche Struktur von Objekten dargestellt werden, die doppelbrechende Eigenschaften besitzen.

Natürliches Licht breitet sich unpolarisiert, also ungerichtet, aus. Bei der Polarisationsmikroskopie setzt man eine besondere Anordnung von Filtern ein um die räumliche Struktur von Objekten darzustellen. Zunächst gelangt der Lichtstrahl durch den Polarisator. Dort wird nur Licht einer bestimmten definierten Schwingungsebene durchgelassen. Der zweite Filter, Analysator genannt, gleicht im Aufbau dem Polarisator und lässt ebenfalls nur Licht einer bestimmten Ebene hindurch. Bringt man nun ein Präparat mit doppelbrechenden Eigenschaften, in diesem Falle Kollagen, zwischen dieses Filtersystem wird das auftreffende Licht in zwei Wellenzüge gespalten. Diese sind zur Polarisationssebene gedreht und stehen senkrecht aufeinander. Mit Hilfe des Analysators werden sie wieder auf eine Ebene gebracht und interferieren. Das doppelbrechende Objekt leuchtet auf und stellt sich plastisch dar. So kann man die Wellenlänge des Kollagens bestimmen. Dazu verwendet wurden sialinisierte Objektträger, deren Oberfläche nicht zur Doppelbrechung führt.

## 2.9 Auswertung der Daten

Die histologische Auswertung der Proben erfolgte mit einem konventionellen Lichtmikroskop mit angeschlossenem Kamerasystem zur Bilddokumentation. Betrachtet wurden die Proben dabei in verschiedenen Vergrößerungen von 50-, 100-, 200- und 400- fach. Die quantitative Auswertung wurde mit Hilfe von Bildanalyse-Systemen durchgeführt.

### 2.9.1 Zellen (deskriptiv und quantitativ)

Zunächst wurde in einer Überblicksdarstellung die Zellverteilung in der HE-Färbung deskriptiv beurteilt. Weiterhin wurde in der 200-/400-fachen Vergrößerung die Zellkernmorphologie betrachtet um ovoide und spindelförmige Zellkerne zu unterscheiden. Außerdem wurde nach Entzündungszellen als Zeichen einer inflammatorischen Reaktion gesucht. Für die quantitative Bestimmung der Zellen/mm<sup>2</sup> wurden in der  $\alpha$ SMA-Immunhistochemie 10 repräsentative Gesichtsfelder a 0,19 mm (200-fache Vergrößerung) ausgewählt.

### 2.9.2 Myofibroblasten (deskriptiv und quantitativ)

Myofibroblasten lassen sich auf Grund des Actins im Zytoplasma mit Hilfe der  $\alpha$ -SMA Immunhistochemie von den übrigen Fibroblasten differenzieren. Gezählt wurden  $\alpha$ -SMA positive Zellen in 10 repräsentativen Gesichtsfeldern a 0,19 mm (200fache Vergrößerung) in den Sehnenlängsschnitten. Zudem erfolgte eine deskriptive Beschreibung der Zellmorphologie und Verteilung.

### 2.9.3 Gefäße (deskriptiv und quantitativ)

In der HE-Färbung, sowie der von-Willebrand-Faktor Immunhistologie wurde zunächst deskriptiv die Gefäßverteilung in der Probe untersucht. Dazu wurde das Präparat in verschiedenen Vergrößerungen betrachtet (50- und 100-fache Vergrößerung).

Um die Dichte der Gefäße zu bestimmen wurde die immunhistochemische Färbung mit Anti-von-Willebrand-Faktor durchgeführt. Es wurden in der Probe 17 repräsentative Gesichtsfelder (8 peripher, 6 intermediär, 3 zentral) a 0,19 mm ausgewählt (200-fache Vergrößerung). In diesen wurde die Anzahl der Gefäße mit Hilfe zweier Kriterien bestimmt. Zum einen ein von-Willebrand-Faktor positives Gefäßendothel, zum anderen ein erkennbares Gefäßlumen. Nach Auszählen aller Gesichtsfelder erfolgte die Bestimmung der mittleren Gefäßanzahl pro mm<sup>2</sup>.

### 2.9.4 Kollagencrimp und Kollagenanordnung (deskriptiv und quantitativ)

Der Kollagencrimp gibt Aussage über die Tertiärstruktur der Kollagenfibrillen. Zur Analyse des Kollagencrimps wurden die  $\alpha$ -SMA gefärbten Längsschnitte mit dem Polarisationsmikroskop betrachtet. Ausgewertet wurde in der 200-fache Vergrößerung des Mikroskops. Pro Schnitt



wurde in 10 repräsentativen Gesichtsfeldern die mittlere Wellenlänge bestimmt und daraus die mittlere Wellenlänge pro Probe errechnet.

Neben dieser quantitativen Bestimmung im Polarisationsmikroskop wurde auch eine deskriptive Auswertung vorgenommen. Dazu wurde die Orientierung, sowie die Homogenität des Crimps in der Probe betrachtet. Dies erfolgte im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Masson-Goldner Trichromfärbung als Bindegewebsfärbung.

### **2.9.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Datenanalyseprogramms SPSS.

Auf Grund der geringen Stichprobenzahl kommt es zu keiner Normalverteilung der Daten. Daher wurden nicht parametrische Tests zur Analyse angewendet. Ein Vergleich über alle Versuchsgruppen wurde mit dem H-Test nach Kruskal Wallis und ein paarweiser Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Allgemeine Bemerkungen**

Für die Studie wurden insgesamt 18 Merino-Mix Schafe operiert. Die Operation verlief in allen Fällen komplikationslos. Postoperativ standen alle Tiere erstmals innerhalb von 4 Stunden auf. Die Wundheilung verlief regelrecht, es kam zu keiner Wundinfektion. Das Nahtmaterial konnte zeitgerecht entfernt werden. Zum Tötungszeitpunkt wurde das operierte Kniegelenk von allen Tieren voll belastet. Kein Schaf musste vorzeitig aus der Studie ausgeschlossen werden.

Die Versuchsgruppe der Tiere mit allogenen Transplantaten wurde mit Ergebnissen aus Vorstudien unserer Arbeitsgruppe ergänzt, die in Methodik und Auswertung identisch waren [98].

### **3.2 Makroskopische Auswertung**

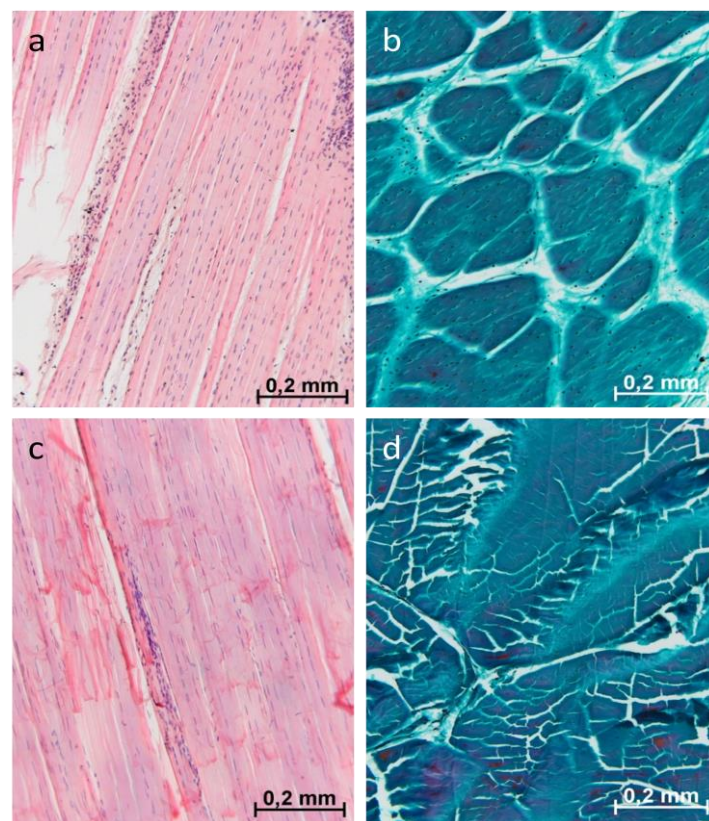
Die operierten Kniegelenke zeigten sowohl nach 6 Wochen Standzeit als auch nach 12 Wochen keine Einschränkung des Bewegungsausmaßes sowie einen unauffälligen vorderen Schubladentest. Der Narbenbereich an Achillessehne und Knie waren bei allen Tieren reizlos und ohne Rötung.

Nach Arthrotomie zeigte sich nach 6 Wochen ein minimaler nach 12 Wochen kein Erguss. Eine entzündliche Hyperplasie der Synovialis oder Anzeichen von arthrotischen Veränderungen waren nicht ersichtlich. Bei den Versuchstieren mit 12 Wochen Standzeit waren zum Teil Gefäßinjektionen der VKB umgebenden Synovialis sowie eine makroskopisch erscheinende Veränderung der Bandstruktur sichtbar. Das Sehngewebe wirkte lockerer, leicht ödematös und zeigte zum Teil bereits bei geringer Zugkraft eine Elongation.

### 3.3 Deskriptive Auswertung Hämatoxylin-Eosin und Masson Goldner Färbung

#### 3.3.1 Native Strukturen

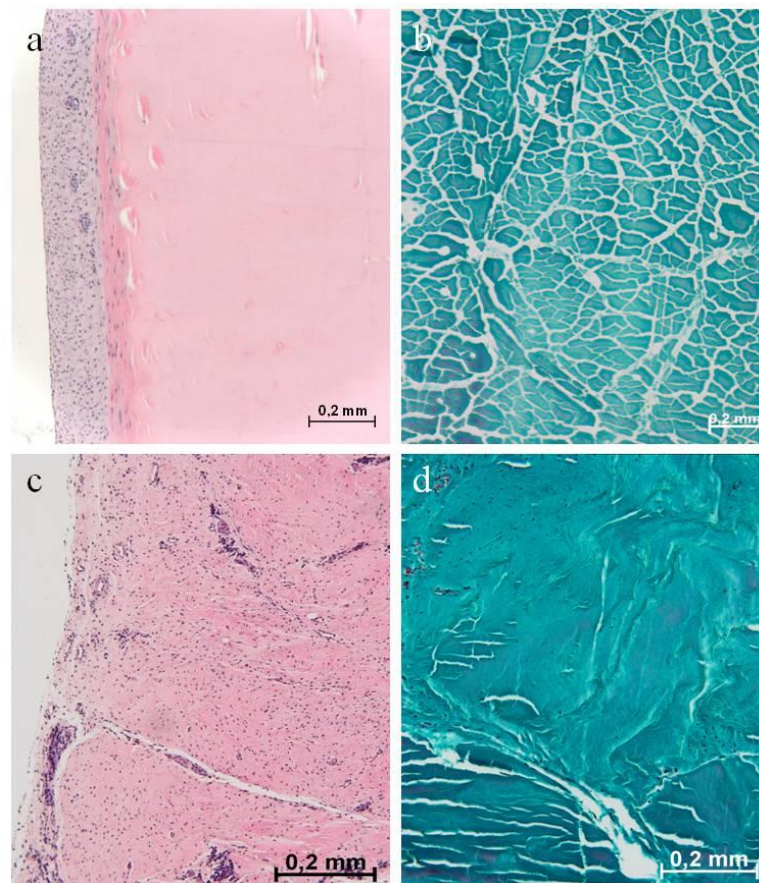
Histologisch zeigen das native VKB und die Flexorsehne (FSN) eine regelmäßige Anordnung von Kollagenbündeln sowie Zellen. Die Kollagenbündel der Flexorsehne zeigen sich streng parallel angeordnet, dazwischen befinden sich homogen spindelförmige Fibrozyten. Dabei erscheint die Zellzahl deskriptiv geringer als beim vorderen Kreuzband. Im VKB sind die Zellen in der Mehrzahl ovoid förmig. Das Band scheint außerdem von mehr gefäßführenden Bindegewebssepten durchzogen zu werden. In der MG-Färbung zeigte sich, dass die Kollagenbündel des VKB von mehr lockerem Bindegewebe umgeben sind. Zudem scheinen die Organisationseinheiten des Kollagens der Flexorsehnen größer zu sein als im VKB.



**Abbildung 8 Übersichtsfärbung der nativen Strukturen** (HE (links), MG (rechts)) Vergrößerung 100-fach. a) Längsschnitt des VKB mit höherem Anteil an Zellen im Kollagen. b) Querschnitt des VKB – Kollagenbündel mit umgebendem lockerem Bindegewebe. c) Längsschnitt der Flexorsehne mit geringem Zellanteil. d) Querschnitt der FSN mit großen Kollagenbündeln (Fixierungsartefakte).

### 3.3.2 Fresh Frozen Allografts

Zum 6 Wochen Zeitpunkt ist ein Großteil des Sehngewebes nekrotisch. Von peripher zeigt sich eine beginnende Repopulation mit Zellen. Diese ist besonders subsynovial ausgeprägt. Die Zellkerne sind vor allem ovoid bis rund. In Regionen mit erhöhter Zellzahl ist die Kollagenorientierung unregelmäßiger, in den nekrotischen Bereichen jedoch unverändert. Zum 12 Wochen Zeitpunkt ist eine Zunahme der Zellpopulation vor allem entlang nach zentral laufender gefäßführender Bindegewebssepten sichtbar. Dennoch erscheinen die zentralen Bereiche vorrangig avital. Deskriptiv scheint die Zellpopulation im subsynovialen Bereich weiter zuzunehmen und die Kollagenorientierung ist ungerichtet. Die Zellkerne zeigen sich nun auch spindelförmig. Anzeichen für eine Entzündungsreaktion gibt es nicht.

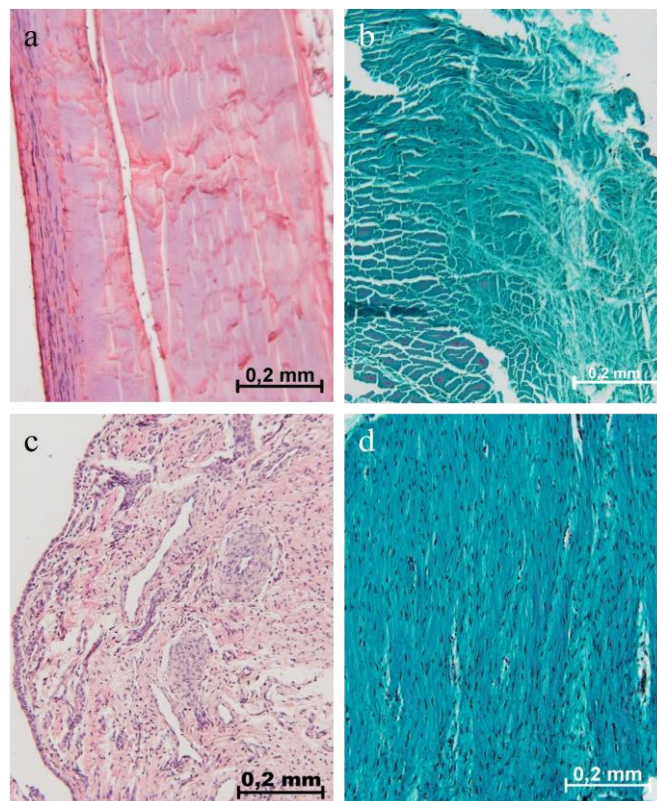


**Abbildung 9 Übersichtsfärbung der FFA (HE (links), MG (rechts)) Vergrößerung 100-fach.** a) 6 Wochen, Längsschnitt. Es zeigt sich eine beginnende Rezellularisierung subsynovial. b) 6 Wochen, Querschnitt. Die Kollagenbündel sind unverändert im Vergleich zur nativer FSN. c) 12 Wochen, Längsschnitt – Es zeigt sich eine zunehmende Zellpopulation von peripher. d) 12 Wochen, Querschnitt. Es kommt zu einer Veränderung der geordneten Kollagenstruktur in Abschnitten mit zunehmender Zellzahl.

### 3.3.3 Fraktioniert Ebeam bestrahlte Allografts

Nach 6 Wochen Standzeit zeigen sich auch die fraktioniert Ebeam bestrahlten Allografts hauptsächlich avital. Eine Zunahme der Zellzahl und die Einsprossung von Gefäßen erfolgt von peripher, allerdings waren die Ausprägung und das Ausmaß in der Versuchsgruppe sehr inhomogen. Bei einigen Versuchstieren scheint der Remodeling Prozess im Verhältnis weiter fortgeschritten zu sein, wohingegen bei anderen das Gewebe fast komplett avital erscheint. In den Bereichen mit Gefäßen und Zellen nimmt die geordnete Formation der Kollagenbündel ab. Zellkerne sind vor allem rund bis oval.

Zum 12 Wochen Zeitpunkt nimmt die Anzahl der Zellen im gesamten Präparat stark zu. Nekrotische Areale zeigen sich nicht mehr. Auffallend sind außerdem Gefäße mit deskriptiv großem Durchmesser und stark ausgeprägter Muscularis. Eine geordnete Ausrichtung sowie Bündelung des Kollagens sind kaum sichtbar.



**Abbildung 10** Übersichtsfärbung der fEbeam Transplantate (HE (links), MG (rechts))  
Vergrößerung 100-fach.

- a) 6 Wochen, Im Längsschnitt zeigt sich eine von peripher beginnende Repopulation mit Zellen.  
 b) 6 Wochen, Querschnitt. Zu sehen sind beginnende Veränderungen der Kollagenorganisation in zellularisierten Bereichen.  
 c) 12 Wochen, Längsschnitt. Es kommt zu einer starken Zunahme der Zellzahl im Sehngewebe und Ausbildung großer Gefäße.  
 d) 12 Wochen, Querschnitt. Eine strikte Orientierung und Organisation des Kollagens in Bündel sind nicht mehr erkennbar.

### 3.3.4 Zusammenfassender Vergleich aller Gruppen

Bei den nativen Strukturen zeigt sich eine regelmäßige Verteilung von Fibroblasten im Gewebe sowie eine geordnete Formation des Kollagens. Gefäße befinden sich im Peritendineum. Bei den FFA zeigt sich nach 6 Wochen vor allem nekrotisches Gewebe mit peripher beginnenden Umbauprozessen. Bei den fEbeam zeigt sich nach 6 Wochen auch eine peripher beginnende Repopulation mit Zellen allerdings ist das Ausmaß dieser in der Versuchsgruppe stark unterschiedlich. Sowohl FFA als auch fEbeam ähneln im histologischen Aufbau zu diesem Zeitpunkt sehr der Flexorsehne. Zum 12 Wochen Zeitpunkt zeigt sich in beiden Gruppen ein Fortschreiten der Umbauprozesse. Bei den FFA schreitet das Remodeling entlang von Bindegewebssepten homogen nach zentral fort, wobei die zentralen Abschnitte noch nekrotisch sind. In der fEbeam Gruppe hat die Zellzahl stark zugenommen und ist in allen Gewebeanteilen homogen. Zudem kam es zur Entwicklung vor allem großer Gefäße. Findet man bei den FFA zum 12 Wochen Zeitpunkt insbesondere zentral noch nekrotische Areale, ist dies bei den fEbeams nicht der Fall. Hier ist die Zellularisierung bereits bis in alle Areale vorangeschritten. Die Kollagenorientierung ist in beiden Gruppen ungeordnet, eine Organisation in Kollagenbündel findet noch nicht statt.

## 3.4 Immunhistologische Auswertung

### 3.4.1 $\alpha$ SMA- Immunhistologie – Zellzahl, Myofibroblasten

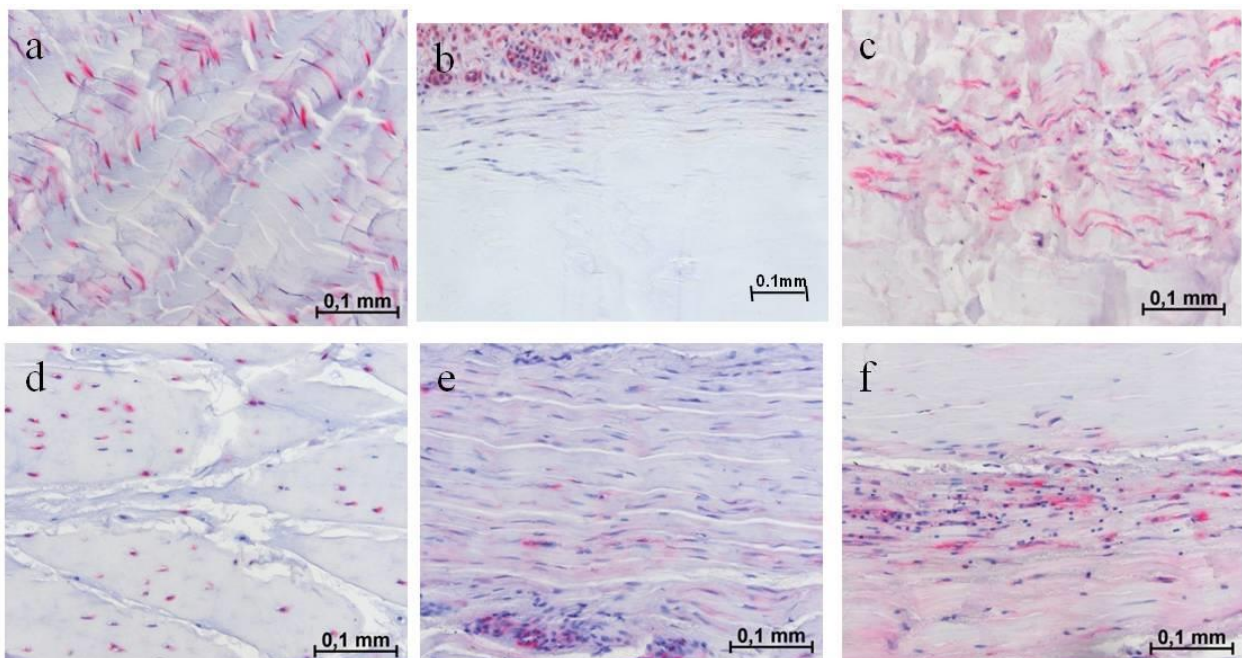
#### 3.4.1.1 Deskriptive Auswertung

Die Zellverteilung und Zellmorphologie des nativen VKB unterscheidet sich von der Flexorsehne. So ist die Zellzahl in den Flexorsehnen eher gering und gleichmäßig im Gewebe verteilt. Der Zellkern ist spindelförmig. Die Anzahl an Myofibroblasten scheint zu variieren, in einigen Vergleichsproben treten sie vereinzelt auf in anderen regelmäßig. Sie haben stets einen schmalen Zytoplasmasaum (vgl. Abbildung 11 a). Im nativen VKB zeigt sich eine höhere Anzahl an Zellen sowie eine gleichmäßige Verteilung von Fibroblasten und Myofibroblasten. Die Zellkerne der Fibroblasten sind oval und von einem runden Zytoplasmasaum umgeben (vgl. Abbildung 11 d).

Nach 6 Wochen zeigt sich in den FFA eine geringere Zellzahl sowie geringere Zahl von Myofibroblasten als im nativen Gewebe. Die Zellpopulation nimmt von peripher entlang von gefäßführenden Bindegewebsstraßen nach zentral zu, allerdings bleibt ein Großteil des Gewebes avital. Die Anzahl von Zellen nimmt bis zum 12 Wochen Zeitpunkt weiterhin zu. Zentral

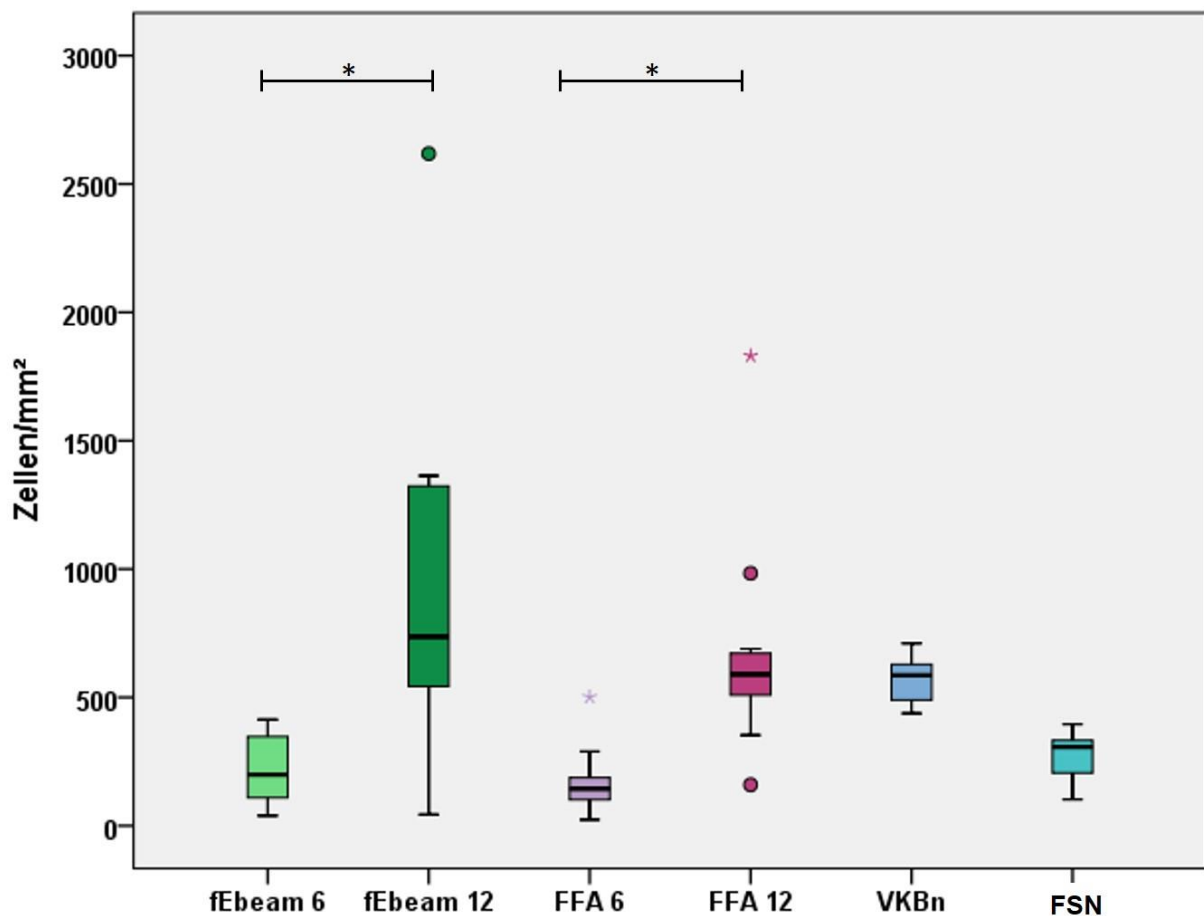
verbleibt das Sehengewebe nekrotisch. Die Zellen sind spindelförmig, der Anteil an Myofibroblasten bleibt deskriptiv vermindert (vgl. Abbildung 11 e).

Bei den fEbeam Proben zeigt sich der zentrale Gewebeteil nach 6 Wochen auch avital (vgl. Abbildung 11 c). Die Zellmigration verläuft von peripher eher ungeordnet und variiert stark innerhalb der Versuchsgruppe. Der Anteil an Myofibroblasten ist gering. Nach 12 Wochen zeigt sich eine Zunahme der Zellzahl, der Anteil an Myofibroblasten bleibt deskriptiv eher niedrig (vgl. Abbildung 11 f).



**Abbildung 11 alphaSMA-Immunhistologie** Vergrößerung 100fach. a) native Flexorsehne; Die Myofibroblasten sind regelmäßig verteilt und besitzen einen schmalen Zytoplasmasaum. b) FFA, 6 Wochen; Die Myofibroblasten kommen nur vereinzelt in den rezellularisierten Bereichen vor. (Bildquelle AG Scheffler) c) fEbeam, 6 Wochen; In den rezellularisierten Bereichen kommen spindelförmige Myofibroblasten mit schmalen Zytoplasmasaum in unterschiedlicher Häufigkeit vor. d) natives VKB; Die Myofibroblasten treten vereinzelt in den Kollagenbündeln auf. Sie haben einen runden Zellkern. e) FFA, 12 Wochen; Die Myofibroblasten sind spindelförmig und treten regelmäßig auf. f) fEbeam, 12 Wochen; Die Myofibroblasten treten inhomogen auf. Es zeigt sich ein geringer Anteil an der Gesamtzellzahl.

### 3.4.1.2 Gesamtzellzahl



**Abbildung 12 Zellen/mm<sup>2</sup> der einzelnen Versuchsgruppen.** Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl in der fEbeam Gruppe von 6 nach 12 Wochen ( $p= 0,016$ ) sowie in der Gruppe der fresh frozen Allografts ( $p= 0,009$ ).

Es zeigt sich eine niedrigere Zellzahl bei den Flexorsehnen (306,84 Zellen/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zu dem nativen VKB (586,44 Zellen/mm<sup>2</sup>) allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant.

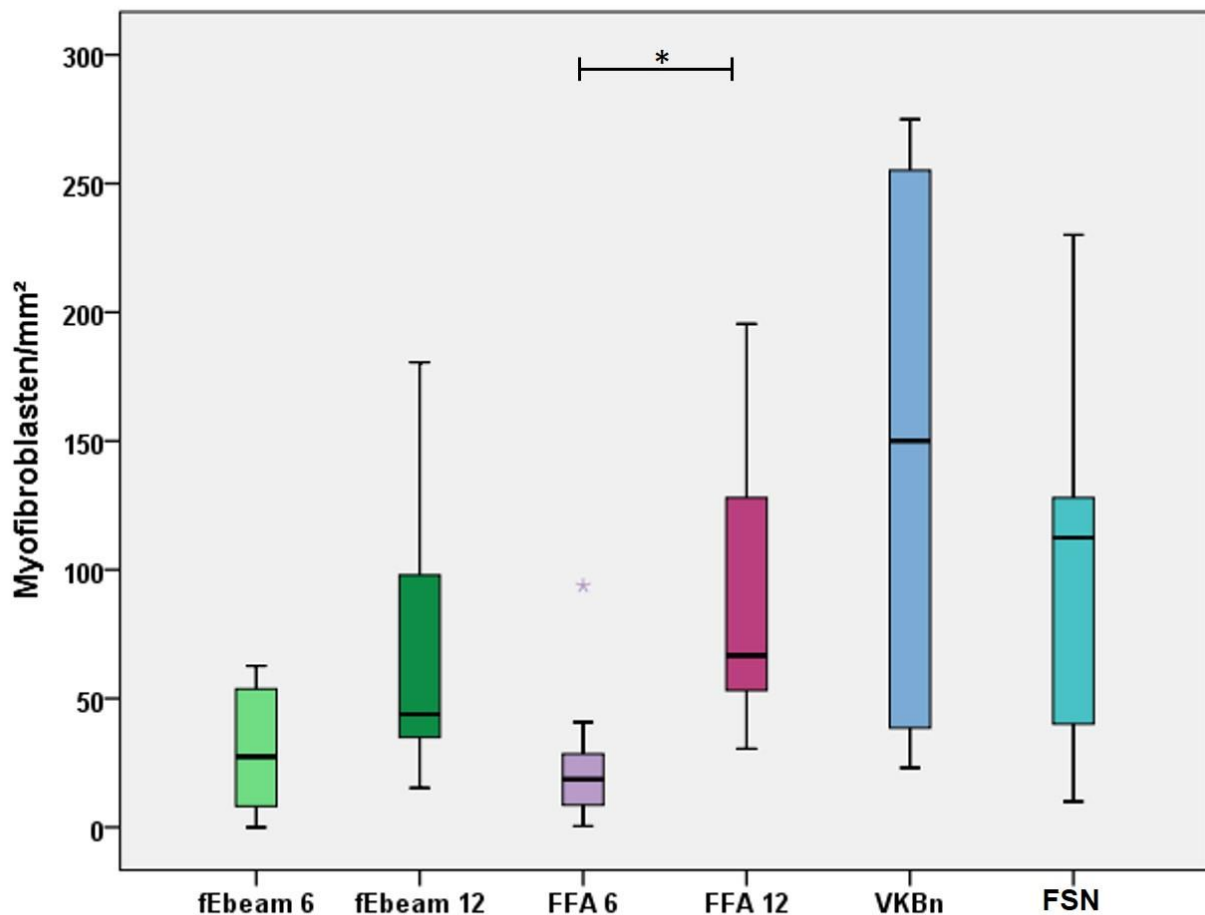
Zum 6 Wochen Zeitpunkt zeigt sich bei den FFA eine Abnahme der Gesamtzellzahl mit 143,68/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den nativen Flexorsehnen. Allerdings nimmt sie bis zum 12 Wochenzeitpunkt sprunghaft auf 590,11 Zellen/mm<sup>2</sup> zu und ist somit signifikant höher als zum 6 Wochen Zeitpunkt ( $p = 0,009$ ). Der Median der Gesamtzellzahl der 12 Wochen Allografts liegt auf dem Niveau des nativen VKB.

Auch bei der fEbeam Gruppe zeigt sich nach 6 Wochen eine verminderte Anzahl mit 198,69 Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den nativen Flexorsehnen mit 306,84 Zellen/mm<sup>2</sup>, allerdings zeigt



sich der Trend zu einer höheren Zellularisierung im Vergleich zu den FFA zum 6 Wochen Zeitpunkt. Auch bei den fEbeams zeigt sich eine signifikante Zunahme der Gesamtzellzahl von 6 nach 12 Wochen mit einer Zellzahl von 736,11/mm<sup>2</sup> ( $p = 0,016$ ). Das Niveau der Zellularität liegt damit über dem der FFA nach 12 Wochen und dem des nativen VKB, allerdings ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

### 3.4.1.3 Myofibroblastenzahl



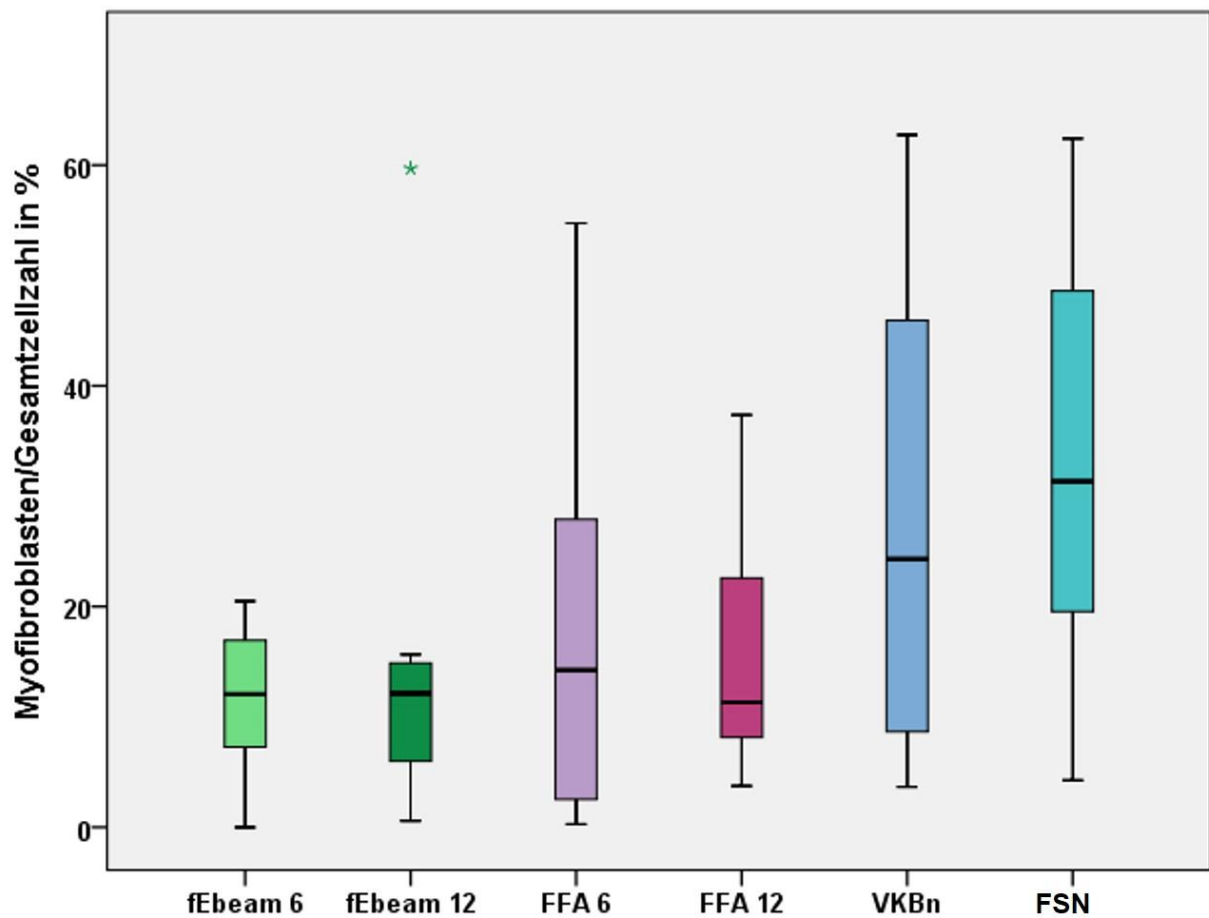
**Abbildung 13 Darstellung der Myofibroblasten/mm<sup>2</sup> aller Vergleichsgruppen.** Es zeigt sich, dass die Myofibroblastenzahl der fresh frozen Allografts nach 12 Wochen signifikant höher ist als nach 6 Wochen ( $p= 0,036$ ).

Auch in der Anzahl der Myofibroblasten unterscheiden sich die nativen Strukturen. So zeigt sich, dass sich im Gewebe der nativen Flexorsehne (112,44/mm<sup>2</sup>) tendenziell weniger Myofibroblasten befinden als im nativen VKB mit 150,00/mm<sup>2</sup>. Es fällt auf, dass die Anzahl der  $\alpha$ SMA positiven Zellen in beiden nativen Gruppen stark schwankt. Die Anzahl der Myofibroblasten in den unsterilisierten Allografts liegt zum 6 Wochenzeitpunkt

bei  $18,6/\text{mm}^2$  und damit unter dem Niveau der nativen FSN. Zum 12 Wochenzeitpunkt kommt es zwar zu einem signifikanten Anstieg der Myofibroblasten auf  $66,75/\text{mm}^2$  ( $p = 0,036$ ), damit liegt es jedoch deutlich unter der Zahl von Myofibroblasten im nativen Kreuzband.

Bei den fEbeams ergibt sich eine Myofibroblastenzahl von  $27,37/\text{mm}^2$  nach 6 Wochen Standzeit. Damit liegt die Anzahl unter der in nativen FSN, aber tendenziell höher als in den FFA, ein signifikanter Unterschied ergibt sich hier nicht. Bis zu 12 Wochen nimmt die Myofibroblastenzahl nicht signifikant zu, auf nur  $43,89/\text{mm}^2$ . Damit ist sie im Vergleich zu den unsterilisierten Allografts zum 12 Wochen Zeitpunkt niedriger und stark vermindert im Vergleich zum nativen vorderen Kreuzband.

### 3.4.1.4 Anteil Myofibroblasten/Gesamtzellzahl



**Abbildung 14** Darstellung des Anteils von Myofibroblasten an der Gesamtzellzahl in Prozent.

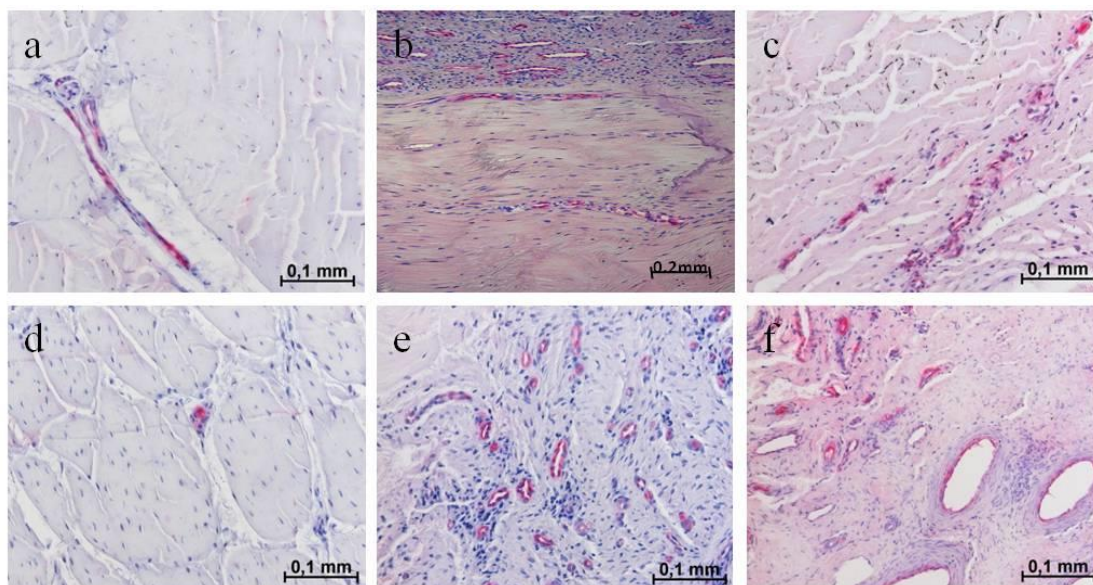
Insgesamt zeigt sich ein höherer Anteil an Myofibroblasten bei den nativen Präparaten. Der Anteil an Myofibroblasten bei den fEbeam bleibt nach 6 und nach 12 Wochen etwa gleich. Bei den FFA zeigt sich eine Abnahme des Myofibroblasten Anteils von 6 nach 12 Wochen.

Betrachtet man den Anteil von Myofibroblasten an der Gesamtzellzahl, ergibt sich ein etwas höherer Anteil bei den Flexorsehnen mit 31,3% als beim nativen VKB mit 24,3 %. Es zeigt sich, dass die anderen Untersuchungsgruppen unter diesem Wert liegen. Der Anteil an Myofibroblasten in den unsterilisierten Allografts beträgt nach 6 Wochen 14,2% und nimmt nach 12 Wochen auf 11,3% ab. In der Ebeam Gruppe ist der Anteil gleichbleibend (fEbeam6: 12,1%; fEbeam12: 12,1%).

### 3.4.2 Faktor VIII Immunhistologie – Gefäßdichte

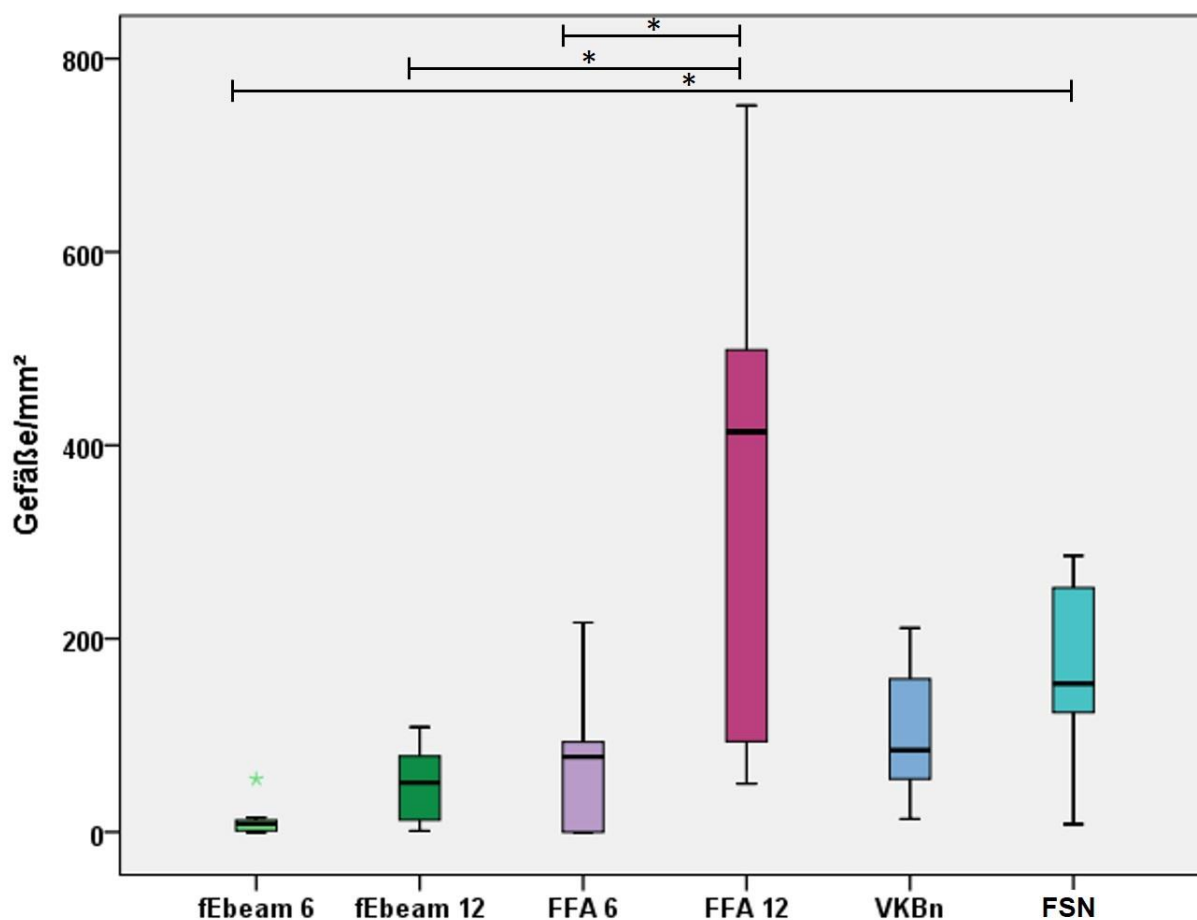
#### 3.4.2.1 Deskriptive Auswertung

In den nativen Sehnen zeigt sich eine gleichmäßige Gefäßverteilung. Die Gefäße befinden sich im Peritendineum und sind von Kollagenfaserbündeln umgeben ( Abbildung 15 a,d). Bei den FFA zeigt sich eine zunehmende Anzahl von Gefäßen in den peripheren Transplantatregionen von 6 nach 12 Wochen (Abbildung 15 b,e). Der zentrale Bereich ist zu beiden Standzeiten noch nicht vaskularisiert. Zum 6 Wochen Zeitpunkt zeigt sich in der fEbeam Versuchsgruppe eine beginnende Gefäßeinsprossung von peripher (Abbildung 15 c). Die Gefäße sind vor allem kleinlumig und wenige haben eine Muscularis. Das Ausmaß der Revaskularisierung in der fEbeam Versuchsgruppe ist inhomogen. In einigen Proben finden sich kaum Gefäße in anderen ziehen sich Gefäßbäume bis in die zentralen Sehnenanteile. Nach 12 Wochen zeigt sich weiterhin eine inhomogene Vaskularisierung der Proben. Die Anzahl der Gefäße scheint nicht stark zugenommen zu haben, allerdings fällt ein großes Lumen auf, sowie eine kräftige Muscularis (Abbildung 15f). Die Gefäße befinden sich nicht innerhalb von Bindegewebssepten.



**Abbildung 15 FVIII-Immunhistologie.** Vergrößerung 100fach. a) FSN – Im Sehnenquerschnitt befinden sich wenige Gefäße im Peritendineum. b) FFA 6 Wochen; Neben einer gut vaskularisierten synovialen Hüllschicht zeigt sich eine beginnende Revaskularisierung subsynovial mit kleinlumigen Gefäßen. (Bildquelle AG Scheffler) c) fEbeam 6 Wochen; Es zeigt sich eine von peripher ausgehende Revaskularisation mit kleinlumigen Gefäßen. d) VKB; Es zeigen sich vereinzelt kleine Gefäße im Peritendineum. e) FFA 12 Wochen; Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Gefäßzahl mit eher kleinlumigen Gefäßen. f) fEbeam 12 Wochen; Auch hier zeigt sich eine Zunahme der Gefäßzahl, jedoch auch die Ausbildung vor allem großer Gefäße mit einer Muscularis mucosae.

### 3.4.2.2 Quantitative Auswertung der Revaskularisierung



**Abbildung 16 Gefäßanzahl/mm<sup>2</sup> der einzelnen Versuchsgruppen.** Bei den FFA zeigt sich eine signifikante Zunahme der Gefäßanzahl von 6 nach 12 Wochen  $p=0,032$ . Die Gefäßanzahl der FFA nach 12 Wochen ist signifikant höher als bei den fEbeam zum gleichen Zeitpunkt  $p=0,035$ . Die Anzahl der Gefäße der fEbeam nach 6 Wochen ist signifikant niedriger als bei den nativen Flexorsehnen  $p=0,018$ .

Bei der quantitativen Auswertung der Revaskularisierung zeigt sich schon bei den nativen Strukturen ein Unterschied. So ist die Gefäßanzahl in den Flexorsehnen ( $153,48/\text{mm}^2$ ) höher als in dem nativen vorderen Kreuzband ( $84,73/\text{mm}^2$ ).

In beiden Interventionsgruppen zeigt sich eine Zunahme der Gefäßdichte vom 6 Wochen Zeitpunkt zum 12 Wochen Zeitpunkt. In der Allograft-Gruppe ist die Zunahme statistisch signifikant ( $77,78/\text{mm}^2$  vs.  $413,89/\text{mm}^2$   $p=0,032$ ). Auch in der fEbeam Gruppe lässt sich der Trend erkennen, dass die Anzahl der Gefäße pro  $\text{mm}^2$  von 6 nach 12 Wochen zunimmt, von  $8,36/\text{mm}^2$  nach 6 Wochen auf  $50,93/\text{mm}^2$  nach 12 Wochen. Es zeigt sich auch, dass die Gefäßdichte der FFA zum 12 Wochen Zeitpunkt signifikant größer ist als die der fEbeams zum

gleichen Zeitpunkt ( $p = 0,035$ ). Zudem ergibt sich eine signifikant niedrigere Gefäßzahl in der Versuchsgruppe der fEbeam nach 6 Wochen im Vergleich zu den nativen Flexorsehnen ( $p = 0,018$ ).

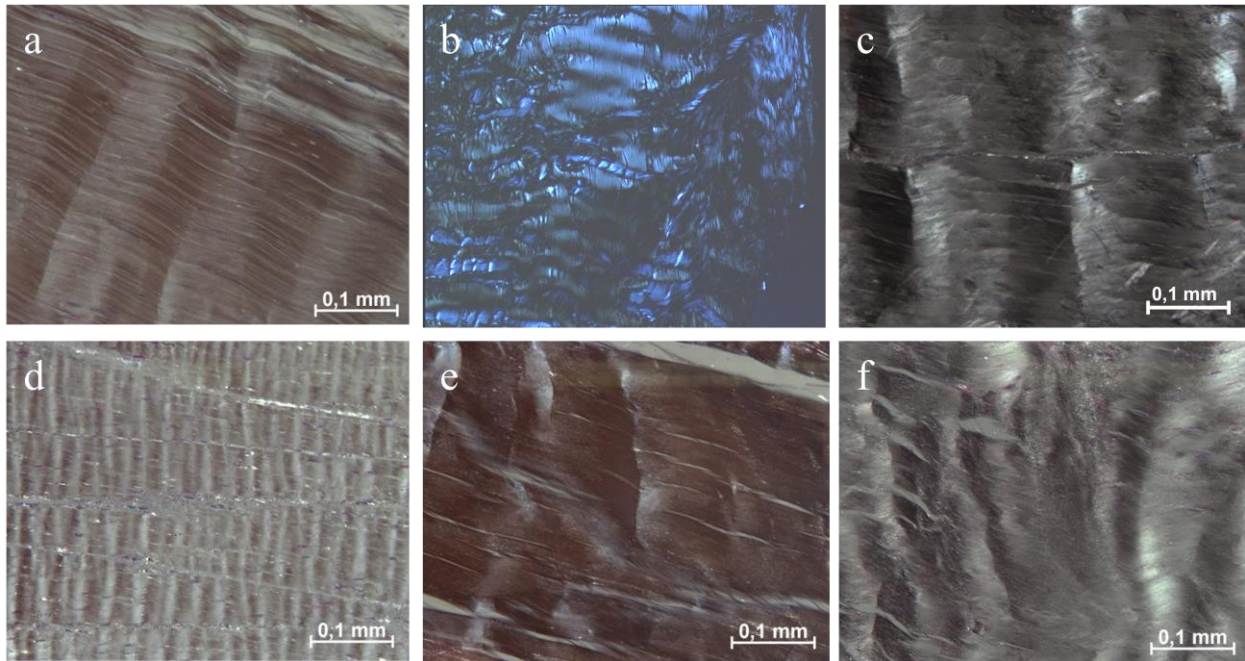
### **3.5 Polarisationsmikroskopie**

#### **3.5.1 Deskriptive Auswertung**

Sowohl das native vordere Kreuzband als auch die native Flexorsehne zeigen eine geordnete und regelmäßige Längsorientierung des Kollagens. Deskriptiv erscheint die Wellenlänge im vorderen Kreuzband kleiner im Vergleich zu der Wellenlänge der Flexorsehne (Abbildung 17 a, d).

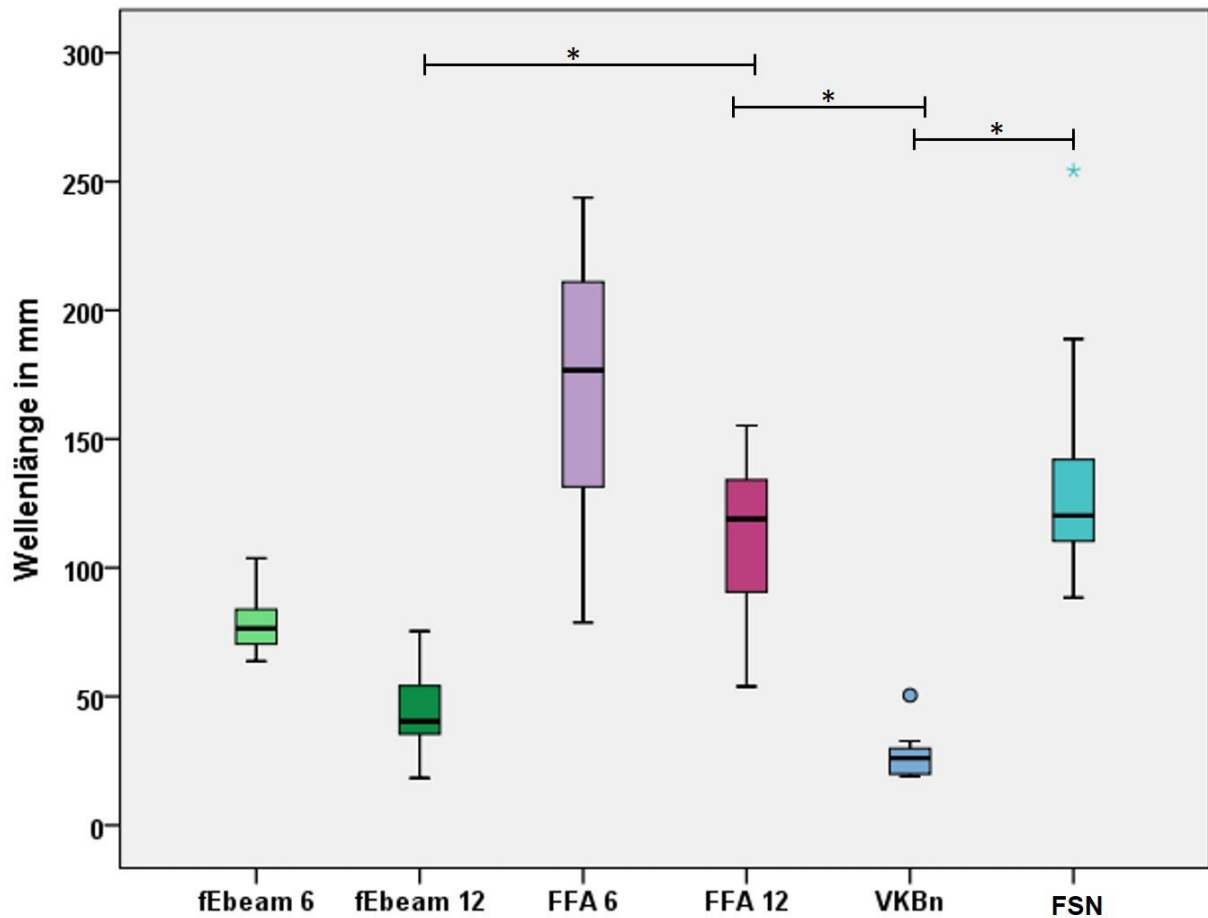
Bei den FFA zeigt sich nach 6 Wochen besonders peripher eine Veränderung der Kollagenstruktur. In Bereichen mit zunehmender Anzahl von Fibroblasten löst sich die geordnete Kollagenstruktur auf und die strikte Längsorientierung ist nicht mehr zu erkennen. In den zentralen Abschnitten bleibt die Kollagenstruktur unverändert. Nach 12 Wochen Standzeit nehmen die Umbauprozesse peripher weiter zu. In diesen Bereichen ändert sich die regelmäßige Anordnung des Kollagens und die Wellenlänge schwankt (Abbildung 17 e). Auch nach 12 Wochen befindet sich im Zentrum avitales Gewebe in dem die Kollagenorientierung im Vergleich zu den Flexorsehnen unverändert ist.

Nach 6 Wochen ähnelt die Kollagenstruktur der fEbeam Gruppe dem der FFA zum gleichen Zeitpunkt. Auch hier ist die Kollagenstruktur in Bereichen mit zunehmender Zellularisierung verändert. Die strikte Längsorientierung ist in diesen Regionen nicht mehr vorhanden und die Wellenlänge des Kollagens nimmt ab. Ebenfalls gibt es im Gewebe avitale Abschnitte in denen die Wellenlänge im Vergleich zur nativen Flexorsehne unverändert ist. Zum 12 Wochen Zeitpunkt verändert sich die geordnete Kollagenstruktur der Ebeams stark. Die Wellenlänge des Kollagens variiert innerhalb des Präparates und innerhalb der Gruppe (Abbildung 17 f). Teilweise ist in Abschnitten mit großer Anzahl von Zellen oder vielen Gefäßen keine Tertiärstruktur mehr erkennbar. Eine gerichtete Orientierung des Kollagens ist in vielen Gebieten nicht ersichtlich. Eine Tendenz zur Formation wie im nativen VKB ist noch nicht zu erkennen.



**Abbildung 17 Polarisationsmikroskopie Längsschnitte.** Vergrößerung 100fach. a) native Flexorsehne; Es zeigt sich eine regelmäßige Tertiärstruktur mit langem Kollagenrimp. b) FFA, 6 Wochen; 50 fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine regelmäßige Tertiärstruktur ähnlich der nativen Flexorsehne. (Bildquelle AG Scheffler) c) fEbeam, 6 Wochen; Die Tertiärstruktur ist ähnlich der nativen Flexorsehne. In den Regionen mit Rezellularisierung zeigt sich eine beginnende Veränderung der räumlichen Struktur des Kollagens. d) natives VKB; Es zeigt sich eine regelmäßige Tertiärstruktur mit kurzem Kollagenrimp. e) FFA, 12 Wochen; Die Wellenlänge des Kollagens variiert zwischen kurz und langwellige Abschnitte in Abhängigkeit von der Zellularisierung. f) fEbeam, 12 Wochen; Die Wellenlänge des Kollagens variiert im Präparat zwischen kurz und langwelligen Abschnitten. Teilweise lässt sich allerdings auch keine Tertiärstruktur des Kollagens mehr nachweisen.

### 3.5.2 Auswertung Kollagencrimp



**Abbildung 18 Darstellung der Wellenlänge in mm aller Vergleichsgruppen.** Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Wellenlänge der VKBn und Flexorsehnen mit  $p=0,0008$ . Die Wellenlänge der fEbeam nach 12 Wochen ist signifikant kürzer als der FFA nach 12 Wochen  $p=0,028$ . Bei den FFA zeigt sich der Kollagencrimp nach 12 Wochen signifikant länger als beim nativen VKB  $p=0,0009$ .

Betrachtet man die Wellenlänge der nativen Strukturen zeigt sich, dass das native VKB eine mit 26 mm geringere Wellenlänge im Vergleich zu der nativen Flexorsehne mit 120,26 mm hat. Dieser Unterschied ist signifikant mit  $p=0,0008$ .

Die Wellenlänge der FFA zum 6 Wochen Zeitpunkt mit einer Länge von 176,74 mm ist damit noch größer als die der nativen Flexorsehnen. Sie nimmt bis zum 12 Wochenzeitpunkt auf 118,91 mm ab. Damit ist sie signifikant größer als die Wellenlänge des nativen vorderen Kreuzbandes ( $p = 0,0009$ ).



Bei der fEbeam Gruppe beträgt die Wellenlänge zum 6 Wochen Zeitpunkt 76,43 mm. Damit ist sie tendenziell geringer als die Wellenlänge der nativen Flexorsehne und der unsterilisierten Allografts zum 6 Wochen Zeitpunkt allerdings ohne, dass sich signifikante Unterschiede ergeben. Bis zu 12 Wochen Standzeit nimmt die Wellenlänge in der fEbeam Gruppe weiterhin auf 40,35 mm ab. Damit ist sie größer als die des nativen Kreuzbandes. Im Vergleich zu den unsterilisierten Allografts ergibt sich eine signifikant niedrigere Frequenz mit  $p=0,028$ .

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Fraktionierung einer Hochdosisbestrahlung mit Ebeam das frühe histologische Remodeling sowie die biomechanischen Eigenschaften von Sehnenallografts im Vergleich zu nicht sterilisierten Allografts positiv beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass diese Studienhypothese zurückgewiesen werden muss.

### 4.1 Remodeling

Die Umbauprozesse des vorderen Kreuzbandes durchlaufen drei charakteristische Stadien: Die frühe, die Proliferations und die Ligamentationsphase [79, 81]. Die frühe Phase bis zur vierten postoperativen Woche ist gekennzeichnet von einer zentralen Nekrose des Gewebes. Ausgehend von der Transplantatperipherieperipher kommt es zu einer beginnenden Revaskularisierung und Zellularisierung. In der Proliferationsphase zeigt sich ein zunehmender Umbau der Extrazellulärmatrix sowie eine voranschreitende Zellmigration. Die Ligamentationsphase kennzeichnet die biomechanische und morphologische Anpassung des Transplantates an das native vordere Kreuzband.

Im Rahmen dieser in-vivo Studie wurden ein voranschreitendes Remodeling von 6 nach 12 Wochen sowie eine deutlichere Zunahme der Gesamtzellularität im Vergleich zu nicht sterilisierten Allografts beobachtet. So ist die Zellzahl der fEbeam Gruppe zum 12 Wochen Zeitpunkt fast doppelt so groß wie in den FFA. Ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Gruppen ergibt sich zu keinem Zeitpunkt. Zwar schreitet der Remodeling Prozess sowohl bei den fEbeam als auch bei den nicht sterilisierten Allografts von peripher nach zentral fort. Dennoch verbleibt bei den FFA nach 12 Wochen der zentrale Anteil avital, dies ist in der fEbeam Gruppe nicht der Fall. Es kommt also zu einer verstärkten Rezellularisierung der fEbeam Transplantate.

Die verstärkte Rezellularisierung zu der es in den fEbeam Transplantaten kam zeigte sich auch in einer Vorgängerstudie unserer Arbeitsgruppe, die das frühe Remodeling nach Sterilisation mit 34 kGy Ebeam als einmalige Hochdosisbestrahlung untersucht [4]. Hier konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme der Zellzahl von 6 nach 12 Wochen nachgewiesen werden. Im Vergleich

zu den FFA war die Gesamtzellzahl deutlich erhöht ähnlich unseren Ergebnissen. Da sich die übrigen Parameter der Studie gleichen, kann man schlussfolgern, dass es trotz der Fraktionierung der Elektronenstrahlung zu ähnlichen Effekten in der Rezellularisierung kommt und diese im Vergleich zu nicht sterilisierten Allografts und Autografts deutlich erhöht ist.

Ein Anhalt für eine inflammatorische Reaktion, die man bei der gesteigerten Gesamtzellularität vermuten könnte, ergab sich in beiden Studien zu keinem Zeitpunkt. Allerdings eignen sich die durchgeführten histologischen Methoden nicht zur uneingeschränkten Differenzierung von Entzündungszellen. Der veränderte Remodelingprozess nach fraktionierter Ebeam Bestrahlung entsteht womöglich durch eine vermehrte Zellapoptose mit einer Gewebsnekrose, die über eine vermehrte Ausschüttung von Zytokinen zu einer verstärkten Rezellularisierung führt. Es gibt bereits klinische Untersuchungen in denen Biomarker in der Synovialflüssigkeit nach VKB Verletzung beziehungsweise nach VKB Rekonstruktion nachgewiesen und quantifiziert worden [107, 108]. Dabei konnten unter anderem pro -und antiinflammatorische Biomarker sowie Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden [107]. Eine Evaluation der Biomarker während des Remodelingprozesses nach VKB Plastik ist bisher nicht erfolgt. Dies könnte wichtige Erkenntnisse geben um den Ablauf besser zu verstehen und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Um die negativen Strahleneffekte zu reduzieren werden mehrere Ansatzpunkte verfolgt. In dieser Studie erfolgte neben einer Fraktionierung der Strahlung die Sterilisation in einem CO<sub>2</sub> angereicherten Milieu. Damit soll die Radikalbildung in Abwesenheit von Sauerstoff und Wasser reduziert werden. Trotz dessen zeigte diese Untersuchung eine Beeinträchtigung des Sehnenremodelings im Vergleich zu unbestrahlten Allografts. Diese Maßnahmen sind also nicht ausreichend um die negativen Strahleneffekte auf die Transplantateigenschaften zu reduzieren.

Wei *et al.* konnten zeigen, dass der Einsatz von Ascorbat als Radikalfänger zusätzlich zur Fraktionierung zu einer signifikant besseren biomechanischen Belastbarkeit führt [10]. Allerdings erfolgte hier lediglich die in-vitro Testung. Seto *et al.* untersuchten den Einfluss von Radikalfängern (Riboflavinphosphat, Ascorbat) auf das Sehnenremodeling nach Gammabestrahlung mit 50 kGy im in-vivo Schafsmodell [109]. Nach initial besserer biomechanischer Belastbarkeit, kam es im Heilungsverlauf zu niedrigeren Versagenslasten und der Beeinträchtigung der Knochen-Sehnen Heilung. Nach 12 Wochen zeigte sich außerdem eine Zunahme der Gesamtzellzahl sowie eine Entzündungsreaktion [109]. Dies lässt vermuten, dass die verwendeten Substanzen selbst den Remodelingprozess beeinflussen und damit die negativen

Effekte der Bestrahlung nicht ausgleichen können. Bei der Bewertung dieser Studie muss man jedoch bedenken, dass die biomechanischen Eigenschaften der Sehnen bereits in-vitro ab einer Bestrahlungsdosis mit 34 kGy im Vergleich zu FFA beeinträchtigt sind [74]. Zudem werden in den Gewebebanken aktuell Bestrahlungsdosen von 18-21 kGy angewendet [10]. Damit sind weitere Untersuchungen notwendig um den Einfluss von Radikalfängern bei diesen Dosen zu evaluieren. Dem sollten auch Untersuchungen mit Ebeam sterilisierten Sehnen hinzugefügt werden.

#### **4.1.1 Revaskularisierung**

Die Kreuzbandtransplantate sind nach Implantation zunächst frei von Gefäßen. Diese wachsen im Rahmen des Remodelings ausgehend von einer synovialen Hüllschicht über Bindegewebssepten von peripher nach zentral in das Transplantat ein [81, 85]. Diesen Vorgang nennt man Revaskularisierung.

Betrachtet man die Revaskularisierung fEbeam sterilisierter Sehnen zeigt sich diese von der Transplantatperipherie nach zentral fortschreitend, wie in diversen Studien mit unsterilisierten Allografts und Autografts am selbem Tiermodell nachgewiesen wurde [4, 85, 98]. Allerdings erfolgt diese nicht geordnet in Bindegewebssepten wie bei den nicht sterilisierten FFA. Nach 6 Wochen sind die Gefäße der fEbeam Transplantate vor allem kleinlumig ohne Muscularis. Nach 12 Wochen ist in der fEbeam Gruppe eine vor allem inhomogene Revaskularisierung mit Ausbildung großer Gefäße mit kräftiger Muscularis erfolgt. Auffallend ist, dass der Prozess nicht gleichmäßig erfolgt. Bei den FFA zeigt sich eine signifikante Zunahme der Gefäße von 6 nach 12 Wochen, dieser Trend lässt sich bei den fEbeam Transplantaten erkennen ist aber nicht signifikant. Es fällt hingegen auf, dass die Anzahl an Gefäßen pro mm<sup>2</sup> nach 12 Wochen bei den FFA signifikant größer ist als bei den fEbeam. Insgesamt zeigt sich also ein anderer Ablauf der Revaskularisierung mit Ausbildung von weniger, dafür aber großlumigeren Gefäßen.

Vergleicht man dies mit den Ergebnissen von Schmidt et al. nach einmaliger Sehnenbestrahlung mit 34 kGy Elektronenstrahlung zeigt sich eine Zunahme der Gefäßdichte pro mm<sup>2</sup> von 6 nach 12 Wochen, die jeweils über dem Niveau der FFA zur gleichen Zeit liegt [4]. Damit zeigte sich nach 34kGy Ebeam Bestrahlung von 6 nach 12 Wochen eine deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl sowie der Gefäßdichte über das Niveau der FFA. Dies steht im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Ergebnissen dieser Untersuchung nach fraktionierter Ebeam Sterilisation der Spendersehnen, in der sich zwar eine deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl zeigt, aber eine nur relativ geringe Zunahme der Gefäßdichte. Da sich diese beiden Studien bis auf das gewählte

Sterilisationsverfahren gleichen scheint die Fraktionierung zu einer Beeinträchtigung der Revaskularisierung zu führen. Dieser Ablauf der Revaskularisation mit Ausbildung großer Gefäße, aber quantitativ geringerer Anzahl ist so im Remodeling Prozess des VKB das erste Mal aufgefallen. Möglicherweise kommt es durch die Bestrahlung mit 8x 3,4 kGy Ebeam zu einer ausgeprägteren Schädigung der Spendersehne als die in-vitro Ergebnisse vermuten ließen. Dies kann zu einer veränderten Angiogenese führen. Die Einflussfaktoren der Angiogenese in freien Sehmentransplantaten sowie der genaue Ablauf nach Sehmentransplantation wurde im Einzelnen noch nicht untersucht.

In einer Studie am Kaninchenmodell wurde die Expression von VEGF während des Transplantatremodelings nach vorderem Kreuzbandersatz nachgewiesen [110, 111]. Immunhistochemische Darstellung des VEGF wurden auch für das Schaf Tiermodell etabliert [112]. Im Kaninchenmodell konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung des Kreuzbandtransplantates mit VEGF vor Implantation zu einer gesteigerten Vaskularität in den ersten postoperativen Wochen führt [113]. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, ob durch Vorbehandlung mit VEGF, die Beeinträchtigung der Revaskularisierung nach fEbeam reduziert werden können. In jedem Fall kann durch eine Evaluation des VEGF während des frühen Remodelings der Revaskularisierungsprozess besser verstanden werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

#### **4.1.2 Myofibroblasten und Kollagenrimp**

Als Myofibroblasten bezeichnet man spezialisierte Fibroblasten. Diese besitzen auf Grund von Aktinfilamenten in der Zellmatrix kontraktile Eigenschaften. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese spezialisierten Zellen die Extrazellulärmatrix und die Wellenlänge des Kollagens (Kollagenrimp) beeinflussen können [20, 95].

Weiler *et al.* untersuchten das Auftreten von Myofibroblasten im Rahmen des Remodelings nach dem VKB Ersatz [96]. Mit dem immunhistologischen Nachweis von  $\alpha$ -SMA positiven Zellen 6 Wochen postoperativ konnten Myofibroblasten im frühen Transplantatremodeling nachgewiesen werden. Diese traten vor allem in neu gebildeten Kollagenbündeln auf. Weiler *et al.* postulierten, dass die Myofibroblasten daher eine Rolle in der Bildung und Reorganisation von Kollagenbündeln spielen.

Auch im Rahmen dieser Studie konnten Myofibroblasten im frühen Transplantatremodeling nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Zunahme der Myofibroblasten bei den fEbeam und FFA von 6 nach 12 Wochen. Eine signifikante Zunahme besteht bei den FFA. In Zusammenhang

mit der Gesamtzellzahl wird besonders bei den fEbeam Transplantaten nach 12 Wochen ein relativ geringer Anteil von Myofibroblasten deutlich. Der Anteil der Myofibroblasten an der Gesamtzellzahl bei den fEbeam Transplantaten nach 6 und 12 Wochen ist gleich, wohingegen bei den FFA der Anteil an Myofibroblasten abnimmt. Ein signifikanter Unterschied zwischen FFA und fEbeam konnte nicht gezeigt werden. Beide Versuchsgruppen haben eine geringere Myofibroblastenzahl als die nativen Strukturen (FSN, VKB nativ). Möglicherweise ist dies durch die initiale Graftnekrose mit Zellapoptose nach Transplantation zu erklären. Demnach ist mit einem Anstieg der Myofibroblasten im weiteren Verlauf zu rechnen.

Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Wellenlänge der fEbeam Transplantate und der FFA von 6 nach 12 Wochen abnimmt. Die Wellenlänge des Kollagens ist jedoch zu beiden Zeitpunkten in der fEbeam Versuchsgruppe niedriger als die der FFA. Nach 12 Wochen zeigt sich der Kollagenrimp der fEbeam Transplantate sogar signifikant niedriger als der FFA. In mehreren Untersuchungen konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl an Myofibroblasten und Kollagenrimp nachgewiesen werden, indem in Arealen mit hoher Myofibroblastendichte eine niedrige Kollagenwellenlänge nachgewiesen wurde [20, 95, 96]. Diesen Zusammenhang konnten wir in dieser Studie nicht bestätigen. Es konnte zwar einen Anstieg der Myofibroblasten von 6 nach 12 Wochen beobachtet werden, jedoch kann damit die deutliche Abnahme der Crimpfrequenz nicht allein erklärt werden. In der FFA Gruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Myofibroblasten und auch eine Abnahme des Kollagenrimps. Dennoch bleibt die Wellenlänge signifikant höher als in der fEbeam Gruppe. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es neben der Myofibroblastenzahl weitere Faktoren gibt die die Crimpstruktur beeinflussen. Der Zusammenhang zwischen Kollagenwellenlänge und Myofibroblastenzahl wurde in einer in-vitro Untersuchung an nativem Sehngewebe nachgewiesen [95]. Möglicherweise beeinflussen mehrere Faktoren während des Remodelings die Kollagenstruktur. Unter anderem scheint eine erhöhte Gesamtzellzahl eine Rolle bei der Bildung des Kollagenrimps zu spielen. In Korrelation dazu wurde in dieser Studie in den Arealen mit beginnender Rezellularisierung eine Abnahme der Crimpfrequenz des Kollagens unabhängig von der Myofibroblastendichte beobachtet.

Eine histologische Untersuchung von Sehmentransplantaten nach Bestrahlung mit Gammastrahlung, Ebeam sowie fraktionierter Ebeam konnte Veränderungen der Kollagenstruktur bereits zum Sterilisationszeitpunkt nachweisen [114]. Diese bestanden unter anderem in einer Veränderung des Kollagenrimps sowie beginnender Trennung der Kollagenbündel in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis [114]. Allerdings handelt es sich bei

dem verwendeten Sehnenmaterial um eine dezellularisierte Sehne. Die Autoren vermuten, dass durch die Entfernung der Zellen, „Freiraum“ entsteht der die Extrazellulärmatrix beeinträchtigt und den Kollagencrimp beeinflusst [114, 115]. Zwar wurde im Rahmen dieser Untersuchung keine fEbeam Transplantate vor Implantation untersucht, dennoch wurde in den zentralen Transplantatbereichen insbesondere nach 6 Wochen eine regelrechte Kollagenstruktur ähnlich der nativen Flexorsehne gesehen. Die Kollagenorientierung nahm mit zunehmenden Umbauprozessen des Transplantates ab, welches sich auch in der niedrigen Crimpfrequenz besonders nach 12 Wochen zeigt. Dadurch kann es zu einer Beeinträchtigung der viskoelastischen Fähigkeiten der Transplantate kommen [81]. Dies kann die mechanische Belastbarkeit der Sehnentransplantate beeinträchtigen und vermutlich ein Transplantatversagen in diesem Zeitraum verursachen. Jannssen *et al.* identifizierte die Desorientierung des Kollagens und die veränderte Crimpfrequenz neben der Zunahme der Vaskularisierung und einer Abnahme der Kollagenfibrillendichte als maßgebliche Faktoren für eine Beeinträchtigung und Schwächung der biomechanischen Eigenschaften [81].

## **4.2 Ergebnisse der Arbeitsgruppe im Zusammenhang**

Durch die ablaufenden Remodelingprozesse werden auch die biomechanischen Eigenschaften der Sehnentransplantate beeinflusst. Als Maß für die Belastbarkeit des vorderen Kreuzbandersatzes gelten in biomechanischen Untersuchungen die Steifigkeit und die Versagenslast. Diese Parameter wurden im Rahmen dieser Studie vor der histologischen Untersuchung erfasst.

Die biomechanischen Untersuchungen analysierten die anterior posteriore Laxizität (vordere Schublade) des Kniegelenkes mit VKB Plastik sowie die Versagenslast und Steifigkeit des Transplantates nach 6 und 12 Wochen.

Die biomechanischen Ergebnisse zeigten eine erhöhte anterior-posteriore Laxizität mit signifikantem Unterschied nach 6 Wochen zwischen fEbeam und FFA. Außerdem zeigten die fEbeams nach 6 und 12 Wochen eine signifikant reduzierte Steifigkeit im Vergleich zu den Fresh Frozen Allografts. Bei den meisten fEbeam Transplantaten konnte nach 6 Wochen kein kompletter Testlauf zur Versagenslast durchgeführt werden, da es zum Herausziehen aus dem femoralen Knochenkanal kam. Nur bei einer Probe konnte ein Testlauf komplett erfolgen. Zum 12 Wochenzeitpunkt hingegen kam es bei allen Transplantaten zur intraartikulären Ruptur. Sowohl Autografts, als auch FFA zeigen zum 6 Wochenzeitpunkt ein Herausziehen des VKB Transplantates und nach 12 Wochen eine intraartikuläre Ruptur bei biomechanischer Testung

[98]. Somit scheint vor allem die intraartikuläre Transplantatheilung beeinträchtigt zu sein und nicht die Knochen-Sehnen Heilung.

Betrachtet man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den histologischen Ergebnissen kann man sagen, dass die starke Zunahme der Gesamtzellzahl, die Beeinträchtigung der Vaskularisierung sowie die reduzierten Crimpfrequenz wie vorher vermutet die biomechanischen Eigenschaften beeinflussen. Der veränderte Remodeling Prozess der fEbeam Transplantate führt zu einer Reduktion der biomechanischen Belastbarkeit. Insbesondere nach 12 Wochen zeigte sich eine stark reduzierte Steifigkeit aller Transplantate vermutlich auf Grund der erhöhten Gesamtzellzahl und den inhomogenen Umbauprozessen mit Abnahme der Crimpfrequenz. Die fraktionierte Bestrahlung mit Ebeam beeinträchtigt also den frühen Ablauf des Remodelings und führt zur wesentlichen Beeinträchtigung der Transplantatbelastbarkeit in-vivo. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu in-vitro Untersuchungen die keine signifikante Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften fraktioniert Ebeam bestrahlter Sehnen zeigen konnten [9, 10, 116].

### **4.3 Limitationen der Studie**

Mit dieser in-vivo Studie am Schafsmodell wurde das frühe Remodeling nach 6 und 12 Wochen Standzeit untersucht. Somit kann keine Aussage über den weiteren Heilungsverlauf getroffen werden. Allerdings strebt man mit aktuellen Rehabilitationsprotokollen eine frühe Mobilisation mit raschem Belastungsaufbau an. So dass Transplantate die in der frühen Remodelingphase eine Beeinträchtigung der biomechanischen Belastbarkeit aufweisen, auch bei guten Langzeitergebnissen keine Alternative für die klinische Anwendung darstellen.

Zur deskriptiven Analyse wurden eine Hämatoxylin-Eosin sowie Masson-Goldner Färbung angefertigt. Diese eignen sich zur Beurteilung von Bindegewebe und der Zellkernmorphologie, allerdings nicht zur ausreichenden Differenzierung von Immunzellen. Außerdem wurde keine Bestimmung von Zytokinen durchgeführt. Dies sollte in weiteren Untersuchungen ergänzt werden um Ursachen für das veränderte Remodeling zu identifizieren.

Bei dem verwendeten Tiermodell handelt es sich um ein etabliertes Modell für die VKB Rekonstruktion, da es funktionell und anatomisch dem menschlichen Kniegelenk ähnelt. Allerdings können Rahmenbedingungen wie Beschränkung des Bewegungsumfanges und eine Teilbelastung des Kniegelenkes, wie es in den Nachbehandlungsschemata in der Humanmedizin üblich ist, nicht durchgesetzt werden. Damit können Einflüsse auf das Remodeling sowie die Knochen-Sehnen-Heilung durch verstärkte Druck- und Schubbelastung nicht ausgeschlossen



werden. Da die Untersuchung sterilisierter und nicht sterilisierter allogener Sehnentransplantate vergleichend im identischen Tiermodell durchgeführt wurden, sollte sich dies auf beide Implantate auswirken, so dass die im Vergleich zu FFAs schlechteren Ergebnisse der fEbeams auch in der Humanmedizin erwartet werden können. In der klinischen Anwendung könnten sich jedoch durch eine Anpassung der Nachbehandlungsschemata und Rehabilitationsprotokolle durchaus bessere mechanische Eigenschaften im Verlauf zeigen. Zudem haben einige Studien gezeigt, dass sich die Ergebnisse aus Tiermodellen nicht direkt auf den Menschen übertragen lassen [79, 88]. Das Remodeling zeigt eine ähnliche Abfolge, allerdings treten insbesondere die Graftnekrose sowie die Vaskularisation nicht so ausgeprägt auf [81]. Jedoch findet das Schafsmodell in tierexperimentellen Untersuchungen in der Kreuzbandchirurgie eine breite Anwendung. Insbesondere der Heilungsverlauf nach VKB Plastik wurde gut untersucht und bietet eine gute Grundlage um die Ergebnisse dieser Studie einzuordnen.

#### **4.4 Schlussfolgerung und klinische Bedeutung**

Die vorliegende Studie ist nach unserer Kenntnis die erste, die das frühe Remodeling von Sehnentransplantaten nach fraktionierter Hochdosis-Ebeam Bestrahlung in-vivo untersucht hat.

Es konnte gezeigt werden, dass das frühe Remodeling in fraktioniert Ebeam bestrahlten allogenen Kreuzbandtransplantaten im Vergleich zu fresh frozen Allografts verändert erfolgt. Insbesondere zum 12 Wochenzeitpunkt zeigte sich eine verstärkte Gesamtzellzahl mit deutlicher Abnahme der Crimpfrequenz des Kollagens. Weiterhin kam es zu einer verzögerten und verändert ablaufenden Revaskularisation. Mit diesen Veränderungen des Sehngewebes durch das Remodeling wurde eine Beeinträchtigung der viskoelastischen Eigenschaften vermutet. Dies wurde in der biomechanischen Testung der Kreuzbandtransplantate bestätigt. In Zusammenhang mit diesen biomechanischen Ergebnissen kann die terminale Sterilisation mit fraktionierten Elektronenstrahlen nicht für die klinische Anwendung empfohlen werden. Insbesondere nicht mit forcierten Rehabilitationsprotokollen, die eine frühere Belastung nach Kreuzbandersatzplastik vorsehen.

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Ursachen zu identifizieren, die das Remodeling nach Bestrahlung beeinflussen. Des Weiteren sind weitere Studien notwendig, um ein geeignetes Sterilisationsverfahren für allogene Sehnentransplantate zu finden.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Girgis FG, Marshall JL, Monajem A. The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis. *Clin Orthop Relat Res.* 1975(106):216-31.
2. Scheffler SU, Scherler J, Pruss A, von Versen R, Weiler A. Biomechanical comparison of human bone-patellar tendon-bone grafts after sterilization with peracetic acid ethanol. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(2):109-15.
3. Dziedzic-Goclawska A, Kaminski A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Stachowicz W. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(3):201-19.
4. Schmidt T, Hoburg A, Broziat C, Smith MD, Gohs U, Pruss A, Scheffler S. Sterilization with electron beam irradiation influences the biomechanical properties and the early remodeling of tendon allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament (ACL). *Cell Tissue Bank.* 2012;13(3):387-400.
5. Scheffler SU, Gonnermann J, Kamp J, Przybilla D, Pruss A. Remodeling of ACL allografts is inhibited by peracetic acid sterilization. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(8):1810-8.
6. Rappe M, Horodyski M, Meister K, Indelicato PA. Nonirradiated versus irradiated Achilles allograft: in vivo failure comparison. *Am J Sports Med.* 2007;35(10):1653-8.
7. Seto A, Gatt CJ, Jr., Dunn MG. Radioprotection of tendon tissue via crosslinking and free radical scavenging. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(8):1788-95.
8. Yusof N. Radiation in Tissue Banking - Basic Science and Clinical Application of Irradiated Tissue Allografts. In: Nather A, editor. Singapore: World Scientific Public Co. Ptc. Ltd. 561; 2006.
9. Hoburg A, Keshlaf S, Schmidt T, Smith M, Gohs U, Perka C, Pruss A, Scheffler S. Fractionation of high-dose electron beam irradiation of BPTB grafts provides significantly improved viscoelastic and structural properties compared to standard gamma irradiation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(11):1955-61.
10. Wei W, Liu Y, Yang X, Tian S, Liu C, Zhang Y, Xu Z, Hu B, Tian Z, Sun K. Fractionation of 50kGy electron beam irradiation: effects on biomechanics of human flexor digitorum superficialis tendons treated with ascorbate. *J Biomech.* 2013;46(4):658-61.
11. Schmidt T, Hoburg AT, Gohs U, Schumann W, Sim-Brandenburg JW, Nitsche A, Scheffler S, Pruss A. Inactivation Effect of Standard and Fractionated Electron Beam Irradiation on Enveloped and Non-Enveloped Viruses in a Tendon Transplant Model. *Transfus Med Hemother.* 2012;39(1):29-35.

12. Ma CM, Pawlicki T, Lee MC, Jiang SB, Li JS, Deng J, Yi B, Mok E, Boyer AL. Energy- and intensity-modulated electron beams for radiotherapy. *Phys Med Biol*. 2000;45(8):2293-311.
13. Menetrey J, Duthon VB, Laumonier T, Fritschy D. "Biological failure" of the anterior cruciate ligament graft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008;16(3):224-31.
14. Petersen W, Tillmann B. [Anatomy and function of the anterior cruciate ligament]. *Orthopade*. 2002;31(8):710-8.
15. Fuss FK. Anatomy of the cruciate ligaments and their function in extension and flexion of the human knee joint. *Am J Anat*. 1989;184(2):165-76.
16. Amis AA, Dawkins GP. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament. Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. *J Bone Joint Surg Br*. 1991;73(2):260-7.
17. Duthon VB, Barea C, Abrassart S, Fasel JH, Fritschy D, Menetrey J. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2006;14(3):204-13.
18. Petersen W, Tillmann B. Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl)*. 1999;200(3):325-34.
19. Markatos K, Kasetta MK, Lалlos SN, Korres DS, Efstathiopoulos N. The anatomy of the ACL and its importance in ACL reconstruction. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2013;23(7):747-52.
20. Murray MM, Spector M. Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells. *J Orthop Res*. 1999;17(1):18-27.
21. Amiel D, Nagineni CN, Choi SH, Lee J. Intrinsic properties of ACL and MCL cells and their responses to growth factors. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(6):844-51.
22. Tsuda E, Okamura Y, Otsuka H, Komatsu T, Tokuya S. Direct evidence of the anterior cruciate ligament-hamstring reflex arc in humans. *Am J Sports Med*. 2001;29(1):83-7.
23. Li G, Rudy TW, Sakane M, Kanamori A, Ma CB, Woo SL. The importance of quadriceps and hamstring muscle loading on knee kinematics and in-situ forces in the ACL. *J Biomech*. 1999;32(4):395-400.
24. Fulton J, Wright K, Kelly M, Zebrosky B, Zanis M, Drvol C, Butler R. Injury risk is altered by previous injury: a systematic review of the literature and presentation of causative neuromuscular factors. *Int J Sports Phys Ther*. 2014;9(5):583-95.
25. Granan LP, Inacio MC, Maletis GB, Funahashi TT, Engebretsen L. Sport-specific injury pattern recorded during anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*. 2013;41(12):2814-8.

26. Welsch F, Köhler K, Buckup, J., Stein T. Komplexe Kniebandinstabilitäten einschließlich Luxation - Teil 1. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date. 2016;11(05):379-403.
27. Adriani E, Summa P, Paola BD. Pre-operative planning in anterior cruciate ligament reconstruction revision surgery. 2013.
28. Parkkari J, Pasanen K, Mattila VM, Kannus P, Rimpela A. The risk for a cruciate ligament injury of the knee in adolescents and young adults: a population-based cohort study of 46 500 people with a 9 year follow-up. *Br J Sports Med.* 2008;42(6):422-6.
29. Gianotti SM, Marshall SW, Hume PA, Bunt L. Incidence of anterior cruciate ligament injury and other knee ligament injuries: a national population-based study. *J Sci Med Sport.* 2009;12(6):622-7.
30. Hewett TE. Neuromuscular and hormonal factors associated with knee injuries in female athletes. Strategies for intervention. *Sports Med.* 2000;29(5):313-27.
31. Prodromos CC, Han Y, Rogowski J, Joyce B, Shi K. A meta-analysis of the incidence of anterior cruciate ligament tears as a function of gender, sport, and a knee injury-reduction regimen. *Arthroscopy.* 2007;23(12):1320-5.e6.
32. Oiestad BE, Engebretsen L, Storheim K, Risberg MA. Knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury: a systematic review. *Am J Sports Med.* 2009;37(7):1434-43.
33. Olsen OE, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R. Injury mechanisms for anterior cruciate ligament injuries in team handball: a systematic video analysis. *Am J Sports Med.* 2004;32(4):1002-12.
34. Boden BP, Dean GS, Feagin JA, Jr., Garrett WE, Jr. Mechanisms of anterior cruciate ligament injury. *Orthopedics.* 2000;23(6):573-8.
35. Koga H, Nakamae A, Shima Y, Iwasa J, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R, Krosshaug T. Mechanisms for noncontact anterior cruciate ligament injuries: knee joint kinematics in 10 injury situations from female team handball and basketball. *Am J Sports Med.* 2010;38(11):2218-25.
36. Mall NA, Chalmers PN, Moric M, Tanaka MJ, Cole BJ, Bach BR, Jr., Paletta GA, Jr. Incidence and trends of anterior cruciate ligament reconstruction in the United States. *Am J Sports Med.* 2014;42(10):2363-70.
37. Murawski CD, van Eck CF, Irrgang JJ, Tashman S, Fu FH. Operative treatment of primary anterior cruciate ligament rupture in adults. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(8):685-94.
38. Linko E, Harilainen A, Malmivaara A, Seitsalo S. Surgical versus conservative interventions for anterior cruciate ligament ruptures in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005(2):Cd001356.

39. Robson AW. VI. Ruptured Crucial Ligaments and their Repair by Operation. *Ann Surg.* 1903;37(5):716-8.
40. Marshall JL, Warren RF, Wickiewicz TL, Reider B. The anterior cruciate ligament: a technique of repair and reconstruction. *Clin Orthop Relat Res.* 1979(143):97-106.
41. Kiapour AM, Murray MM. Basic science of anterior cruciate ligament injury and repair. *Bone Joint Res.* 2014;3(2):20-31.
42. Hey-Groves EW. THE USE OF FASCIAL AND TENDON GRAFTS IN CERTAIN FRACTURES AND DISLOCATIONS. *Ann Surg.* 1934;100(1):20-9.
43. Samuelsson K, Andersson D, Ahlden M, Fu FH, Musahl V, Karlsson J. Trends in surgeon preferences on anterior cruciate ligament reconstructive techniques. *Clin Sports Med.* 2013;32(1):111-26.
44. Ryan J, Magnussen RA, Cox CL, Hurbanek JG, Flanigan DC, Kaeding CC. ACL reconstruction: do outcomes differ by sex? A systematic review. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(6):507-12.
45. Johnson DL, Coen MJ. Revision ACL surgery. Etiology, indications, techniques, and results. *Am J Knee Surg.* 1995;8(4):155-67.
46. Giedraitis A, Arnoczky SP, Bedi A. Allografts in soft tissue reconstructive procedures: important considerations. *Sports Health.* 2014;6(3):256-64.
47. Shafizadeh S, Jaecker V, Otchwemah R, Banerjee M, Naendrup JH. Current status of ACL reconstruction in Germany. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2016;136(5):593-603.
48. Papageorgiou CD, Ma CB, Abramowitch SD, Clineff TD, Woo SL. A multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model. *The American journal of sports medicine.* 2001;29(5):620-6.
49. Papandrea P, Vulpiani MC, Ferretti A, Conteduca F. Regeneration of the semitendinosus tendon harvested for anterior cruciate ligament reconstruction. Evaluation using ultrasonography. *Am J Sports Med.* 2000;28(4):556-61.
50. Rispoli DM, Sanders TG, Miller MD, Morrison WB. Magnetic resonance imaging at different time periods following hamstring harvest for anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 2001;17(1):2-8.
51. Papalia R, Franceschi F, D'Adamio S, Diaz Balzani L, Maffulli N, Denaro V. Hamstring Tendon Regeneration After Harvest for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Systematic Review. *Arthroscopy.* 2015;31(6):1169-83.

52. Carey JL, Dunn WR, Dahm DL, Zeger SL, Spindler KP. A systematic review of anterior cruciate ligament reconstruction with autograft compared with allograft. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(9):2242-50.
53. Zeng C, Gao SG, Li H, Yang T, Luo W, Li YS, Lei GH. Autograft Versus Allograft in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials and Systematic Review of Overlapping Systematic Reviews. *Arthroscopy.* 2016;32(1):153-63.e18.
54. van Eck CF, Schkrohowsky JG, Working ZM, Irrgang JJ, Fu FH. Prospective analysis of failure rate and predictors of failure after anatomic anterior cruciate ligament reconstruction with allograft. *Am J Sports Med.* 2012;40(4):800-7.
55. Ellis HB, Matheny LM, Briggs KK, Pennock AT, Steadman JR. Outcomes and revision rate after bone-patellar tendon-bone allograft versus autograft anterior cruciate ligament reconstruction in patients aged 18 years or younger with closed physes. *Arthroscopy.* 2012;28(12):1819-25.
56. Kane PW, Wascher J, Dodson CC, Hammoud S, Cohen SB, Ciccotti MG. Anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone autograft versus allograft in skeletally mature patients aged 25 years or younger. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA.* 2016;24(11):3627-33.
57. Jost PW, Dy CJ, Robertson CM, Kelly AM. Allograft use in anterior cruciate ligament reconstruction. *Hss j.* 2011;7(3):251-6.
58. Budny J, Fox J, Rauh M, Fineberg M. Emerging Trends in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *J Knee Surg.* 2017;30(1):63-9.
59. Cohen SB, Sekiya JK. Allograft safety in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Sports Med.* 2007;26(4):597-605.
60. Vangsness CT, Jr., Garcia IA, Mills CR, Kainer MA, Roberts MR, Moore TM. Allograft transplantation in the knee: tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. *Am J Sports Med.* 2003;31(3):474-81.
61. Jackson DW, Grood ES, Goldstein JD, Rosen MA, Kurzweil PR, Cummings JF, Simon TM. A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med.* 1993;21(2):176-85.
62. Pujji O, Keswani N, Collier N, Black M, Doos L. Evaluating the Functional Results and Complications of Autograft vs Allograft Use for Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament: A Systematic Review. 2017.

63. Hinsenkamp M, Muylle L, Eastlund T, Fehily D, Noel L, Strong DM. Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *Int Orthop*. 2012;36(3):633-41.
64. Bhatia S, Bell R, Frank RM, Rodeo SA, Bach BR, Jr., Cole BJ, Chubinskaya S, Wang VM, Verma NN. Bony incorporation of soft tissue anterior cruciate ligament grafts in an animal model: autograft versus allograft with low-dose gamma irradiation. *Am J Sports Med*. 2012;40(8):1789-98.
65. Greenberg DD, Robertson M, Vallurupalli S, White RA, Allen WC. Allograft compared with autograft infection rates in primary anterior cruciate ligament reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(14):2402-8.
66. Pruss A, von Versen R. [Influence of European regulations on quality, safety and availability of cell and tissue allografts in Germany]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2007;39(2):81-7.
67. Delgado LM, Pandit A, Zeugolis DI. Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties. *Expert Rev Med Devices*. 2014;11(3):305-14.
68. Jackson DW, Windler GE, Simon TM. Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patella tendon-bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med*. 1990;18(1):1-10; discussion -1.
69. Roberts TS, Drez D, Jr., McCarthy W, Paine R. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med*. 1991;19(1):35-41.
70. Fideler BM, Vangness CT, Jr., Moore T, Li Z, Rasheed S. Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(7):1032-5.
71. Pruss A, Hansen A, Kao M, Gurtler L, Pauli G, Benedix F, Von Versen R. Comparison of the efficacy of virus inactivation methods in allogeneic avital bone tissue transplants. *Cell Tissue Bank*. 2001;2(4):201-15.
72. Hoburg A, Keshlaf S, Schmidt T, Smith M, Gohs U, Perka C, Pruss A, Scheffler S. High-dose electron beam sterilization of soft-tissue grafts maintains significantly improved biomechanical properties compared to standard gamma treatment. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(2):219-26.
73. Gerbi BJ, Antolak JA, Deibel FC, Followill DS, Herman MG, Higgins PD, Huq MS, Mihailidis DN, Yorke ED, Hogstrom KR, Khan FM. Recommendations for clinical electron

- beam dosimetry: supplement to the recommendations of Task Group 25. *Med Phys.* 2009;36(7):3239-79.
74. Hoburg AT, Keshlaf S, Schmidt T, Smith M, Gohs U, Perka C, Pruss A, Scheffler S. Effect of electron beam irradiation on biomechanical properties of patellar tendon allografts in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1134-40.
75. Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res.* 1984;1(3):257-65.
76. Bosch U, Kasperczyk WJ. Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction--a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model. *Am J Sports Med.* 1992;20(5):558-66.
77. Marumo K, Saito M, Yamagishi T, Fujii K. The "ligamentization" process in human anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar and hamstring tendons: a biochemical study. *Am J Sports Med.* 2005;33(8):1166-73.
78. Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH. The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res.* 1986;4(2):162-72.
79. Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A. Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008;16(9):834-42.
80. Kleiner JB, Amiel D, Roux RD, Akeson WH. Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft. *J Orthop Res.* 1986;4(4):466-74.
81. Janssen RP, Scheffler SU. Intra-articular remodelling of hamstring tendon grafts after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014;22(9):2102-8.
82. Goradia VK, Rochat MC, Grana WA, Rohrer MD, Prasad HS. Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model. *Am J Knee Surg.* 2000;13(3):143-51.
83. Jackson JR, Minton JA, Ho ML, Wei N, Winkler JD. Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta. *J Rheumatol.* 1997;24(7):1253-9.
84. Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Mizuno K. Localization of growth factors in the reconstructed anterior cruciate ligament: immunohistological study in dogs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2000;8(2):120-6.



85. Unterhauser FN, Bail HJ, Hoher J, Haas NP, Weiler A. Endoligamentous revascularization of an anterior cruciate ligament graft. *Clin Orthop Relat Res.* 2003(414):276-88.
86. Weiler A, Peters G, Maurer J, Unterhauser FN, Sudkamp NP. 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.* 2001;29(6):751-61.
87. Johnson LL. The outcome of a free autogenous semitendinosus tendon graft in human anterior cruciate reconstructive surgery: a histological study. *Arthroscopy.* 1993;9(2):131-42.
88. Janssen RP, van der Wijk J, Fiedler A, Schmidt T, Sala HA, Scheffler SU. Remodelling of human hamstring autografts after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(8):1299-306.
89. Rougraff BT, Shelbourne KD. Early histologic appearance of human patellar tendon autografts used for anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1999;7(1):9-14.
90. Zaffagnini S, De Pasquale V, Marchesini Reggiani L, Russo A, Agati P, Bacchelli B, Marcacci M. Neoligamentization process of BTPB used for ACL graft: histological evaluation from 6 months to 10 years. *Knee.* 2007;14(2):87-93.
91. Unterhauser FN, Bosch U, Zeichen J, Weiler A. Alpha-smooth muscle actin containing contractile fibroblastic cells in human knee arthrofibrosis tissue. Winner of the AGA-DonJoy Award 2003. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2004;124(9):585-91.
92. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 1990;63(1):21-9.
93. Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(2):141-7.
94. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res.* 1999;250(2):273-83.
95. Weiss M, Unterhauser FN, Weiler A. Crimp frequency is strongly correlated to myofibroblast density in the human anterior cruciate ligament and its autologous tendon grafts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(5):889-95.
96. Weiler A, Unterhauser FN, Bail HJ, Huning M, Haas NP. Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *J Orthop Res.* 2002;20(2):310-7.
97. Murray MM, Martin SD, Martin TL, Spector M. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *J Bone Joint Surg Am.* 2000;82-a(10):1387-97.

98. Dustmann M, Schmidt T, Gangey I, Unterhauser FN, Weiler A, Scheffler SU. 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.* 2008;16(4):360-9.
99. Arnoczky SP, Rubin RM, Marshall JL. Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1979;61(8):1221-9.
100. 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.* 1986;68(3):376-85.
101. Benedetto KP, Klima G. [Effect of the Hoffa fat pad on revascularization of the ruptured anterior cruciate ligament. A histologic study of the rabbit model]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1986;124(3):262-5.
102. Falconiero RP, DiStefano VJ, Cook TM. Revascularization and ligamentization of autogenous anterior cruciate ligament grafts in humans. *Arthroscopy.* 1998;14(2):197-205.
103. Scheffler SU, Schmidt T, Gangey I, Dustmann M, Unterhauser F, Weiler A. 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.* 2008;24(4):448-58.
104. Allen MJ, Houlton JE, Adams SB, Rushton N. The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg.* 1998;27(6):596-605.
105. Hunt P, Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A. A model of soft-tissue graft anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005;125(4):238-48.
106. Lang G. *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*: Lang, Gudrun; 2006.
107. Kaplan DJ, Cuellar VG, Jazrawi LM, Strauss EJ. Biomarker Changes in Anterior Cruciate Ligament-Deficient Knees Compared With Healthy Controls. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association.* 2017;33(5):1053-61.
108. Larsson S, Struglics A, Lohmander LS, Frobell R. Surgical reconstruction of ruptured anterior cruciate ligament prolongs trauma-induced increase of inflammatory cytokines in synovial fluid: an exploratory analysis in the KANON trial. *Osteoarthritis and cartilage.* 2017;25(9):1443-51.

109. Seto AU, Culp BM, Gatt CJ, Jr., Dunn M. Radioprotection provides functional mechanics but delays healing of irradiated tendon allografts after ACL reconstruction in sheep. *Cell Tissue Bank*. 2013;14(4):655-65.
110. Xie GM, Huang Fu XQ, Zhao JZ. The effect of remnant preservation on patterns of gene expression in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J Surg Res*. 2012;176(2):510-6.
111. Song GY, Zhang J, Li X, Li Y, Feng H. Biomechanical and Biological Findings Between Acute Anterior Cruciate Ligament Reconstruction With and Without an Augmented Remnant Repair: A Comparative in Vivo Animal Study. *Arthroscopy*. 2016;32(2):307-19.
112. Russo V, Mauro A, Martelli A, Di Giacinto O, Di Marcantonio L, Nardinocchi D, Berardinelli P, Barboni B. Cellular and molecular maturation in fetal and adult ovine calcaneal tendons. *J Anat*. 2015;226(2):126-42.
113. Chen J, Yang L, Guo L, Duan X. Sodium hyaluronate as a drug-release system for VEGF 165 improves graft revascularization in anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Exp Ther Med*. 2012;4(3):430-4.
114. Edwards JH, Herbert A, Jones GL, Manfield IW, Fisher J, Ingham E. The effects of irradiation on the biological and biomechanical properties of an acellular porcine superflexor tendon graft for cruciate ligament repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016.
115. Herbert A, Edwards JH, Jones GL, Ingham E, Fisher J. The effects of irradiation dose and storage time following treatment on the viscoelastic properties of decellularised porcine super flexor tendon. *Journal of biomechanics*. 2017;57:157-60.
116. Elenes EY, Hunter SA. Soft-tissue allografts terminally sterilized with an electron beam are biomechanically equivalent to aseptic, nonsterilized tendons. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(16):1321-6.

## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Rotation des vorderen Kreuzbandes in der Längsachse bei zunehmender Flexion.....	6
Abbildung 2 Merino-Mix Schafe in der Stallung der tiermedizinischen Einrichtung der Charité – Universitätsmedizin Berlin.....	19
Abbildung 3 schematische Darstellung des Bestrahlungsvorganges .....	22
Abbildung 4 Darstellung der präparierten Sehne des Musculus flexorum superficialis.....	23
Abbildung 5 Präparation des Transplantates in Baseballstich-Technik.....	24
Abbildung 6 Darstellung des Operationsablaufs.....	25
Abbildung 7 Schematische Darstellung der indirekten Immunhistologie .....	30
Abbildung 8 Übersichtsfärbung der nativen Strukturen .....	36
Abbildung 9 Übersichtsfärbung der FFA.....	37
Abbildung 10 Übersichtsfärbung der fEbeam Transplantate .....	38
Abbildung 11 alphaSMA-Immunhistologie.....	40
Abbildung 12 Zellen/mm <sup>2</sup> der einzelnen Versuchsgruppen.....	41
Abbildung 13 Darstellung der Myofibroblasten/mm <sup>2</sup> aller Vergleichsgruppen .....	42
Abbildung 14 Darstellung des Anteils von Myofibroblasten an der Gesamtzellzahl .....	44
Abbildung 15 FVIII-Immunhistologie .....	45
Abbildung 16 Gefäßanzahl/mm <sup>2</sup> der einzelnen Versuchsgruppen.....	46
Abbildung 17 Polarisationsmikroskopie .....	48
Abbildung 18 Darstellung der Wellenlänge in mm aller Vergleichsgruppen .....	49

### 6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die Versuchsgruppen. ....	20
Tabelle 2 Verweildauer der Proben in dem Entwässerungsautomaten .....	27
Tabelle 3 Darstellung des Ablaufs zur Hämatoxylin-Eosin Färbung. ....	28
Tabelle 4 Darstellung des Ablaufs zu Masson- Goldner Trichromfärbung .....	29

### 6.3. Geräte und Materialien

#### Geräte:

Gerät	Hersteller
Entwässerungsautomat Leica TP 1020	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Kühlplatte Leica EG1130	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2125	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Mikroskop Leica DMRB	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Kamera AxioCam MRc	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Paraffinspender Leica EG 1120	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

#### Chemikalien:

Substanz	Hersteller
Alkalische Phosphatase Substrat Kit, Cat.SK-5100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Alkohol	Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Antibody Diluent	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Anti-FVIII made in rabbit, Cat.CP039 B	Biocare Medical, Pike Lane, CA, USA
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
biotinylated anti mouse IgG made in horse, BA-2001	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
biotinylated anti-rabbit made in goat, BA-1000	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA.
Formalin 4%	Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Hämatoxylin, Papanicolaous Lösung 1a Harris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lichtgrün	Waldeck GmbH & Co. KG Division Chroma ®, Münster, Deutschland
Mayers Hämalaun Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normal Goat Serum, S-1000	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Normal Horse Serum, S-2000	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Orange G Differenzierungslösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pepsin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Phosphatpufferlösung pH 7,2	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Salzsäure (HCL) 1 N	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Säurefuchsin	Waldeck GmbH & Co. KG Division Chroma ®, Münster, Deutschland
Trizma®Hydrochloride T-3253	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Trizma®T-1503	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Vitro-Clud®	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Weigerts Eisenhämatoxylin	Waldeck GmbH & Co. KG Division Chroma ®, Münster, Deutschland
Xylol	J.T.Baker®, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA

## Arzneimittel:

<b>Medikament</b>	<b>Hersteller</b>
Fasinex® 10%	Novartis GmbH, München, Deutschland
Fentanyl Curamed	Actavis Switzerland AG, Regensdorf, Schweiz
Flunixin	Norbrook Laboratories Ltd., Monaghan, Irland
Isofluran Baxter	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumchlorid-Lösung (1M)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Natriumchlorid-Infusionslösung 154	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
Panacur®	MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, München
Thiopental-Rotexmedica	Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland
Unacid® 3 g	Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Germany

**Weitere Materialien:**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Braunol®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland.
Endobutton® CL Ultra	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethibond Excel 2-0	Johnson & Johnsen Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland
Hi-Lo Lanz Tracheal Tube™,	Mallinckrodt Medical, Dublin, Irland
HistoBond® adhäsive Objektträger	Marienfeld superior GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Paraplast Plus®	Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA
Prolene 2-0	Johnson & Johnsen Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland
Tissue Tek	Miles Limited, Slough, England
Vasofix® Safety 18G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vicryl 1-0	Johnson & Johnsen Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland
Vicryl 3-0	Johnson & Johnsen Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland.

**Software:**

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
Axio Vision V4.8	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena, Germany
Image J 1,47	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
SPSS V22	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elsa Dominique Grabau, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Histologische Untersuchung des frühen Remodeling allogener Kreuzbandtransplantate nach Sterilisation mit fraktionierter Elektronenstrahlung am in-vivo Schafsmodell“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



## 7.1. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Elsa Dominique Grabau hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Schmidt T, Grabau D, Grotewohl JH, Gohs U, Pruß A, Smith M, Scheffler S, Hoburg A: *Does sterilization with fractionated electron beam irradiation prevent ACL tendon allograft from tissue damage?* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2017) 25: 584. doi:10.1007/s00167-016-4240-9

Beitrag im Einzelnen:

Unterstützung der Durchführung der tierexperimentellen Studie, Aufarbeitung des Gewebes und Anfertigung der histologischen Färbungen, histologische Auswertung, Gegenlesen des Manuskriptes.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **8. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektrischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 9. Publikationsliste

Schmidt T, Grabau D, Grotewohl JH, Gohs U, Pruß A, Smith M, Scheffler S, Hoburg A: *Does sterilization with fractionated electron beam irradiation prevent ACL tendon allograft from tissue damage?* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2017) 25: 584. doi:10.1007/s00167-016-4240-9

## 10.Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Sven Scheffler für die freundliche Überlassung dieses Themas und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. med. Arndt Hoburg für die Zusammenarbeit bei der operativen Versorgung unserer Versuchstiere sowie Anregungen beim Erstellen dieser Arbeit. Danke an meinen Kommilitonen Jan Grotewohl für die Zusammenarbeit während der Versorgung unserer Schafe. Für die Unterstützung, die Geduld beim Beibringen der histologischen Arbeitstechniken und den ein oder anderen Tipp bei der Aufarbeitung der Proben bedanke ich mich herzlich bei Frau Gabriele Hardung.

Meiner Betreuerin, Dr. vet. Tanja Schmidt, möchte ich an dieser Stelle besonders danken. Ohne ihren Zuspruch, die rasche Kommunikation und die gute Zusammenarbeit in allen Phasen dieser Arbeit hätte ich sie wohl niemals fertigstellen können.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern für das Vertrauen und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Ebenfalls danke ich Patrick und Katja für die konstruktive Kritik und die Mühe beim Lesen dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei Stefan bedanken, für die Geduld und den liebevollen Zuspruch in all den Jahren.