

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung des frühen Bandremodelings  
von allogenen Bandtransplantaten als Ersatz des  
vorderen Kreuzbandes nach Sterilisation mit dem  
Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren

– eine tierexperimentelle Studie am Schafsmodell –

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Evi-Katrin Kamp

aus Erlangen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. N. P. Haas  
2. Priv.-Doz. Dr. med. R. Becker  
3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Jacob

Datum der Promotion: 14. Juni 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation . . . . .	1
1.2	Anatomie des vorderen Kreuzbandes . . . . .	2
1.2.1	Makroskopie . . . . .	2
1.2.2	Mikroskopie . . . . .	3
1.2.2.1	Zellen . . . . .	3
1.2.2.2	Extrazellulärmatrix . . . . .	4
1.2.2.3	Gefäßversorgung und Innervation . . . . .	7
1.2.3	Funktion . . . . .	8
1.3	Kreuzbandverletzungen . . . . .	9
1.3.1	Verletzungsmechanismen . . . . .	9
1.3.2	Therapie . . . . .	10
1.3.2.1	Entwicklung bis zum heutigen Stand . . . . .	10
1.3.2.2	Transplantate in der VKB-Chirurgie . . . . .	11
1.4	Allografts als VKB-Ersatz . . . . .	12
1.5	Sterilisationsverfahren für Allografts . . . . .	14
1.5.1	Übersicht der aktuellen Sterilisationsverfahren . . . . .	14
1.5.2	Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren . . . . .	15
1.6	Transplantatremodeling . . . . .	16
1.6.1	Begriffsklärung . . . . .	16
1.6.2	Phasen . . . . .	17
1.6.3	Rolle der Myofibroblasten . . . . .	18
1.7	Fragestellung und Zielsetzung . . . . .	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Studienaufbau . . . . .	21
2.2	Operatives Vorgehen . . . . .	22
2.2.1	Anästhesie . . . . .	22

2.2.2	Operationsverfahren . . . . .	23
2.2.3	Postoperative Nachsorge . . . . .	26
2.3	Gewebeentnahme . . . . .	27
2.4	Histologische Arbeitsmethoden . . . . .	28
2.4.1	Aufarbeitung des Gewebes . . . . .	28
2.4.2	Färbemethoden . . . . .	28
2.4.2.1	Konventionell . . . . .	28
2.4.2.2	Immunhistochemisch . . . . .	29
2.4.3	Polarisationsmikroskopie . . . . .	32
2.5	Kollagenanalyse . . . . .	32
2.5.1	Aufarbeitung des Materials . . . . .	33
2.5.2	Proteinspaltung mittels Bromzyan . . . . .	34
2.5.3	Gelelektrophorese . . . . .	35
2.5.4	Silberfärbung . . . . .	36
2.6	Auswertung der Daten . . . . .	37
2.6.1	Zellen (deskriptiv und quantitativ) . . . . .	37
2.6.2	Myofibroblasten (deskriptiv) . . . . .	37
2.6.3	Kollagenrimp (deskriptiv und quantitativ) . . . . .	38
2.6.4	Kollagentypisierung . . . . .	39
2.6.5	Statistik . . . . .	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Zellen . . . . .	41
3.2	Myofibroblasten . . . . .	47
3.3	Kollagenrimp . . . . .	51
3.4	Kollagentypisierung . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	Sterilisationsverfahren . . . . .	59
4.2	Sterilisiertes Sehnentransplantat – Zeitpunkt Null . . . . .	60
4.3	Remodeling . . . . .	61
4.3.1	Myofibroblasten . . . . .	65
4.3.2	Kollagenverteilung . . . . .	66

4.4	Limitierungen der Studie . . . . .	68
4.5	Ergebnisse der gesamten Arbeitsgruppe im Zusammenhang . . . . .	70
4.6	Schlussfolgerung . . . . .	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung</b>	<b>92</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Anatomie des Knies . . . . .	3
1.2	Fibrillogenese . . . . .	5
1.3	Kollagentertiärstruktur (Crimp) . . . . .	6
1.4	Funktion des vorderen Kreuzbandes . . . . .	8
1.5	Chemische Formel der Peressigsäure . . . . .	16
1.6	Myofibroblastendifferenzierung . . . . .	19
2.1	Versuchstiere . . . . .	22
2.2	Anatomie des Transplantats . . . . .	24
2.3	Operation . . . . .	25
2.4	Transplantatverankerung . . . . .	26
2.5	ABC-Methode . . . . .	30
2.6	Silberfärbung nach Klose . . . . .	36
2.7	Densitometrische Auswertung der Kollagenspaltprodukte . . . . .	39
3.1	Zellen zum Zeitpunkt 0 . . . . .	42
3.2	Zellen: Autograft, nicht-sterilisiertes Allograft und PES-sterilisiertes Transplantat nach 6 Wochen . . . . .	43
3.3	Zellen: PES-sterilisiertes Transplantat nach 6 und 12 Wochen . . . . .	45
3.4	Diagramm: Auswertung der Gesamtzellzahl . . . . .	46
3.5	Myofibroblasten zum Zeitpunkt 0 . . . . .	47
3.6	Myofibroblasten nach 6 Wochen: Autograft, nicht-sterilisiertes Allograft und PES- sterilisiertes Transplantat . . . . .	49
3.7	Myofibroblasten nach 12 Wochen . . . . .	50
3.8	Kollagencrimp zum Zeitpunkt 0 . . . . .	52
3.9	Kollagencrimp nach 6 Wochen . . . . .	53
3.10	Kollagencrimp nach 12 Wochen . . . . .	54
3.11	Diagramm: Auswertung des Kollagencrimps . . . . .	55
3.12	Diagramm: Auswertung der Kollagentypisierung . . . . .	57

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Während der vergangenen Jahre ist die Nachfrage nach allogenen Transplantaten in der Kreuzbandchirurgie deutlich angestiegen. In den Industrieländern wird derzeit in ca. einem Fall pro 1000 Einwohner pro Jahr eine Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes (VKB) durchgeführt [95]. Im angloamerikanischen Raum werden bei ca. 30 % dieser Eingriffe allogene Transplantate verwendet [56]. Grund hierfür sind erweiterte Indikationsstellungen, aber auch verbesserte OP-Methoden [66, 136]. So werden allogene VKB-Transplantate nicht mehr traditionell bei Revisionseingriffen bzw. multiplen Bandverletzungen, sondern zunehmend auch als primärer Ersatz des vorderen Kreuzbandes bei jungen Patienten und Leistungssportlern eingesetzt [152].

In Deutschland wird nur bei ca. 1 % der Eingriffe auf allogene Transplantate zurückgegriffen. Große Probleme bezüglich der Verfügbarkeit von Allografts machen es bisher nicht möglich, diese Alternative zum autologen Bandersatz häufiger zu nutzen. Bisher existiert kein kommerzieller Vertrieb von humanem Sehngewebe, die Bereitschaft zur Organspende ist nur begrenzt vorhanden und vor allem erschweren die rechtlichen Auflagen die Nutzung von nicht-sterilisiertem Spendergewebe erheblich. Zusätzlich stellt die potentielle Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten wie Hepatitis und HIV durch das Spendergewebe bzw. durch Verunreinigungen während der Entnahme und den Transportprozessen ein Problem dar [157]. Um ein solches Infektionsrisiko minimieren oder eliminieren zu können und dadurch eine Verbesserung der Verfügbarkeit erreichen zu können, kommt der Sterilisation von humanem Spendergewebe eine herausragende Bedeutung zu. Es existieren eine Vielzahl von Sterilisationsverfahren, die jedoch alle mit Nachteilen für die biomechanischen oder biologischen Eigenschaften assoziiert sind bzw. keinen kompletten Schutz gegen bakterielle und virale Erreger bieten [48, 89, 104].

Das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren ist ein etabliertes Verfahren zur Sterilisation von knöchernen Allografts. Nachteilige Auswirkungen auf die Mechanik und die Biologie konnten nicht gefunden werden [117, 116]. Seit den 80er Jahren ist das Verfahren auch für die Sterilisation von Patellar- und Achillessehnen zugelassen, obwohl bisher weder in-vitro, noch in-vivo Analysen

existieren. Erste Untersuchungen in einer in-vitro Studie in unserem Haus zeigten keinen nachteiligen Effekt der Peressigsäure auf die mechanischen Eigenschaften von humanen bone-patellar tendon-bone-Transplantaten (BPTB-Transplantat) [129]. Daraufhin erfolgte der Schritt zur in-vivo Studie, um Auswirkungen des Verfahrens auf die biologischen Einheilungsprozesse und das Remodeling nach VKB-Ersatz umfassend zu erforschen. Anhand der von uns durchgeführten experimentellen Studie soll diese Fragestellung nun im Tiermodell genauer beleuchtet werden. Sie soll klären, ob das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren in Zukunft zur Sterilisation von allogenen VKB-Transplantaten beim Menschen zum Einsatz kommen könnte.

## **1.2 Anatomie des vorderen Kreuzbandes**

### **1.2.1 Makroskopie**

Die beiden Kreuzbänder, vorderes Kreuzband (VKB) und hinteres Kreuzband (HKB), gehören zu den sogenannten Binnenbändern des Knies und stellen eine intraartikuläre Verbindung zwischen dem Femur und der Tibia dar. Sie befinden sich innerhalb der Gelenkkapsel, also intrakapsulär, aber extrasynovial, da sie außerhalb der von Synovia bekleideten Gelenkhöhle liegen. An der anterioren und lateralen Seite werden sie aber von Synovia überzogen [130], sie sind also von einer Synovialmembran umgeben.

Das VKB entspringt vom dorsalen Drittel der Innenfläche des Condylus ossis femoris lateralis mit einem halbmondförmigen Insertionsareal. Vor dem HKB zieht es nach distal-anterior-medial durch die Fossa intercondylaris zu seinem Ansatz auf dem Tibiaplateau. Die meisten Fasern inserieren anterolateral des Tuberculum intercondylare mediale, einige ziehen jedoch bis unter das Ligamentum transversum genus. Das VKB ist also kein einzelner Strang. Es besteht aus einer Vielzahl von einzelnen Faserbündeln, die in der Literatur bezüglich Anzahl und Ausrichtung unterschiedlich beschrieben werden. Die meisten Autoren sprechen jedoch von einem anteriomedialen und einem posterolateralen Bündel. Die Fasern des anteromedialen Bündels entspringen am proximalen Teil des femoralen Ansatzes und inserieren am anteromedialen Anteil des tibialen Ansatzareales. Dem posterolateralen Bündel gehören dagegen die Fasern an, die tibial posterolateral inserieren [11, 165].

Die Maße des VKBs werden in der Literatur uneinheitlich angegeben. Insbesondere bezüglich der

Länge, hier wurden Untersuchungsergebnisse publiziert, die von 31 bis 41 mm reichen [57, 65, 102, 111]. Die Querschnittsfläche beträgt femoral ca. 113 mm<sup>2</sup>, tibial ca. 136 mm<sup>2</sup> und ist an den beiden Ansatzstellen am größten. Im mittleren Drittel des Bandes ist der Durchmesser geringer. Girgis et al. fanden heraus, dass dieser im Durchschnitt 11,1 mm beträgt [57].

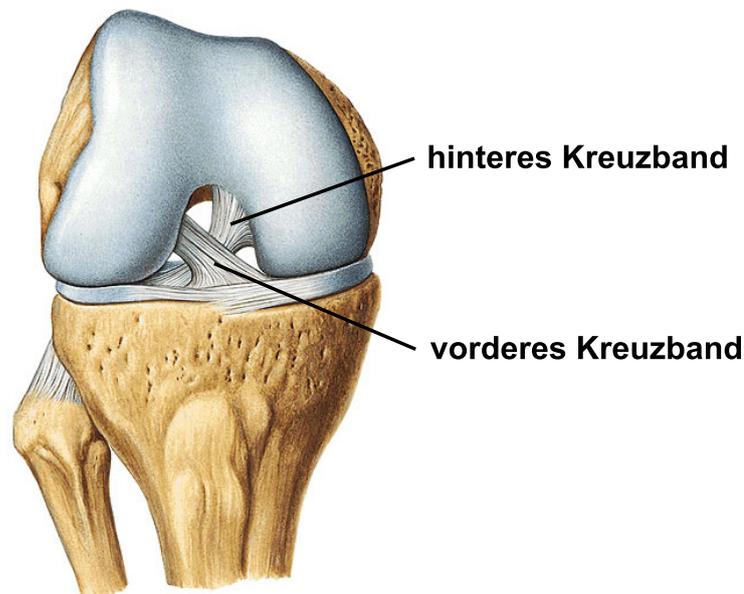


Abb. 1.1: Anatomie des humanen Kniegelenkes aus [118].

## 1.2.2 Mikroskopie

### 1.2.2.1 Zellen

Da es sich bei Bändern und Sehnen um straffes kollagenes Bindegewebe handelt, sind Fibroblasten und Fibrozyten die am häufigsten vorkommende Zellart. Sie sind ortsständige Zellen und liegen perlschnurartig entlang der langen, parallel verlaufenden Kollagenfasern. Man unterscheidet die sekretorisch inaktive und die aktive Form. Die inaktive Form ist der Fibrozyt, der von spindelförmiger Gestalt ist. Die aktiven Fibroblasten sind dagegen rund bis ovoid und dienen der Bildung und Abgabe des Materials für die Interzellulärsubstanzen. Außerdem sind sie auch am Abbau der Extrazellulärmatrix beteiligt, was im Rahmen des Remodelings nach Ersatz des VKBs durch eine Sehne zu beobachten ist. Mit Hilfe von sezernierenden Kollagenasen sind sie in der Lage, das Sehngewebe abzubauen, und es durch ein neu gebildetes Kollagengerüst zu ersetzen [5, 78, 167, 171].

Desweiteren findet man in Band- und Sehngewebe freie Bindegewebszellen, die die Aufgabe der Abwehr gegen Fremdkörper, Bakterien und Toxine erfüllen. Zu ihnen zählen Mastzellen, Makrophagen, Leukozyten und Plasmazellen. Sie kommen in unterschiedlicher Verteilung im Bindegewebe vor [78].

### 1.2.2.2 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix (EZM) oder auch Interzellulärsubstanz von Bindegewebe besteht hauptsächlich aus Fasern und amorpher Grundsubstanz. Je nach Art des Bindegewebes kommen diese in unterschiedlicher Verteilung vor, gebildet werden sie von Fibroblasten und Fibrozyten.

Sehnen- und Bandgewebe besteht überwiegend aus nicht-zellulärem Gewebe, der Anteil an amorpher Grundsubstanz ist gering. Trotzdem erfüllt sie einige wichtige Aufgaben und bestimmt weitgehend die mechanischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes. Aufgebaut ist die EZM aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und interstitieller Flüssigkeit. Sie beeinflussen den Stoffaustausch zwischen Gefäßen und Zellen (Nährstoffe und Abbauprodukte), wirken als Barriere gegen in das Gewebe eingedrungene Fremdkörper und können Wasser reversibel binden. Durch die Anheftung an Integrine, Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, sind sie in der Lage, Einfluss auf zellulär ablaufende Phänomene wie Zellproliferation, -differenzierung und -migration zu nehmen [24, 78].

Die Fasern des Bindegewebes unterteilt man in kollagene, retikuläre und elastische Fasern. Auch sie kommen in den verschiedenen Arten des Bindegewebes zu unterschiedlichen Anteilen vor und bestimmen dadurch die mechanischen Eigenschaften. Das Bindegewebe von Bändern und Sehnen besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern, sie machen ca. 75 % des Trockengewichtes aus [171].

Kollagenfasern bestehen aus Kollagenfibrillen, deren Durchmesser durchschnittlich bei 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  liegt. Jede Kollagenfibrille ist aus Mikrofibrillen zusammengesetzt (Durchmesser 20-200 nm), die die eigentliche Baueinheit der Kollagenfasern darstellen. Die Mikrofibrillen setzen sich wiederum aus mehreren gestreckten Molekülen zusammen, dem Tropokollagen. Es wird aus 3 umeinander gewundenen Polypeptid- $\alpha$ -Ketten gebildet und ist ca. 300 nm lang und 1,4 nm dick.

Die Bildung der Kollagenfibrillen, die Fibrillogenese, spielt sich zu einem Teil intrazellulär in den Fibroblasten, teilweise aber auch extrazellulär ab (s. Abb. 1.2). Zunächst werden an den Polyrribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER) an der kollagenspezifischen mRNA Pro- $\alpha$ -Ketten ( $\alpha$ -Helices) gebildet, die hauptsächlich aus den Aminosäuren Glycin (33,5 %), Prolin

(12 %) und Hydroxyprolin (10 %) bestehen. An diesen Peptidketten werden dann durch Enzyme und Kofaktoren, die in den Fibroblasten gebildet wurden, schrittweise Modifikationen vorgenommen. Drei  $\alpha$ -Helices werden zu einem Faden miteinander verdrillt und bilden so ein Prokollagenmolekül. Nachdem es im Golgiapparat verpackt wurde, gelangt das Prokollagen über Exozytose aus der Zelle, wo es zu Tropokollagen umgebaut wird. Dort verbinden sich die unlöslichen Tropokollagenmoleküle durch parallele Aggregation und Vernetzung zu komplexeren Strukturen, den Mikrofibrillen. Mikrofibrillen lagern sich zu Kollagenfibrillen und anschließend zu Kollagenfasern zusammen, welche schließlich die Kollagenfaserbündel bilden [24, 78].

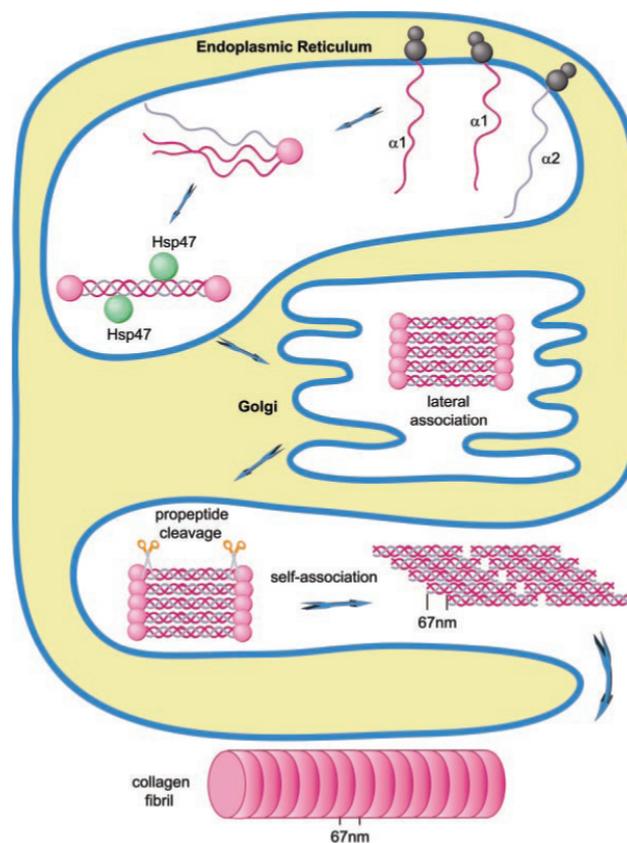


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Kollagen-Bildung von der Biosynthese im Endoplasmatischen Reticulum über den Golgi-Apparat bis zur extrazellulären Zusammenlagerung zu Kollagen-Fibrillen (aus [108]).

Gegenwärtig werden über 20 Kollagentypen unterschieden. Am besten erforscht sind Kollagentyp I-IV, wobei Typ I und III im Bezug auf Sehnen und Bänder von besonderem Interesse sind. Typ-I-Kollagen kommt im menschlichen Körper am häufigsten vor und ist aus zwei identischen Peptidketten ( $\alpha_1$ ) und einer mit anderer Aminosäuresequenz ( $\alpha_2$ ) aufgebaut. Der Anteil von Kol-

lagen I am Gesamtkollagengehalt des vorderen Kreuzbandes liegt bei ca. 90 %, bei Sehnen sind es ca. 95 % [5]. Es ist für Zugfestigkeit und Stabilität verantwortlich und kommt sonst u.a. im Corium der Haut, in Knochen, Faserknorpel und Faszien vor. Kollagentyp III besteht, wie Typ II und IV, dagegen aus drei identisch aufgebauten  $\alpha_1$ -Ketten. Die Aminosäuresequenz der Ketten variiert jedoch je nach Ort des Vorkommens im Körper. Ca. 10 % des Kollagens des VKBs sind vom Typ III, bei Sehnen sind es etwa 5 % [5]. Im Gegensatz zu Kollagen I ist Kollagen III für die Elastizität und Strukturhaltung bei Dehnung von Gewebe verantwortlich. Man findet es deshalb vorrangig als Organgerüst, in der Haut und um glatte Muskelzellen und Gefäße. Kollagen II kommt in hyalinem und elastischem Knorpel und im Glaskörper des Auges vor. Dort sorgt es für Widerstandsfähigkeit gegen Druck. Kollagen IV sorgt für Zellhaftung und dient als Permeabilitätsbarriere in der Basallamina [24, 78, 171].

Das Kollagen befindet sich allerdings nicht in einem konstanten Zustand, sondern in einem ständigen Umbau. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist vermutlich bandspezifisch und von Umweltbedingungen abhängig [4]. Ein Beispiel hierfür ist die Länge der Kollagenfasern. Sie wird durch den Spannungszustand beeinflusst. Bei längerer Ruhigstellung verkürzen sich die Fasern, während sie sich in einem Streckverband verlängern. Ein weiteres Merkmal der Kollagenfasern ist ihr charakteristischer Verlauf. Dieser ist in Faserrichtung gewellt, was eine gewisse Dehnung des Gewebes zulässt. Diese Konfiguration wird als Crimp bezeichnet und kann mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops dreidimensional dargestellt werden [39, 78, 171].

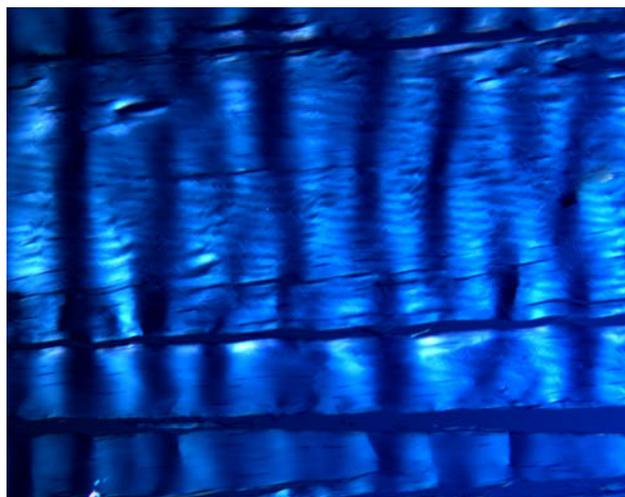


Abb. 1.3: Kollagentertiärstruktur (Crimp) in polarisiertem Licht, HE, 10x

### 1.2.2.3 Gefäßversorgung und Innervation

Die Gefäßversorgung des VKBs erfolgt primär über die A. media genus, einen Ast der A. poplitea [130]. Der distale Bereich wird außerdem über die Aa. inferiores laterales und mediales genus versorgt, die ebenfalls aus der A. poplitea entspringen.

In der Synovialmembran des VKBs bilden die Äste der A. media genus und A. inferior genus ein periligamentäres Netzwerk, das mit einem endoligamentären Gefäßnetzwerk verbunden ist. Die meisten Gefäße dieses Netzwerkes verlaufen in den bindegewebigen Septen, die zwischen den Kollagenfasern liegen, und sind longitudinal angeordnet. Allerdings sind nicht alle Bereiche des VKBs gleich stark vaskularisiert. Im mittleren Drittel des Bandes befinden sich recht wenige Gefäße, während der proximale und der distale Bereich gut durchblutet sind. Die direkten Ansatzstellen an Tibia und Femur sind allerdings komplett gefäßfrei, da die Blutversorgung des VKBs ausschließlich über das Gefäßnetzwerk der Synovia erfolgt [12, 110, 142].

Die Innervation des vorderen Kreuzbandes erfolgt hauptsächlich durch den Nervus articularis posterior, der dem N. tibialis entspringt. Er führt Afferenzen aus den 4 verschiedenen Arten von Rezeptoren, die im VKB nachgewiesen werden konnten. Dabei handelt es sich um Ruffini-Körperchen, Vater-Pacini-Körperchen, Golgi-Organen und freie Nervenendigungen [62, 67, 132]. Die afferenten Fasern dieser Mechanorezeptoren verlaufen gemeinsam mit den Gefäßen zunächst innerhalb der bindegewebigen Septen zwischen den Kollagenfasern. Entlang des peri- und endoligamentären Gefäßnetzwerkes gelangen sie aus dem Bandgewebe und verlassen dann über die dorsale Umschlagsfalte der Synovialis das Gelenk [11, 62]. Das neurale Gewebe umfasst insgesamt allerdings lediglich 1 % der Fläche des VKBs.

Ruffini-Körperchen nehmen Ausmaß und Geschwindigkeit von Gelenkbewegungen sowie intrakapsuläre Druckerhöhungen wahr. Lokalisiert sind sie subsynovial und interfaszikulär (zwischen einzelnen Kollagenfaszikeln). Vater-Pacini-Körperchen haben die Funktion, Informationen schnell aufzunehmen und weiterzuleiten. Sie reagieren dabei nur auf Beschleunigung und Verzögerung von Bewegung. Im Gegensatz zu den Ruffini-Körperchen kommen sie nur subsynovial vor [51, 67]. Golgi-Organen ähneln bezüglich des Aufbaus den Ruffini-Körperchen, ihre Aufgabe besteht darin, die Spannung im Bandgewebe zu messen. Die Funktion der freien Nervenendigungen ist die nozizeptive Sensorik sowie die Wahrnehmung chemischer Reize (wie z.B. bei Entzündungen). Häufig findet man sie perivaskulär und vor allem in der Nähe der Insertionsstellen des VKBs [51, 77].

Die verschiedenen Rezeptoren spielen also bei jeder Bewegung des Kniegelenkes und auch in Ruhe eine erhebliche Rolle.

### 1.2.3 Funktion

Gemeinsam mit den weiteren Bändern des Kniegelenkes (insbesondere HKB und Kollateralbänder) hat das VKB in erster Linie die Funktion, dieses zu stabilisieren und Bewegungen zu führen. Wie bereits beschrieben, unterscheidet man anatomisch zwei größere Faserbündel, das anteromediale und das posterolaterale Bündel. Diese Unterscheidung ist aber auch von funktioneller Bedeutung. Die anteromedialen Fasern sind insgesamt über einen größeren Bewegungsbereich angespannt als die posterolateralen Fasern und werden deshalb als Führungsbündel bezeichnet [111]. In Extensionsstellung des Knies ist das posterolaterale Bündel angespannt, das anteriomediale ist dagegen relativ entspannt. Wird das Knie flektiert, verhält es sich genau gegenteilig. Das posterolaterale Bündel rotiert um das anteriomediale und verliert dabei an Spannung, während das anteromediale angespannt wird (s. Abb. 1.4) [11, 57].

Das VKB besteht aber nicht einfach aus diesen beiden voneinander abgrenzbaren Bündeln, es ist multifaszikulär aufgebaut. Dies ermöglicht es, während der gesamten anteroposterioren Bewegung eine Spannung des Bandes aufrechtzuerhalten [165].

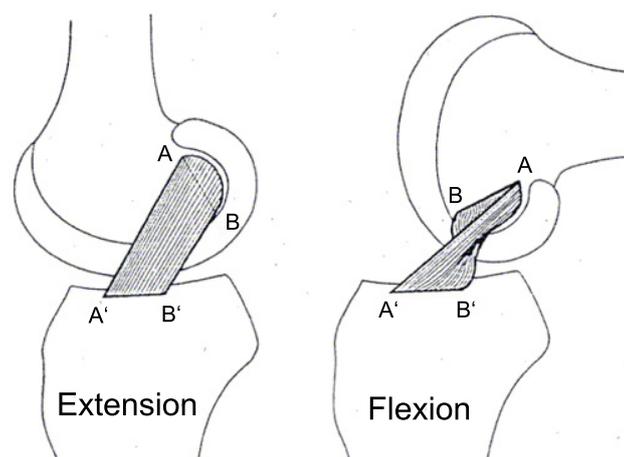


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Fasern des VKBs bei Extension und Flexion des Kniegelenkes. Die Insertionsstellen des anteromedialen Bündels sind mit A (femorale) und A' (tibiale), die des posterolateralen Bündels mit B (femorale) und B' (tibiale), gekennzeichnet. Bei Flexion ist das anteromediale Bündel angespannt. Aus [57]

Außerdem wirkt das VKB bei Rotationsbewegungen im Kniegelenk als Stabilisator. Primär wird diese Funktion zwar von den beiden Kollateralbändern und den Menisci erfüllt, als sekundärer Stabilisator spielt das VKB aber ebenfalls eine wichtige Rolle. Dies geschieht durch das Zusammenwirken mit dem HKB. Bei Innenrotation wickeln sich die beiden Bänder umeinander und begrenzen dadurch diese Bewegung [130].

Neben den mechanischen Funktionen besitzt das VKB aber auch propriozeptive und sensible Eigenschaften. Über eine Vielzahl von Mechanorezeptoren und neuronale Rückkopplungsmechanismen ( $\gamma$ -Motoneurone) steuert es den Tonus der Muskulatur, die das Kniegelenk stabilisiert. Die Dehnung des VKBs führt so zur Kontraktion von Flexoren und Extensoren des Kniegelenkes, wodurch das Gelenk vor übermäßigen Translationsbewegungen geschützt wird [34, 77, 156].

Das VKB erfüllt also viele Funktionen, die für die Stabilität, den koordinierten Bewegungsablauf und die Wahrnehmung von Schmerz und Entzündung des Kniegelenkes von großer Bedeutung sind. Ein Funktionsverlust kann zur Beschleunigung degenerativer Veränderungen, zu einer abnormen Kinematik und zu einer höheren Inzidenz von Knieverletzungen führen [111].

## **1.3 Kreuzbandverletzungen**

### **1.3.1 Verletzungsmechanismen**

Die Verletzung des VKBs ist eine der häufigsten Verletzungen des Knies. Die höchste Inzidenz besteht bei Sportlern. Bei alpinem Skilauf, American Football, Fußball und anderen Kontaktsportarten kommen die verursachenden Belastungen besonders häufig vor. Dabei gibt es verschiedene Pathomechanismen, die zu einer Verletzung des VKBs führen können. Zu einer isolierten VKB-Verletzung kann es bei plötzlicher Innenrotation und Hyperextension oder bei direkter dorsaler Krafteinwirkung auf die Tibia bei fixiertem Fuß kommen. Kombinierte Verletzungen von VKB, medialem Kollateralband und Kapsel entstehen bei Flexions-, Valgus- und Außenrotationsbelastung des Knies. Das laterale Kollateralband und der posterolaterale Anteil der Kapsel können mitbetroffen sein, wenn ein Trauma zu Flexions-, Varus- und Innenrotationsbelastung führt. Das hintere Kreuzband kann bei jeder medialen oder lateralen Krafteinwirkung, sowie bei Hyperflexions- und Hyperextensionsverletzungen beteiligt sein [79, 112].

## 1.3.2 Therapie

### 1.3.2.1 Entwicklung bis zum heutigen Stand

Kreuzbandverletzungen wurden zunächst über eine lange Zeit hinweg konservativ behandelt. Die Ruhigstellung des Knies, die später durch eine frühestmögliche Mobilisation ergänzt wurde, war die gängige Therapieform [19, 148]. Die erste chirurgische Therapie wurde 1895 von M. Robson durchgeführt. Er versorgte eine kombinierte VKB/HKB-Ruptur mit einer Primärnaht [124]. In den folgenden Jahren erschienen viele weitere Publikationen, die eine Versorgung durch Naht des VKBs empfahlen [58, 88, 109]. Bis Mitte der 70er Jahre wurde diese Form der Therapie beibehalten. 1976 veröffentlichte J. Feagin jedoch eine Studie, die unzufriedenstellende Langzeitergebnisse der Primärnaht zeigte [47]. Weitere Studien bestätigten seine Ergebnisse, so dass andere Therapiemöglichkeiten in den Vordergrund traten [43, 145].

Schon seit 1917 wurde alternativ die Rekonstruktion des VKBs mittels autologem Bandersatz erprobt [68]. Dabei kamen Faszien- oder Muskel-Faszientransplantate des Tractus iliotibialis zum Einsatz, die proximal oder distal gestielt oder frei entnommen wurden [42]. Ab 1932 wurden vermehrt Patellarsehnen zur VKB-Rekonstruktion verwendet. Brückner nutzte die Patellarsehne 1966 erstmals als freies Transplantat und verankerte es mit Knochenblöcken [23, 27]. Eine weitere Option wurde die Verwendung der sogenannten Hamstringsehnen, der Sehnen des M. semitendinosus und des M. gracilis. Macey und Lindemann führten diese Methode 1939 bzw. 1950 ein, wobei sie unterschiedliche Techniken nutzten. Macey verwendete die distal gestielte Semitendinosusehne, Lindemann dagegen die Gracilissehne, wobei er das proximale Ende intakt ließ und das Transplantat dann in einem proximalen und distalen Knochentunnel verankerte [88, 91].

Der VKB-Ersatz durch autologe Transplantate zeigte aber auch Nachteile. Neben der Entnahmemorbidität wurde festgestellt, dass das Verfahren bei komplexen Knieinstabilitäten und Revisionseingriffen seine Grenzen erreicht. In den 80er Jahren wurde daher begonnen, vermehrt synthetische Materialien zu verwenden. Es wurden Kohlefaser [128], Gore-Tex [37], und Dacron [168] eingesetzt. Durch die hohe Belastung entstanden jedoch Abriebpartikel und es kam zu Fremdkörperreaktionen und Synovialitiden [76, 82] und schließlich zu Rerupturen. In einer Studie mit 855 Patienten versagten nach 15 Jahren zwischen 40 und 78 % der synthetischen Transplantate [50].

Die Verwendung körperfremder (allogener) Transplantate zeigte deutlich bessere Ergebnisse. K. Shino hatte 1984 erstmals Versuche mit allogenen Sehnen beim Hund [138], kurze Zeit später auch

bei Menschen durchgeführt [139]. Ein Großteil der untersuchten Patienten erreichte nach Ende der Heilungsphase wieder volle sportliche Aktivität. Weitere Studien zum allogenen Transplantatersatz, bei denen meist Patellarsehnen eingesetzt wurden, zeigten allerdings auch einige Nachteile. Trotz der bisher widersprüchlichen Ergebnisse [13, 60, 81, 101, 138] erhofft man sich, durch weitere Optimierung der Verfahren zunehmend auf allogene Transplantate zurückgreifen zu können.

Natürlich spielte auch die technische Entwicklung in der Medizin eine entscheidende Rolle für die Kreuzbandchirurgie. 1912 stellte S. Nordentoft die erste Arthroskopie eines menschlichen Kniegelenkes vor [80]. Zunächst wurde die Arthroskopie aber nur zu diagnostischen Zwecken durchgeführt. Von der ersten arthroskopisch assistierten Kreuzbandrekonstruktion berichtete Dandy 1981 [38]. Seitdem hat die weitere Verbesserung dazu geführt, dass sich die Arthroskopie gegenüber der Arthrotomie bei vielen Indikationen durchgesetzt hat. Aufgrund geringerer Nebenwirkungen und Komplikationen wird sie heute routinemäßig eingesetzt.

Zur Therapie der VKB-Verletzung gibt es heute also verschiedene Optionen. Die Primärnaht und der Einsatz synthetischer Materialien konnten sich nicht durchsetzen [92, 97]. Es besteht daher die Möglichkeit der konservativen Therapie oder des VKB-Ersatzes durch autologe oder allogene Transplantate (vorwiegend durch Patellar- oder Hamstringsehnen). Zur Fixation der Transplantate stehen dabei verschiedene Techniken zur Verfügung. Die Indikation für eine konservative oder chirurgische Therapie hängt im Einzelfall von einer Vielzahl von Faktoren ab. Entscheidend sind vor allem der Grad der Knieinstabilität, die Art der Verletzung (komplette oder inkomplette Ruptur, isolierte oder kombinierte Verletzung), das angestrebte Aktivitätsniveau und das Alter des Patienten. Junge, sportlich aktive Menschen scheinen von einer chirurgischen Rekonstruktion zu profitieren [9, 32, 125, 126]. Ebenso verhält es sich bei Patienten mit kombinierten Verletzungen [26, 28, 161], bei Patienten mit funktioneller Instabilität im täglichen Leben und bei Kindern bzw. Jugendlichen [53].

### **1.3.2.2 Transplantate in der VKB-Chirurgie**

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, zwischen autologen und allogenen Transplantaten zu wählen. Besonderheiten sowie Vor- und Nachteile von Allografts werden in Abschn. 1.4 erläutert.

Außerdem gibt es unterschiedliche anatomische Strukturen, die eingesetzt werden können. Wie bereits aus der Geschichte der Kreuzbandchirurgie hervorgeht, stehen zum VKB-Ersatz verschiedene Sehnen zur Verfügung. Die meisten Kliniken verwenden standardmäßig Patellar-, oder Ham-

stringsehnen (Semitendinosus- und Gracilissehne). Seltener werden Quadricepssehnen genutzt, Achillessehne oder Tractus iliotibialis kommen vor allem in der Revisionschirurgie zum Einsatz.

Die Patellarsehne wird proximal und distal mit Knochenblöcken entnommen (bone-patellar tendon-bone) und durch Interferenzschrauben im tibialen und femoralen Knochentunnel fixiert. Dadurch wird eine schnelle Knochen-Knocheneinheilung sowie eine hohe postoperative Stabilität ermöglicht [106, 155, 173]. In einigen Studien wurden aber auch verschiedene Nachteile der Patellarsehne als Transplantat zum VKB-Ersatz aufgezeigt. Bei der Verwendung von Autografts handelt es sich dabei um eine hohe Entnahmemorbidität, die Schwächung des Knie-Streckapparates [43, 127], patellofemorale Schmerzen und Krepitationen [3, 43], Patellafrakturen [105], Verkürzung der verbleibenden Patellarsehne [75] und Patellarsehnenrupturen [105]. Zudem ist das kosmetische Ergebnis aufgrund des Zugangsweges nicht sehr gut. Frakturen eines Knochenblocks [162] können bei Auto- und Allografts auftreten.

Neben der Patellarsehne sind in den letzten Jahren zunehmend die Hamstringsehnen in den Vordergrund getreten. Da man bei der Entnahme der Gracilis- oder Semitendinosussehne ein deutlich längeres Transplantat erhält, besteht die Möglichkeit, sie mehrsträngig einzusetzen. Dadurch kann ihre Stabilität im Vergleich zu der der Patellarsehne und auch des nativen VKBs deutlich erhöht werden [63]. Gleichzeitig kann durch eine Doppelung der Sehne die komplexe Kinematik des nativen VKBs besser wiederhergestellt werden [160, 163]. Durch neue Verankerungsmethoden konnten die anfänglichen Probleme der adäquaten Fixierung inzwischen weitgehend beseitigt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der Verwendung eines Autografts die Schwächung der Beugemuskulatur durch die Entnahme von Transplantaten aufgrund der kompletten strukturellen Regeneration der Hamstringsehnen nur von kurzer Dauer ist [36, 107, 122]. Vor allem ist die Entnahmemorbidität deutlich geringer als bei der Patellarsehne [35, 143, 172].

Die Quadricepssehne wird im Vergleich zu Patellar- und Hamstringsehnen etwas seltener zum VKB-Ersatz eingesetzt. Ihr Vorteil ist die geringere Entnahmemorbidität [30], Nachteile sind die Schwächung des Streckapparates bei autologen Transplantaten und schlechtere kosmetische Ergebnisse.

## 1.4 Allografts als VKB-Ersatz

Seit einigen Jahren wird neben autologem auch allogenes Material zur Rekonstruktion des VKBs eingesetzt. Am häufigsten werden die Patellar- oder die Achillessehne als Transplantat verwendet [140].

Die größten Vorteile der allogenen Transplantate sind der Entfall der Entnahmemorbidität, dass sie beliebig dimensioniert werden können und die Kniestabilität des Patienten nicht durch die Gewebeentnahme eingeschränkt wird. So profitieren z.B. Patienten mit vorbestehender komplexer Knieinstabilität enorm von Allografts. Außerdem zeigten verschiedene Studien, dass der Ersatz des VKBs durch allogene Transplantate weitere Vorteile für den Patienten hat. Dazu zählen die Möglichkeit des minimalinvasiven Vorgehens mit verbessertem kosmetischen Ergebnis, die Verkürzung der Operationszeit, die Reduktion postoperativer Schmerzen mit erleichterter Rehabilitation, die geringere Inzidenz postoperativer Bewegungseinschränkung und die Verfügbarkeit für Revisionseingriffe und zur Rekonstruktion multipler Bandstrukturen [71, 74, 114, 135, 151].

Die Nachteile liegen insbesondere in der begrenzten Verfügbarkeit und dem Risiko der Infektionsübertragung. Der Bezug von allogenen Transplantaten zum VKB-Ersatz aus dem Ausland ist zwar theoretisch möglich, aber extrem teuer und unter Umständen mit erheblichen rechtlichen Risiken für den operierenden Arzt behaftet. Der Gesetzgeber verlangt vom Vertreiber des Gewebes die Vorlage einer Gewährleistung, dass das Transplantat keimfrei ist. Dadurch geht die Haftung auf den Hersteller über. Hersteller in den USA lehnen es deshalb ab, diese Garantie zu geben. Falls es zu einer Infektion kommen sollte, hätte also der Arzt die Konsequenzen zu tragen. Desweiteren besteht die Vorgabe, dass nicht-sterilisiertes Gewebe nur personenbezogen transplantiert werden darf. Der Aufbau einer Gewebebank ist daher nicht möglich. Ferner muss ein nicht-sterilisiertes Transplantat von demselben Arzt entnommen und später dem Empfänger eingesetzt werden. Auf breiter Ebene ist dies jedoch nicht umsetzbar. Diese Richtlinien gelten jedoch nicht für sterilisierte Transplantate, ihr Einsatz stellt sich deutlich unproblematischer dar.

Die Gefahr der Übertragung einer Infektion, z.B. HIV oder Hepatitis C [157], ist aufgrund eines engmaschigen Screenings eigentlich recht gering, aber von großer Bedeutung. Um das Risiko weiter zu minimieren, wurden in der Vergangenheit verschiedene Sterilisationsverfahren erprobt. Wie im folgenden Kapitel beschrieben, konnte jedoch keines die erwünschten Ergebnisse erzielen, so dass heute vornehmlich nicht-sterilisierte, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorene, allogene Transplantate verwendet werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass eine Immunreaktion des Empfängers auf das allogene

Material nicht auszuschließen ist. Findet eine solche Reaktion statt, kann die Einheilung des Transplantates nur verzögert ablaufen [71, 137].

Was die biomechanischen Eigenschaften und klinischen Resultate allogener Transplantate betrifft, gibt es Untersuchungen mit teilweise unterschiedlichen Ergebnissen. In vielen klinischen Studien wurden keine signifikanten Unterschiede im Langzeitoutcome gefunden [66, 83, 138], der größte Teil der Tierstudien zeigte dagegen eine erhöhte Rerupturrate, eine Verzögerung des Heilungsprozesses und eine biomechanische Unterlegenheit des allogenen Gewebes [29, 74, 81, 101]. Die meisten dieser Studien betrachteten allerdings Patellarsehnentransplantate (bone-patellar tendon-bone). Untersuchungen von knochenblock-freien Sehentransplantaten, die heute vermehrt zum primären Ersatz genutzt werden, fehlten bisher. In unserer Vorläuferstudie wurden diese mit autologen knochenblock-freien Transplantaten verglichen, wobei eine leichte biomechanische und biologische Unterlegenheit der Allografts festgestellt wurde.

Die positiven klinischen Ergebnisse beim Einsatz der Allografts in der Chirurgie des vorderen Kreuzbandes haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass der Bedarf erheblich angestiegen ist. In den USA wurden 2001 4 % aller Kreuzbandtransplantationen mit allogenen Material durchgeführt [40]. In einer Erhebung aus dem Jahre 2005 wird aktuell von einem Anteil von bis zu 30 % in der primären Kreuzbandchirurgie ausgegangen [56]. In Deutschland ergab eine aktuelle Umfrage der größten deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA), dass mehr als 60 % der Befragten allogene Transplantate bei der Kreuzbandchirurgie einsetzen würden, derzeit aber weniger als 5 % die Möglichkeit hierzu haben. Hauptursache für das reduzierte Angebot sind die strengen rechtlichen Auflagen und die Voraussetzung der Sterilisation von Spendergewebe mit Verfahren, die klare Nachteile im Vergleich zur körpereigenen, autologen Sehne aufweisen. Hieraus ergibt sich das hohe Interesse an der Entwicklung neuartiger Sterilisationsverfahren, welche mit den mechanischen und biologischen Eigenschaften von entsprechend behandeltem Gewebe nicht interferieren.

## 1.5 Sterilisationsverfahren für Allografts

### 1.5.1 Übersicht der aktuellen Sterilisationsverfahren

Um Allografts in der Klinik einsetzen zu können, schreibt der Gesetzgeber eine Sterilisation des Spendergewebes vor. Dadurch soll gewährleistet sein, dass Kontaminationen und Infektionen der Transplantate ausgeschlossen werden können. Neben dem Schutz vor oberflächlicher Kontamination durch antiseptische oder antibiotische Lösungen sind physikalische und chemische Sterilisationsverfahren von Bedeutung. Hierzu gehören die Sterilisation durch Ethylenoxid, Formaldehyd,  $\beta$ -Propiolacton sowie durch  $\gamma$ -Strahlung (bis zu 25 kGy). Alle weisen jedoch erhebliche Nachteile auf.

Das Verfahren mit Ethylenoxid wird in Deutschland seit 1967 nicht mehr verwendet, weil eine karzinogene und mutagene Wirkung und die Entstehung toxischer Radikale mit konsekutiver Ausbildung von schweren Synovitiden nachgewiesen werden konnte [104]. Außerdem wurden Entzündungs- und Immunreaktionen beobachtet [73, 123, 141]. Ähnliches gilt für  $\beta$ -Propiolacton, aufgrund der karzinogenen und mutagenen Wirkung wurde von der Verwendung abgesehen [89]. Nachteil der  $\gamma$ -Bestrahlung ist, dass sie, um einen sicheren Schutz vor bakteriellen und viralen Erregern zu gewährleisten, in Dosen eingesetzt werden muss, die eine erhebliche Reduktion der mechanischen Eigenschaften von Sehnen- und Bandgewebe bewirken [48, 49]. Die Behandlung von Geweben mit Formaldehyd zeigte karzinogene Wirkung [96]. Bisher ist es also nicht gelungen, ein Sterilisationsverfahren für Sehnen- und Bandgewebe zu finden, welches ohne die genannten unerwünschten Nebeneffekte einen sicheren Schutz vor Bakterien, Viren und Pilzen bietet.

### 1.5.2 Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren

Die Sterilisation durch das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren wird von der Gewebekbank des Instituts für Transfusionsmedizin an der Charité seit Anfang der 80er Jahre bei allogene Knochengewebe angewendet. Die potente Wirkung der Peressigsäure (PES) gegen Pilze und Sporen [86, 18], sowie die starke antibakterielle [147] und antivirale Wirkung [146] sind mehrfach bewiesen worden und seit einiger Zeit bekannt. Außerdem wurde festgestellt, dass das Verfahren die mechanischen Eigenschaften des Knochengewebes nicht beeinträchtigt [116]. Dass das PES-Ethanol-Unterdruck-Verfahren auch bei Sehnen- und Bandgewebe sicheren Schutz bietet, konnte

in weiteren Studien nachgewiesen werden [90, 149]. Bisher ist aber nicht ausreichend untersucht worden, wie sich die Sterilisation mit PES auf den Heilungs- und Remodelingprozess von allogenen Sehnentransplantaten auswirkt.

Bei dem von der Gewebekbank angewendeten Verfahren wird das Gewebe zunächst entfettet und anschließend 4 Stunden bei Raumtemperatur und bei niedrigem Umgebungsdruck (200 mbar) unter ständigem Schütteln in Peressigsäure-Ethanol-Lösung gegeben. Diese Lösung besteht aus 2 %-iger Peressigsäure (s. Abb. 1.5), 96 %-igem Ethanol und aqua ad injectabilia (Verhältnis v/v/v 2/1/1). Nach dem Sterilisationsprozess wird das Gewebe mit Sörensen-Puffer gespült, um einen Rückstand an PES von unter 1 ppm zu erreichen. Mit Hilfe des Reflectoquant-Peressigsäure-Tests (Peressigsäure reagiert mit aromatischem Amin zu einem blauen Farbstoff, dessen Konzentration gemessen wird) konnte gezeigt werden, dass die PES bereits 60 Minuten nach der Sterilisation nicht mehr im Gewebe nachweisbar ist. Dafür ist neben der Spülung vor allem ihr schneller Zerfall verantwortlich. Nach Kontakt mit Fremdoberflächen zerfällt sie in Essigsäure und Wasserstoffperoxid. Von der Gewebekbank der Charité wird dieser Reflectoquant-Peressigsäure-Test bei jedem sterilisierten Transplantat routinemäßig durchgeführt, so dass ein Rückstand von PES auszuschließen ist. Nach Trocknung an steriler Luft werden sie dann in sterile Beutel gegeben und bei  $-18^{\circ}\text{C}$  bis zum Zeitpunkt der Implantation aufbewahrt [115, 116].

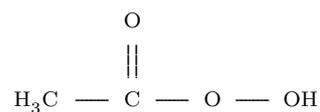


Abb. 1.5: Chemische Formel der Peressigsäure

## 1.6 Transplantatremodeling

### 1.6.1 Begriffsklärung

Der Begriff Remodeling beschreibt ganz allgemein die funktionelle Adaptierung eines Organs in Folge einer quantitativen oder qualitativen Funktionsänderung. Im Zusammenhang mit der Transplantation von Sehngewebe zum VKB-Ersatz umfasst das Remodeling eine Vielzahl komplexer

struktureller und biomechanischer Umbauvorgänge, die während der Einheilung der freien Sehnentransplantate ablaufen [22]. Nach Transplantation unterläuft das avitale Gewebe in der neuen Umgebung Veränderungsprozesse, die zu einer Reorganisation der zellulären Bestandteile und der Extrazellulärmatrix führen [171]. Zu diesen Prozessen zählen die Revaskularisierung und Reinnervation, Veränderungen des Zellgehaltes, der Zellverteilung und der Zellmorphologie, sowie die Reorganisation von Kollagenfasern und -fibrillen [7, 8, 14, 20, 21, 31, 94, 100, 171]. Amiel et al. stellten 1986 im Kaninchenmodell fest, dass sich das Sehnentransplantat nach 30 Wochen zu einem kreuzbandähnlichen Gewebe umgebaut hatte [8]. Später zeigten weitere Studien übereinstimmende Ergebnisse im Schafsmodell und beim Menschen [44, 59, 84].

## 1.6.2 Phasen

Bosch definierte 1993 eine Unterteilung des Remodelings in drei fließend ineinander übergehende Phasen [22], die bis heute Bestand hat.

### 1. Initiale Phase: Degeneration und Nekrose (ca. 1.-6. Woche)

Sie wird durch eine partielle ischämische Nekrose und Degeneration von Zellen charakterisiert. Das transplantierte Sehngewebe ist azellulär und avaskulär. Nach ca. 2 Wochen ist die Entwicklung von Granulationsgewebe in der Peripherie erkennbar, in den zentralen Bereichen dominieren jedoch weiterhin Nekrosen mit Zell- und Strukturverlust des Gewebes. Die biomechanischen Eigenschaften des Transplantates sind in dieser Phase vermindert.

### 2. Revitalisierungsphase: Reparatur und Proliferation (ca. 3.-12. Woche)

Die Revitalisierungsphase ist in erster Linie durch die Revaskularisation des Gewebes und die Wiederbesiedlung mit Zellen gekennzeichnet. Außerdem ist ein Anstieg des Kollagengehaltes vom Typ III mit einem geringeren mittleren Kollagenfibrillendurchmesser, sowie ein Anstieg des Fibronectingehaltes (zur Zellmigration und -adhäsion an die EZM) charakteristisch. Die reparativ-proliferativen Prozesse schreiten dabei von peripher nach zentral fort, so dass bis zur 16. Woche alle Transplantatabschnitte erreicht sind. Insgesamt führen die Entwicklungen zu einem Organisationsverlust der extrazellulären Matrix, was eine weitere signifikante Abnahme der biomechanischen Eigenschaften zur Folge hat.

### 3. Remodelingphase (ca. 10.-24. Woche)

Im weiteren Verlauf ist ausgehend von den peripheren Bereichen eine beginnende Normalisierung der Zellzahl und eine partielle Längsorientierung neugebildeter Kollagenfasern zu erkennen. Die EZM organisiert sich zunehmend. Dies ist die eigentliche Remodelingphase, in der wieder eine sukzessive Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften festzustellen ist.

Anhand dieser Beschreibung der einzelnen Phasen wird deutlich, dass es einen charakteristischen zeitlichen Verlauf gibt. Gerade in der frühen Phase des Remodelings (ca. bis zur 12. Woche) finden eine Vielzahl von wichtigen Prozessen statt, die zur Wiedererlangung der biologischen und biomechanischen Eigenschaften führen. Deshalb ist der Ablauf dieser frühen Phase von besonderem Interesse.

#### **1.6.3 Rolle der Myofibroblasten**

Im Rahmen des Remodelingprozesses scheinen die sogenannten Myofibroblasten eine wichtige Rolle zu spielen. Sie entstehen durch die Umwandlung bzw. Modulation von Fibroblasten.

Myofibroblasten sind hochdifferenzierte Zellen, die Eigenschaften von Fibroblasten und glatten Muskelzellen in sich vereinen [55]. Sie besitzen die Fähigkeit, die EZM durch sezernierende Kollagenasen abzubauen und durch neu gebildetes Kollagen zu ersetzen [153, 134]. Außerdem enthalten sie eine der 6 Isoformen des Zytoskelett-Proteins Aktin, das  $\alpha$ -smooth-muscle-actin (ASMA), wodurch sie über kontraktile Eigenschaften verfügen. Die Aktinfilamente verlaufen parallel, der Richtung der Zelllängsachse entsprechend, und sind zu „Stressfasern“ gebündelt [144]. Das ASMA gilt als spezifischer Marker der Myofibroblasten. Glatte Muskelzellen und Perizyten verfügen allerdings ebenfalls über diese Aktin-Isoform, die auch für sie spezifisch ist [144]. Weitere wichtige Charakteristika der Myofibroblasten sind gut entwickelte Interzellulärverbindungen und ihre ausgeprägten Zell-Stroma Verbindungen (Fibronexus), die es ihnen ermöglichen, Zugkräfte auf die EZM auszuüben [131].

Wie es zur Ausbildung der Myofibroblasten kommt, ist bis heute nicht vollkommen geklärt. Man geht derzeit davon aus, dass sie aus Fibroblasten entstehen (Abb. 1.6) [153]. Wird z.B. im Rahmen der Wundheilung mechanischer Stress auf ein Gewebe ausgeübt, so differenzieren sich die Fibroblasten zu Proto-Myofibroblasten. Diese bilden intrazelluläre Stressfasern aus Aktin, extrazellulär Fibronektin-Fasern und außerdem Fibronexus-Adhäsionskomplexe aus, wodurch sie in der Lage

sind, Zugkräfte auf die EZM zu übertragen [55, 153, 70]. Wird der Proto-Myofibroblast nun bei fortbestehender mechanischer Spannung von transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) angeregt, differenziert er sich zum Myofibroblasten. Das von Makrophagen, Thrombozyten und verletztem Epithelgewebe sezernierte TGF- $\beta_1$  führt zur Ausbildung von ASMA und noch ausgeprägteren Zell-Stroma Verbindungen. Dadurch ist es dem Myofibroblasten möglich, größere mechanische Kräfte auf die EZM auszuüben als der Proto-Myofibroblast [134, 170]. Bleiben die anregenden Faktoren aus, werden die Myofibroblasten durch Apoptose aus dem Gewebe entfernt [61].

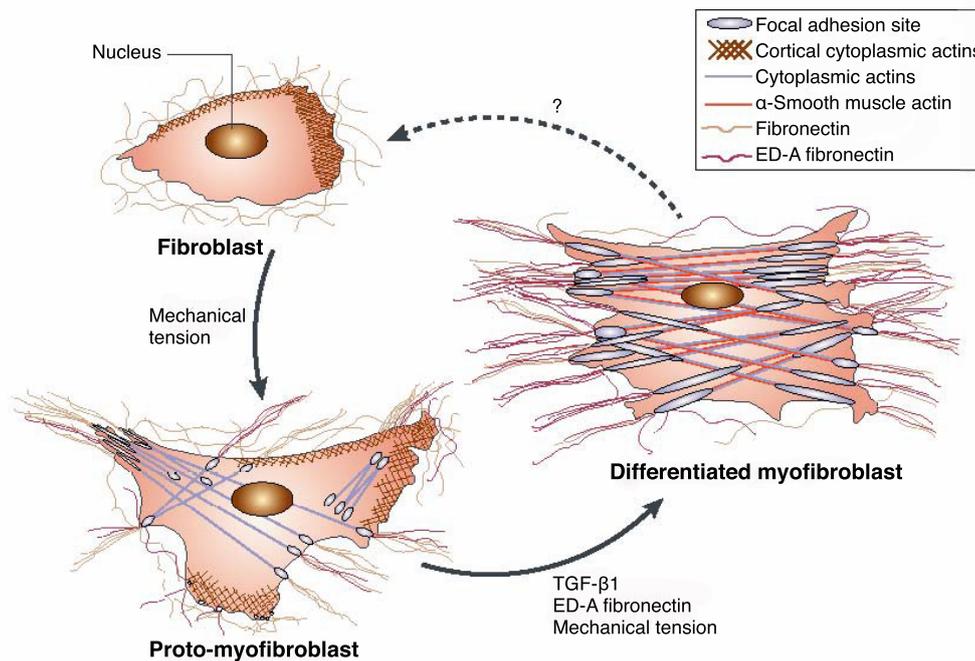


Abb. 1.6: Bei Einwirkung von mechanischem Stress wird aus dem Fibroblasten zunächst ein Protomyofibroblast. Die Stimulierung von TGF- $\beta_1$  und ED-A Fibronectin führt zur Ausbildung von ASMA und der Differenzierung zum Myofibroblasten. Aus [153]

Erstmals beschrieben wurden Myofibroblasten von Gabbiani et al. im Jahre 1971. Sie stellten fest, dass diese hochdifferenzierte Form der Fibroblasten an der Wundheilung und der Dupuytren'schen Palmarkontraktur beteiligt ist [54]. Weitere Studien zeigten, dass sie auch bei der Leberzirrhose [15], der Lungenfibrose [2], der postoperativen Gelenkskontraktur [69] und dem Krankheitsbild der frozen shoulder [25] eine entscheidende Rolle spielen. Sie sind also bei den verschiedensten Formen der Kontrakturbildung, der Wundheilung und der Kontraktion von fibrosierendem Gewebe zu finden.

Die Vermutung, dass Myofibroblasten auch an der Gewebekontraktion im Rahmen von Remo-

delingprozessen beteiligt sein könnten, lag folglich nicht fern. Murray und Spector wiesen ihre Existenz 1999 im nativen und rupturierten humanen VKB nach und stellten eine positive Korrelation zwischen der Wellenlänge der Kollagentertiärstruktur (Crimplänge) und der Anzahl der Myofibroblasten fest. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass beim Heilungsprozess des rupturierten VKBs vermehrt ASMA exprimiert wird [99]. Weiler und Unterhauser bestätigten diese Ergebnisse 2002 im Schafsmodell. Im transplantierten Gewebe fanden sie nach der Heilungsphase in den Bereichen mit der höchsten Myofibroblastenzahl die niedrigste Crimpfrequenz [164]. Zwei Jahre später stellte Unterhauser dann fest, dass sich die Myofibroblastenzahl dazu eignet, den Prozess des Remodelings bzw. der Ligamentisierung von VKB-Transplantaten zu beurteilen [158].

Myofibroblasten scheinen also eine erhebliche Rolle bei der Transplantateinheilung und der Wiedererlangung der in-situ Spannung zu haben. Somit sind sie entscheidend an der Entwicklung der Kniestabilität nach VKB-Ersatz beteiligt.

## **1.7 Fragestellung und Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren zur Sterilisation freier, allogener Sehnen transplantate beim VKB-Ersatz geeignet ist. Aufgrund des Fehlens von in-vivo Untersuchungen des PES-Verfahrens, wurde das Remodeling anhand verschiedener Parameter im Schafsmodell untersucht. Eine Arbeitsgruppe unseres Institutes hatte bereits den Heilungsverlauf von autologen mit nicht-sterilisierten, allo genen Transplantaten verglichen. Um unsere Ergebnisse optimal auf die der Vorgängerstudie beziehen zu können, wählten wir die gleichen Versuchsparameter. Diese wurden auch in der Literatur vielfach als Indikator für den Ablauf des Remodelingprozesses herangezogen. Die Methodik entsprach ebenfalls derjenigen der Vorstudie.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren im Tiermodell keinen entscheidend negativen Einfluss auf das Remodelingverhalten zeigen würde, so dass eine Anwendung in der klinischen Praxis empfohlen werden könnte.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Studienaufbau

Die Studie wurde an 18 weiblichen, 2-3 Jahre alten Merino-Mix-Schafen durchgeführt. Um die frühe Phase des Remodelings beurteilen zu können, wurden sechs und zwölf Wochen als Standzeiten ausgewählt und die Schafe in zwei Gruppen zu je neun Tieren ( $n=9$ ) aufgeteilt. Aus der Literatur ist bekannt, dass gerade in dieser frühen Phase wichtige Umbauprozesse stattfinden [174].

Als Transplantate dienten mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren sterilisierte Sehnen des Musculus flexor digitorum superficialis artgleicher Tiere (die Sterilisation wurde, wie in Abschn. 1.5.2 beschrieben, in der Gewebebank des Instituts für Transfusionsmedizin an der Charité durchgeführt). Diese Sehnen wurden während einer offenen Operation nach Entnahme der nativen vorderen Kreuzbänder eingesetzt. Die Fixierung erfolgte femoral mittels Endobutton und tibial über eine sogenannte Knochenbrücke. Postoperativ wurden Röntgenbilder angefertigt, um die richtige Lage des Transplantats und des Endobuttons zu sichern. Die weitere Verlaufskontrolle umfasste mehrfache Verbandswechsel, Wundkontrollen und Beurteilung des Gangbildes, um auftretende Komplikationen wie z. B. Entzündungen zu dokumentieren.

Die ersten Tage nach der Operation verbrachten die Tiere in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, später wurden sie in einem Stall außerhalb des Klinikums mit freier Auslaufmöglichkeit untergebracht. 2-3 Tage vor der Tötung wurden sie in den Stall des Hauses zurückgebracht.

Der Explantation der Hinterbeine folgte zunächst die biomechanische Untersuchung der Transplantate durch einen Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe. Im Anschluss wurden die Transplantate sowie die Knochen fixiert und hinsichtlich Zellgehalt, Myofibroblastendichte, Crimpstruktur und Kollagenverteilung untersucht. Zwei weitere Doktoranden untersuchten die Proben zur Fragestellung der Revaskularisierung, der Beteiligung von Wachstumsfaktoren und der Knochen-Band-Einheilung.

Zum Vergleich wurden die nativen, rechten Kreuzbänder und Flexorsehnen der Tiere untersucht sowie die Daten einer vorherigen, in unserem Haus durchgeführten Studie (Vorläuferstudie) mit



Abb. 2.1: Versuchstiere: Merino-Mix-Schafe, 4 Wochen postoperativ bei freiem Auslauf

herangezogen. Diese Arbeitsgruppe hatte das Remodelingverhalten von autologen, sowie nicht-sterilisierten, allogenen (frisch gefrorenen) Transplantaten nach 6, 12 und 52 Wochen untersucht. Die verwendete Methodik (Operationsverfahren, histologische Aufarbeitung, Färbungen, Auswertung etc.) war identisch und wurde zum Teil gemeinsam mit Doktoranden der zum Vergleich herangezogenen Studie durchgeführt.

Alle Tiere wurden vor Beginn der Studie umfangreich untersucht und während der gesamten Dauer des Projekts veterinärmedizinisch überwacht und tierpflegerisch betreut. Der Tierversuchsantrag zur Durchführung der Studie (Aktenzeichen G0029/04) wurde am 11.03.2004 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt.

## 2.2 Operatives Vorgehen

### 2.2.1 Anästhesie

Zur Narkoseeinleitung wurde den Schafen 15 mg/kgKG Thiopental-Natrium (Trapanal®<sup>1</sup>), gelöst in Aqua ad injectabilia, intravenös injiziert. Für die anschließende orale endotracheale Intubation wurde ein Tubus der Größe 8.0 Ch verwendet. Die Narkose wurde durch ein Stickoxydul-Sauerstoff-Gemisch (50 % Stickoxydul, 50 % Sauerstoff), dem das Inhalationsnarkotikum Isofluran (1,5 %, Forene®<sup>2</sup>) zugefügt war, fortgesetzt. Zur Analgesie wurde ein Bolus von 0,5 mg Fen-

---

<sup>1</sup>Byk Gulden Lomberg Chem. Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

<sup>2</sup>Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

tanyl®<sup>3</sup> über den i.v.-Zugang gegeben. Außerdem wurden 2,2 g Augmentan®<sup>4</sup> (Amoxicillin und Clavulansäure) zur Antibiotikaphylaxe und 0,9 % Kochsalzlösung<sup>5</sup> zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten i.v. verabreicht. Während der gesamten Operation wurden die Vitalparameter überwacht. Dazu dienten Pulsoximetrie, EKG und expiratorische CO<sub>2</sub>-Messung. Die Augen der Tiere wurden durch eine Augensalbe<sup>6</sup> vor Austrocknung und Infektion geschützt.

## 2.2.2 Operationsverfahren

Die Operationen wurden unter standardisierten Bedingungen und unter strenger Wahrung der Sterilität durchgeführt. Auf die Narkoseeinleitung folgten weitere OP-Vorbereitungen. Zunächst wurden die linken Hinterbeine sowie ein Teil von Becken und Bauch geschoren und desinfiziert. Anschließend wurden die Tiere in rechter Seitenlage auf dem OP-Tisch fixiert. Die linke Klaue wurde steril eingepackt und das restliche linke Hinterbein mit steriler Jod-Lösung<sup>7</sup> abgewaschen. Die Blutstillung erfolgte durch monopolare Elektrokoagulation.

In einem ersten Schritt wurde am linken Hinterlauf die Sehne des M. flexor digitalis superficialis freipräpariert und entnommen, da sie, nach Sterilisation mit dem PES-Verfahren, einem anderen Tier als Transplantat dienen sollte. Über einen posterolateralen Hautschnitt wurde zunächst die Sehne des M. gastrocnemius dargestellt. Sie umhüllt die Sehne des M. flexor digitalis superficialis und musste deshalb der Länge nach gespalten werden. Die Flexorsehne konnte nun mobilisiert sowie proximal des Tuber calcanei und distal des Muskelbauches scharf abgesetzt werden. Die herausgetrennte Sehne wurde sofort in eine mit Kochsalz<sup>8</sup> getränkte Mullkompressen gehüllt und bei -80°C eingefroren. In der Gewebebank der Charité erfolgte dann die Sterilisation. Daraufhin wurde die gespaltene Sehne des M. gastrocnemius mit resorbierbarem<sup>9</sup>, die Haut mit nicht-resorbierbarem<sup>10</sup> Nahtmaterial verschlossen.

Gleichzeitig präparierte einer der beiden Operateure das PES-sterilisierte Transplantat, das wir von der Gewebebank erhalten hatten. Dabei wurde die Baseball-stitch-Technik für die Fadenaug-

---

<sup>3</sup>Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

<sup>4</sup>SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland

<sup>5</sup>Natriumchlorid-Infusionslösung 154, Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland

<sup>6</sup>Refobacin® (Gentamicinsulfat) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>7</sup>Braunoderm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

<sup>8</sup>NaCl 0,9 % Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

<sup>9</sup>Vicryl® 1/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

<sup>10</sup>Ethilon® II 3/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

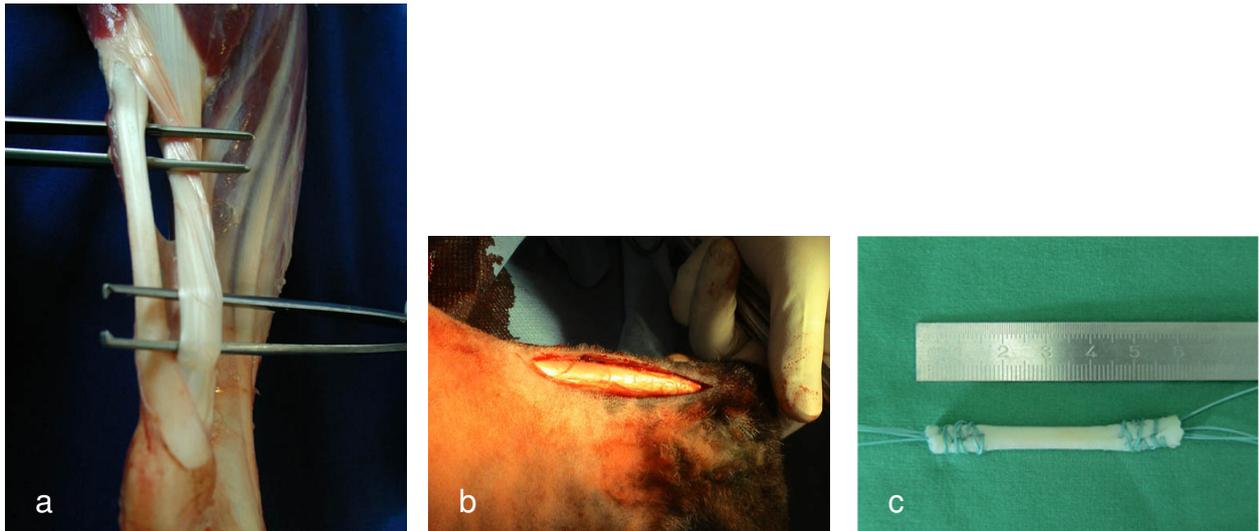


Abb. 2.2: Das Transplantat: Anatomie (a), intraoperativ vor Entnahme (b), präpariert (Baseball-stitch-Technik) (c)

mentation angewendet. An beiden Enden wurde ein nicht-resorbierbarer, polyesterbeschichteter Faden<sup>11</sup> eingebracht, wobei das Transplantat jeweils über ca. 2 cm armiert wurde. Unter manueller Spannung konnte dann der exakte Durchmesser für den späteren Bohrkanal gemessen werden.

Nächster Schritt war die Eröffnung des Kniegelenkes (s. Abb. 2.3). Über einen anteromedianen Schnitt wurden zunächst die Haut und die darunterliegenden Verschiebeschichten durchtrennt. Um die Patella lateralisieren zu können, wurde der M. vastus medialis und das patellofemorale Band inzidiert. Zur Verbesserung der Darstellung des Gelenkes wurde der Hoffa'sche Fettkörper an der medialen Seite abgelöst und nach lateral geschlagen. Das Lig. transversum genus wurde dabei erhalten. Es folgte das Heraustrennen des VKBs, die Insertionsstellen debridierten wir mit Hilfe eines scharfen Löffels und einer Luerzange.

In maximaler Flexion des Kniegelenkes wurde dann nach proximal in fortgesetzter Verlaufsrichtung des VKBs ein bis durch die Haut gebohrter Führungsdraht in den Femur eingebracht. So konnte der Knochentunnel anschließend bis zu einer Tiefe von 20 mm auf den genauen Transplantatdurchmesser aufgebohrt werden. Der femorale Knochentunnel verlief somit vom ehemaligen Ursprung des VKBs in der Fossa intercondylaris in Richtung Epicondylus lateralis. Tibial erfolgte die Bohrung von der ursprünglichen Ansatzstelle des VKBs aus, die sich medial der Eminentia intercondylaris befindet. Daneben wurde ein zweites Bohrloch geschaffen, um das Transplantat in einem nächsten Schritt über die so gebildete Knochenbrücke fixieren zu können (s. Abb. 2.4)

<sup>11</sup>2 Ethibond-Excel®, Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland

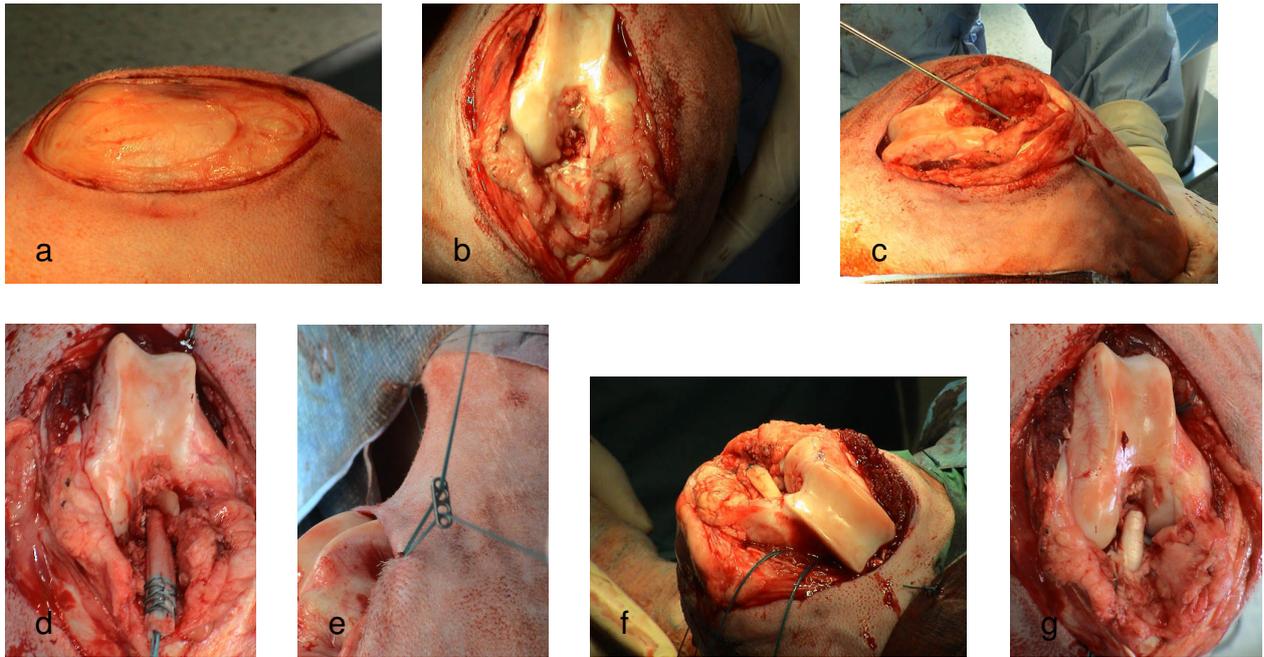


Abb. 2.3: Operationsverfahren: Eröffnung der Haut (a), Arthrotomie (b), Einbringung des Führungsdrahtes (c), Einsetzen des Transplantates (d), proximale Fixierung mittels Endobutton (e), distale Fixierung über Knochenbrücke (f), Transplantat in situ (g)

Nachdem nun alle nötigen Bohrkanäle angefertigt worden waren, setzten wir das präparierte Transplantat ein. Die Verankerungsfäden zogen wir jeweils von innen nach außen durch den tibialen und femoralen Knochentunnel, femoral wurde das Transplantat über einen extrakortikalen Endobutton<sup>12</sup> fixiert (s. Abb. 2.3 und Abb. 2.4). Anschließend wurde das Kniegelenk mehrfach gestreckt und gebeugt, bevor auch tibial die Fixation des Transplantates erfolgte. In einer Flexionsstellung von 30° verknoteten wir den Verankerungsfaden über der Knochenbrücke.

Letzter Schritt der Operation war der Wundverschluss. Auf die Reposition der Patella folgte die Naht des patellofemorales Bandes mit resorbierbarem Nahtmaterial<sup>13</sup>, sowie der Verschluss von Gelenkkapsel und Muskulatur. Abschließend wurde die Haut mit nicht-resorbierbarem Faden<sup>14</sup> genäht. Die Wunden wurden mit Braunol<sup>15</sup> desinfiziert und steril verbunden.

<sup>12</sup>Acufex®, Smith & Nephew Endoscopy Inc., Ma, USA

<sup>13</sup>Vicryl® SH 1/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

<sup>14</sup>Ethilon® II 3/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

<sup>15</sup>Braunol® 2000, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

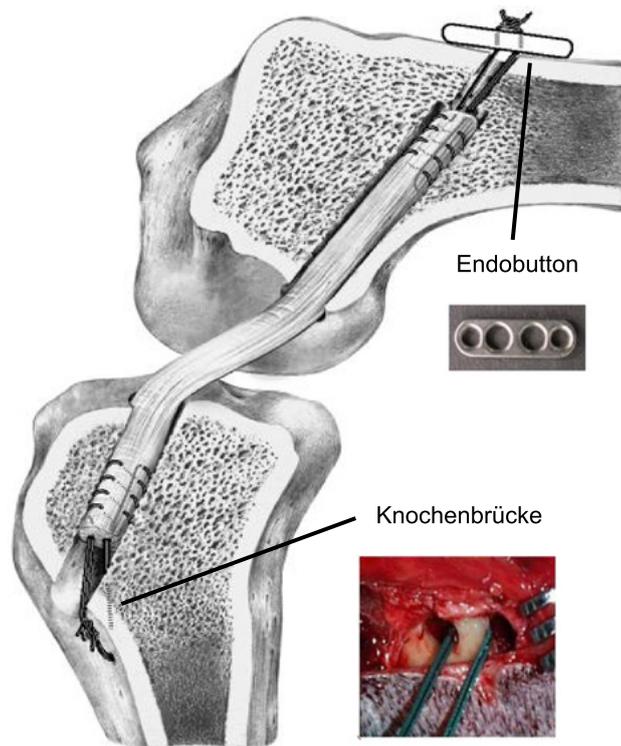


Abb. 2.4: Transplantatverankerung: femoral mittels Endobutton, tibial über eine Knochenbrücke

### 2.2.3 Postoperative Nachsorge

Nach Beendigung der Operation wurden die Schafe extubiert. Um den korrekten Sitz des Transplantates zu dokumentieren, fertigten wir mit Hilfe eines mobilen Röntgengerätes<sup>16</sup> Bilder in kraniokaudalem und mediolateralem Strahlengang von den behandelten Kniegelenken an. Anschließend wurden die Tiere wieder zu den anderen Schafen in den Stall der tierexperimentellen Einrichtung gebracht, wo sie allerdings noch für 24 h in einer Einzelbox verweilten. Auf diese Weise wurde die Gefahr von Wundinfektionen gesenkt, außerdem konnte eine übermäßige Belastung am ersten postoperativen Tag durch die geringe Bewegungsfreiheit verhindert werden. Die weitere Nachsorge bestand während der ersten drei Tage aus kontinuierlicher Gabe von Analgetika in Form von Fentanyl-Schmerzplaster<sup>17</sup>. Desweiteren wurden im Rahmen einer täglichen Visite eine Gangbeurteilung, Wundkontrollen und jeden zweiten Tag Verbandswechsel durchgeführt, bis die Wunden trocken und reizlos waren. Auf einer Skala von 1-4 wurde im Verlauf bewertet, mit welcher Intensität die Tiere ihre operierten Knie wieder belasten konnten. Nach ca. 10-14 Tagen wurden dann die Fäden gezogen. Bei ausreichend verheilten Wunden und zufriedenstellender

<sup>16</sup>Mobilett Plus, Siemens-Elema AB, Solna, Schweden

<sup>17</sup>Durogesic®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland

Kniebelastung brachten wir die Schafe auf einen der Charité zugehörigen Bauernhof. Dort hatten sie bis zur Transplantatentnahme freien Auslauf.

## 2.3 Gewebeentnahme

Nach einer Standzeit von 6 bzw. 12 Wochen wurden die Tiere dann drei Tage vor der Transplantatentnahme wieder im Stall der tierexperimentellen Einrichtung der Charité untergebracht. Dort erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch Gabe von 50 ml Kaliumchlorid<sup>18</sup> i.v., nachdem eine Narkose mit Hilfe von 20 mg/kgKG Thiopental-Natrium<sup>19</sup> (gelöst in 40 ml Aqua ad injectabilia) i.v. erfolgt war. Daraufhin entnahmen wir die Kniegelenke in toto. Ca. 15 cm distal und proximal des Gelenkes stellten wir dazu den Knochen dar und setzten Femur und Tibia ab. Die Präparate wurden direkt mit Kochsalz-getränkten Tüchern umwickelt, um Austrocknung zu verhindern, anschließend wurden sie von einem Doktoranden unserer Gruppe biomechanisch getestet. Dies umfasste Messungen der Schublaxizität mit und ohne Weichteilmantel sowie einen finalen Versagenstest. Während der Präparation des Weichteilmantels zwischen den biomechanischen Untersuchungen entnahmen wir Proben von Plica, Synovialmembran und Synovialflüssigkeit zur histologischen Aufarbeitung. Zusätzlich wurde der makroskopische Zustand des Knies dokumentiert, insbesondere Entzündungszeichen wie z. B. Rötung, vermehrte Ergussbildung und Zeichen einer Synovialitis waren hier von Interesse. Nachdem die biomechanische Testung abgeschlossen war, konnten intraartikuläre Abschnitte der Transplantate zur weiteren histologischen Aufarbeitung entnommen werden.

Auf der unbehandelten Seite wurden native Kreuzbänder sowie native Flexorsehnen gewonnen. Sie wurden ebenfalls histologisch untersucht und dienten als Kontrolle. Zusätzlich wurden neun der nativen Flexorsehnen mit PES sterilisiert und anschließend histologisch aufgearbeitet, um den Zustand zum Zeitpunkt null der Einheilung darstellen zu können.

---

<sup>18</sup> 1M-Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

<sup>19</sup> Trapanal®, Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

## 2.4 Histologische Arbeitsmethoden

### 2.4.1 Aufarbeitung des Gewebes

Nach der Entnahme wurde das Gewebe aufgeteilt, da für die verschiedenen Analyseverfahren unterschiedliche histologische Aufarbeitungen nötig waren. Der Teil des Gewebes, der zur Kollagen-typisierung (s. Abschn. 2.5) weiterverwendet werden sollte, wurde mit Hilfe von Flüssigstickstoff eingefroren und im Kühlschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Typisierung wurde das Gewebe lediglich wieder aufgetaut, es bedurfte keiner weiteren Bearbeitung.

Das übrige Gewebe wurde in Fixiergittern<sup>20</sup> für 2-3 Tage in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung<sup>21</sup> fixiert und anschließend für mindestens 15 min gewässert. Es folgte die Entwässerung im Leica-Entwässerungsautomaten<sup>22</sup> über 67 Stunden. Danach wurde das Gewebe zur Fixierung in Paraffin<sup>23</sup> eingebettet. Die Struktur des Gewebes wird durch dieses Verfahren besonders gut erhalten, was für die Immunhistochemie eine wichtige Rolle spielt. Bei der häufig angewendeten Gefrierschnitttechnik ist das nicht der Fall. Letztlich wurden mit einem Mikrotom<sup>24</sup> 4  $\mu\text{m}$  dicke Längsschnitte von den Paraffinblöcken angefertigt, die auf silanisierte Adhäsions-Objektträger<sup>25</sup> aufgezogen wurden.

### 2.4.2 Färbemethoden

#### 2.4.2.1 Konventionell

An konventionellen Färbemethoden kamen die Hämatoxylin / Eosin-Färbung<sup>26</sup> (HE-Färbung) und die Masson-Goldner Trichromfärbung (bestehend aus den Farbstoffen Orange G, Eisenhämatoxylin, Lichtgrün und Säurefuchsin)<sup>27</sup> zum Einsatz. Die HE-Färbung stellt die Zellkerne blau (ange-

---

<sup>20</sup>Tissue Tek III, Miles Limited, Slough, England

<sup>21</sup>Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

<sup>22</sup>Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

<sup>23</sup>Paraplast Plus®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA

<sup>24</sup>Leica RM 2125, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

<sup>25</sup>HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

<sup>26</sup>Hämatoxylin, Papanicolaous Lösung 1a Harris, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
Eosin Solution Aqueous, Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri, USA

<sup>27</sup>Orange G Differenzierungslösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
Lichtgrün, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., Münster, Deutschland  
Weigerts Eisenhämatoxylin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., Münster, Deutschland  
Säurefuchsin, Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., Münster, Deutschland

färbt durch den azidophilen Farbstoff Hämatoxylin) und das Cytoplasma sowie die Interzellularsubstanz rosa (angefärbt durch den basophilen Farbstoff Eosin) dar. Dadurch lassen sich mit Hilfe dieser Färbung vor allem die Zellverteilung und die Kernmorphologie beurteilen. Mit der Masson-Goldner Trichromfärbung lassen sich dagegen die Extrazellulärmatrix, die Kollagenanordnung und die Verteilung der bindegewebigen Septen besser untersuchen. Zellkerne färben sich dabei braunschwarz, das Zytoplasma stellt sich ziegelrot, das Bindegewebe grün dar.

#### **2.4.2.2 Immunhistochemisch**

##### **Theorie**

Zur immunhistologischen Färbung macht man sich zu Nutze, dass auf Zellen spezifische Strukturen vorkommen, an denen entsprechende Antikörper binden. Diese Bereiche der Antigene nennt man Epitope. Mit Hilfe von Enzymen, die an die Antikörper gekoppelt sind, können die Bindungen dann durch Enzym-Farbstoff-Reaktionen sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise lassen sich bestimmte Zellen detektieren.

Es besteht die Möglichkeit, monoklonale oder polyklonale Antikörper zu verwenden. Monoklonale Antikörper werden aus einem einzelnen Plasmazellklon gewonnen. Diese entstehen durch Verschmelzen von Myelomzellen mit B-Lymphozyten. Die gebildeten Antikörper richten sich gegen ein einziges Epitop eines Antigens. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen Plasmazellen produziert und reagieren mit mehreren Epitopen eines Antigens. Somit besitzen monoklonale Antikörper gegenüber polyklonalen zwar eine geringere Sensitivität und Stabilität, sind aber deutlich spezifischer [17], [150]. Wie unsere Vergleichsgruppe verwendeten wir daher einen monoklonalen Antikörper.

Desweiteren ist es möglich, eine direkte oder indirekte Nachweismethode zu wählen. Bei der direkten Methode ist das Enzym, das später hinzugegebene Farbstoffsubstrate umsetzt, direkt an den Antikörper gebunden, der auch an das Antigen bindet. Indirekt bedeutet hingegen, dass ein weiteres Antikörper-System beteiligt ist. Ein Primärantikörper bindet an das Antigen, anschließend wird ein spezifischer Antikörper gegen den Primärantikörper (Sekundärantikörper) hinzugegeben. An diesem Brückenantikörper findet dann die Enzym-Substrat-Reaktion statt. Als Enzym kommen Alkalische Phosphatase oder Peroxidase zum Einsatz.

Um die Antigen-Antikörper-Bindungen letztlich sichtbar zu machen, existieren verschiedene gebrauchsfertige Kits. In unserem Fall kam die (Strept-)Avidin-Biotin-Komplex Methode (ABC-



Antigen gibt. Die, wie in Abschn. 2.4.1 beschrieben, angefertigten Schnitte mussten zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern, folgte darauf die Inkubation mit Normalserum<sup>28</sup> (über 20 min). Das Normalserum stammte, wie auch der später verwendete Sekundärantikörper, vom Pferd, und sollte unspezifische Bindungen an Gewebsproteine absättigen [150]. Anschließend wurde der Primärantikörper hinzugegeben, mit dem bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Dabei handelte es sich um einen monoklonalen Anti- $\alpha$ -smooth-muscle-actin-Antikörper<sup>29</sup> (Maus anti Mensch).

Nächster Schritt war die Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers<sup>30</sup>. Dieser wurde nach zweimaligem Spülen mit PBS-Puffer<sup>31</sup> aufgetragen. Nach 30 Minuten erfolgte erneut eine Spülung mit PBS-Puffer, bevor dann die 50 minütige Inkubation mit dem AB-Komplex<sup>32</sup> begonnen wurde. In diesem Fall ist die alkalische Phosphatase als Enzym an das Avidin gekoppelt gewesen. Anschließend wurde mit einem Chromogenpuffer<sup>33</sup> gespült und daraufhin das Substrat Vector®Red<sup>34</sup> (in 100-200 mM Tris-HCl, pH 8,2-8,5 gelöst) hinzugegeben. Durch die alkalische Phosphatase wurde das Substrat umgesetzt und führte zu einer Rotfärbung. Die ASMA-Moleküle der Myofibroblasten waren nun also optisch sichtbar. Die Farbreaktion musste nach ausreichend langer Dauer mit Hilfe einer Pufferlösung gestoppt werden. Dazu wurden die Schnitte während der Färbung unter dem Mikroskop beobachtet, wobei glatte Gefäßmuskelzellen als interne Positivkontrolle herangezogen wurden. Desweiteren diente ein Schnitt einer nativen Flexorsehne als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde außerdem jeweils ein Schnitt mit Pufferlösung anstelle des Antikörpers inkubiert. Zuletzt wurde noch eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Methylgrün<sup>35</sup> durchgeführt. Sie diente der generellen Sichtbarmachung aller Zellen und ermöglichte die morphologische Beschreibung der angefärbten Myofibroblasten. Nachdem die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert worden waren, deckelten wir sie mit dem Einschlussmittel Vitro-Clud®<sup>36</sup> ein.

---

<sup>28</sup>Normal Horse Serum, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>29</sup>Actin (Smooth Muscle), Monoclonal Mouse Anti-Human, Klon 1A4, DAKO A/S, Glostrup, Denmark

<sup>30</sup>Vectastain®, Biotinylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG, Made in Horse, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>31</sup>Phosphatpuffer Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

<sup>32</sup>ABC kit, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>33</sup>Trizma®T-1503, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Trizma®Hydrochloride T-3253, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA  
Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt

<sup>34</sup>Vector®Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

<sup>35</sup>Certistain®Methylgrün, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>36</sup>Vitro-Clud®, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

### **2.4.3 Polarisationsmikroskopie**

Mit Hilfe des Polarisationsmikroskopes ist es möglich, die molekulare Struktur und Ordnung von Geweben darzustellen und genauer zu untersuchen. Es handelt sich dabei um ein Lichtmikroskop, das mit polarisiertem Licht arbeitet. Für das entstehende Bild ist die optische Eigenschaft der zu untersuchenden Probe von grundlegender Bedeutung. Man unterscheidet optisch doppelbrechende (anisotrope) und einfachbrechende (isotrope) Substanzen. Anisotrop bedeutet, dass die Substanz in der Lage ist, einen Lichtstrahl in zwei Strahlen zu zerlegen, dessen Schwingungsebenen senkrecht zueinander stehen. Nimmt eine Substanz keinen Einfluss auf den Lichtstrahl, nennt man sie isotrop. Kollagene Fasern gehören zu den anisotropen Geweben.

Im Polarisationsmikroskop trifft das einfallende, natürliche Licht zunächst auf einen Polarisator (meist eine doppelbrechende Folie, die organische Farbstoffe enthält). Dieser lässt nur Teile des natürlichen Lichtes passieren. Ein ordentlicher Lichtstrahl, der in alle Richtungen schwingt, wird von der Folie komplett absorbiert. Nur ein außerordentlicher Lichtstrahl, der in einer Richtung parallel zum Polarisator schwingt, gelangt durch die Folie. Dieses linear-polarisierte Licht trifft nun auf das Präparat. Handelt es sich dabei um eine doppelbrechende Substanz, wie z.B. Kollagen, wird das eintretende Licht in zwei Komponenten aufgespalten und die Schwingungsebene gedreht. Der nachgeschaltete Analysator, eine weitere doppelbrechende Folie, die senkrecht zum Polarisator steht, lässt nur Licht einer bestimmten Schwingungsrichtung passieren. Diejenigen Strukturen, die das Licht gleichsinnig drehen, erscheinen bei entsprechender Position des Präparates (bei der das Licht genau so gedreht wird, dass es den Polarisator passieren kann) also leuchtend. Das Präparat wird dabei solange gedreht, bis es in maximaler Helligkeit erscheint [78, 24].

Diese Methode zur plastischen Darstellung von geordneten Molekülstrukturen wurde genutzt, um die Kollagentertiärstruktur der entnommenen Transplantate zu untersuchen. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie ließ sich die Frequenz der wellenförmig verlaufenden Kollagenfaserbündel, der sogenannte Kollagencrimp, darstellen.

## **2.5 Kollagenanalyse**

In der Literatur sind drei Methoden zur quantitativen Kollagenanalyse bekannt: die Chromatographie, der ELISA (enzyme linked immuno essay) und die Elektrophorese. Diese werden nach

Aufspaltung der Proteine mittels Bromzyan oder Pepsin durchgeführt, um die einzelnen Peptide der verschiedenen Kollagentypen zu quantifizieren.

Lange wurde die Chromatographie als „Gold-Standard“ angesehen, obwohl nur eine schlechte Auftrennung kleiner Moleküle erreicht werden kann und sie technisch aufwändig und teuer ist. Der große Nachteil des ELISA liegt darin, dass die geringe Antigenität des Kollagens zu Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Kollagentypen führen kann. Dies kann eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge haben. Um die Elektrophorese zur Auftrennung der Kollagenmoleküle zu verwenden, war früher eine aufwändige Vorbehandlung des Materials notwendig. Nicht-kollagene Proteine mussten entfernt werden, wozu meist eine HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie) vorgeschaltet wurde [5, 6, 8, 64, 166].

Laurent et al. [85] entwickelte diese Methode 1981 weiter, wodurch sie einfacher, praktikabler und für die Analyse kleiner Gewebeproben anwendbar wurde [103]. Um nicht-kollagene Moleküle aus dem Analysematerial zu entfernen, verwendete er Natrium-Dodecylsulfat (SDS). Somit entfiel die aufwändige Reinigung des Materials vor der Spaltung. Um die Kollagenmoleküle in einzelne Peptide aufzuspalten, benutzte er Bromzyan. Der Vorteil des Bromzyans gegenüber Pepsin besteht darin, dass es Kollagen bis zu 90 % spaltet [87]. Anschließend folgte die Gelelektrophorese, an die eine direkte semiquantitative Analyse mittels densitometrischem Scan angeschlossen werden konnte.

Die Methode nach Laurent et al. wurde zunächst von Riesle et al. [121] und später von Riechert et al. [120] noch leicht modifiziert.

## 2.5.1 Aufarbeitung des Materials

Die Kollagenanalyse erfolgte nach dem Protokoll der Methode von Riechert et al. [120].

Das verwendete Material wurde direkt nach der Entnahme während der Operation in physiologische Kochsalzlösung gegeben und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank.

Zur weiteren Bearbeitung wurde das Material bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und zunächst auf einer mit Repel-Silane<sup>37</sup> gereinigten Glasplatte manuell von Fett und Synovialresten befreit.

---

<sup>37</sup>Dimethyldichlorsilane solution, 2 % w/v, in octamethylcyclotetrasiloxane, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden

Anschließend wurden die Proben in Eppendorfgläser überführt. Nach Trocknung im Vakuumexsikkator über Phosphor-V-Oxid<sup>38</sup> erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Probe, der sich die zweimalige Homogenisierung in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS)<sup>39</sup> durch den Homogenisator Labsonic U 2000 von Braun anschloss (je 2 min).

Es folgte die Reinigung der Probe von nichtkollagenen Molekülen, was durch die Zugabe von 2 %-igem SDS<sup>40</sup> erreicht wird. Das SDS wurde zu der Probe gegeben und das Gemisch 2 Minuten homogenisiert, nach anschließender Zentrifugation bei 10000g wurde der nicht-kollagene Moleküle enthaltende Überstand verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde viermal wiederholt.

Nach dreimaliger Extraktion mit 3 ml PBS (der Überstand wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 5000 Umdrehungen/min. jeweils verworfen) schloss sich erneut eine zweimalige Homogenisierung (je 2 min) an, als Medium diente dieses Mal Aceton<sup>41</sup>. Anschließend wurden die Proben im Vakuumexsikkator 10 min getrocknet.

Nächster Arbeitsschritt war die zweimalige Homogenisierung (je 2 min) in 70 %-iger Ameisensäure<sup>42</sup>. Es erfolgte eine Volumenzugabe von je 1 ml pro 10 mg Trockengewicht der Probe, welches durch die Feinwaage<sup>43</sup> und die Subtraktion des vorher notierten Leergewichts des jeweiligen Eppendorfgläses ermittelt wurde. Der Homogenisierung schloss sich wiederum eine jeweils 5 minütige Zentrifugation und im ersten Durchgang auch der Verwurf des Überstandes an. Nach dem zweiten Durchgang wurde der Überstand nicht verworfen und die Proben bei 60°C 40 min unter ständigem Schütteln im Eppendorf®Thermomixer<sup>44</sup> inkubiert.

## 2.5.2 Proteinspaltung mittels Bromzyan

Die folgende Zugabe von kristallinem Bromzyan<sup>45</sup> wurde unter strenger Beachtung der Arbeitsschutzverordnung durchgeführt, was das Tragen einer Atemvollmaske<sup>46</sup> beinhaltete. Die Konzentration betrug 50 mg Bromzyan pro ml Lösung (also pro ml zugegebener Ameisensäure). Zur

---

<sup>38</sup>Lancaster Synthesis, Eastgate, White Lund, Morecambe, England

<sup>39</sup>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, A-4061 Pasching, Austria

<sup>40</sup>Bio-Rad Laboratories 2000 Alfred Nobel Dr Hercules, CA, USA

<sup>41</sup>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>42</sup>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>43</sup>Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

<sup>44</sup>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

<sup>45</sup>Sigma-Aldrich, Switzerland

<sup>46</sup>3S-Basis Plus Vollmaske, MSA AUER GmbH, Berlin, Deutschland

Bromzyanspaltung wurden die Proben daraufhin für 20 Stunden im Eppendorfmixer deponiert. Gestoppt wurde die Spaltung anschließend durch die 20 minütige Zentrifugation bei 10000 g. Unter einem Abzugsschrank wurden 0,25 ml des Überstandes abpipettiert und bei -20°C gelagert. Darauf folgte die zweite Bromzyanspaltung, welche dem oben beschriebenen Ablauf entsprechend durchgeführt wurde.

Zur Trocknung der Proben wurden diese dann, nachdem sie auf -80°C abgekühlt worden waren, über Nacht im Lyophilisator<sup>47</sup> untergebracht.

### 2.5.3 Gelelektrophorese

Es folgte die Gelelektrophorese, um die Proteinfragmente aufzutrennen. Bei den verwendeten Gelen handelte es sich um 4-20 %-ige Tris-Glycin Gele<sup>48</sup>, als Probenpuffer diente SDS (63 mM Tris HCL<sup>49</sup> pH 6,8, 10 % Glycerol<sup>50</sup>, 2 % SDS, 250 ml Aqua dest.). Das Probenmaterial wurde in einem Verhältnis von 4 mg Probenmaterial pro 60 µl Puffer gelöst. Durch Zugabe von 1 µl 10N NaOH erfolgte zunächst die Neutralisation, anschließend die Reduktion mit Hilfe von 50 mM DTT (10 % des Probevolumens). Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 8 min bei 95°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert und daraufhin 5 min bei 10000 g in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Zuletzt wurden die Proben dann noch einmal mit SDS verdünnt, diesmal im Verhältnis 1:160. Um die Lauffront auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde jeweils 1 µl gesättigte Bromphenolblaulösung hinzugegeben.

Auf die Tris-Glycin Gele wurden je 15 µl verschiedener Proben, 1 µl eines Multicolormarkers<sup>51</sup> und 15 µl der Standards für Kollagen I<sup>52</sup> und III<sup>53</sup> aufgetragen. Die Laufkammern des Novex Systems<sup>54</sup> wurden standardmäßig mit Lämmli (25 mM Tris HCL, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) als Laufpuffer gefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst eine Stunde lang bei 10 mA/Gel, anschließend bei 30 mA/Gel bis die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreichte.

---

<sup>47</sup>Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

<sup>48</sup>Novex®, Invitrogen, Carlsbad, USA

<sup>49</sup>Sigma-Aldrich, Switzerland

<sup>50</sup>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>51</sup>MultiMark®, Multi-Colored Standard, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

<sup>52</sup>Collagen from bovine achilles tendon, Type I, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
Purified bovine collagen type I, Chemicon International, Inc., Ca

<sup>53</sup>Collagen from calf skin, Type III, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
Purified bovine collagen type III, Chemicon International, Inc., Ca

<sup>54</sup>X Cell Sure Lock™, Novex, San Diego, USA

## 2.5.4 Silberfärbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde die sogenannte Färbung nach Klose angewendet, welche eine Modifikation der Heukeshovenfärbung (1988) darstellt. Die Gele wurden in eine ausreichend große Glasschale gelegt, die auf einem Rütteltisch platziert wurde. Hierdurch war ein gleichmäßiger Kontakt der gesamten Geloberfläche mit dem jeweiligen Färbemedium gewährleistet. Diese wurden nun nach dem Protokoll aus Abb. 2.6 in die Glasschale gegeben, wobei die Lösungen zwischen den einzelnen Arbeitsschritten vorsichtig abgesaugt werden mussten. Anschließend folgte die Trocknung der Gele über 2 bis 2,5 h bei 80°C im Geltdrockner.

Arbeitsschritt	Zeit	Reagenzien
Fixierung	mind. 2 h	500 ml Ethanol <sup>55</sup> , 100 ml Essigsäure <sup>56</sup> , 400 ml Aqua dest.
Inkubation	2 h	4 g Natriumacetat <sup>57</sup> , 200 mg Natriumthiosulfat <sup>57</sup> 300 ml Ethanol, 20 ml Glutaraldehyd <sup>56</sup> , Aqua dest. ad 1 l
Wässerung	2 x 20 min	1 l Aqua dest.
Färbung	30 min	1 g Silbernitrat <sup>56</sup> , 270 µl Formalin <sup>56</sup> , Aqua dest. ad 1 l
Wässerung	einige sec	1 l Aqua dest.
Spülung	1 min	25 g Natriumcarbonat <sup>56</sup> , Aqua dest. ad 1 l
Entwicklung	5-20 min	25 g Natriumcarbonat, 270 µl Formalin, 0,5 g Natriumhydrogencarbonat, 0,02 g Thimerosal (Natriumethylmercurithiosalicylat) <sup>58</sup> , Aqua dest. ad 1 l
Stop	mind. 20 min	18,5 g Titriplex III (Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure (Na-EDTA)) <sup>56</sup> , Aqua dest. ad 1 l
Wässerung	3 x 20 min	1 l Aqua dest.

Abb. 2.6: Protokoll der Silberfärbung nach Klose, Standardvorschrift

<sup>55</sup>Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

<sup>56</sup>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>57</sup>Sigma-Aldrich, Switzerland

<sup>58</sup>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

## 2.6 Auswertung der Daten

### 2.6.1 Zellen (deskriptiv und quantitativ)

Zur deskriptiven Auswertung der angefertigten Präparate wurden die Längsschnitte in verschiedenen Vergrößerungen (1.6, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100) unter dem Lichtmikroskop<sup>59</sup> betrachtet. Über eine Kamera<sup>60</sup> konnten die Bilder digitalisiert und dann mit Hilfe eines Bildanalyseystems<sup>61</sup> ausgewertet werden.

Alle Transplantate der zwei Versuchsgruppen wurden untersucht, wobei von jedem einzelnen Transplantat mehrere Längsschnitte betrachtet wurden. Da sich mit Hilfe der HE-Färbung Zellen besonders gut darstellen lassen, diente sie der Beurteilung der Zell- und Kernmorphologie, deren Größe und auch der Verteilung der Zellen im Transplantat. Unterschieden wurden runde, ovoide und spindelförmige Zellen, und ob sich diese zentral, peripher oder gleichmäßig im gesamten Präparat befanden.

Anschließend erfolgte die quantitative Auswertung. Die angewendete Methodik entsprach der der Vergleichsgruppe. Zunächst wurde mit Hilfe einer geringen Vergrößerung (1.6, 2.5, 5) ein Überblick über die einzelnen HE-gefärbten Längsschnitte gewonnen. Anschließend erfolgte in 20-facher Vergrößerung die zufällige Auswahl von 10 Gesichtsfeldern. In diesen Gesichtsfeldern wurden alle Zellen per Mausclick markiert und vom Bildanalyseystem gezählt, sowie die durchschnittliche Zellzahl pro mm<sup>2</sup> Fläche berechnet.

### 2.6.2 Myofibroblasten (deskriptiv)

Die Auswertung der immunhistologisch angefärbten Schnitte sollte ursprünglich sowohl deskriptiv als auch quantitativ erfolgen. Dies sollte nach demselben Verfahren durchgeführt werden, das auch die Vergleichsgruppe zur Auswertung verwendet hatte. In zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern von Längsschnitten wurden die ASMA-positiven Zellen, die eindeutig als Myofibroblasten identifiziert werden konnten, gezählt. Mit Hilfe des Bildanalyseystems ließ sich daraus berechnen, wieviele Zellen pro mm<sup>2</sup> Fläche im Durchschnitt in einem Präparat zu finden waren.

---

<sup>59</sup>DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

<sup>60</sup>Sony Color Video Camera, Modell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

<sup>61</sup>KS 400 3.0, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland

Bei der Betrachtung der Präparate fiel jedoch auf, dass die Verteilung der ASMA-positiven Zellen extrem inhomogen war. Neben großen, völlig avitalen Bereichen, in denen gar keine Zellen gesehen werden konnten, gab es Bereiche, in denen die Myofibroblasten dicht aneinandergedrängt lagen. Eine quantitative Auswertung in zehn zufällig gewählten Gesichtsfeldern erschien uns daher zu sehr von der Wahl der Gesichtsfelder abzuhängen. Außerdem hätte diese Art der Auswertung das tatsächliche Bild der Myofibroblastenverteilung in keiner Weise wiedergegeben. Zur Beratung der Problematik zogen wir sowohl Mitglieder aus der Gruppe der Vorläuferstudie, als auch weitere Personen, die in unserem Hause an Myofibroblasten geforscht hatten, hinzu. Gemeinsam wurde die Entscheidung getroffen, die Auswertung rein deskriptiv vorzunehmen.

Wichtig war hierbei, dass die Myofibroblasten klar als solche identifiziert wurden.  $\alpha$ -smooth-muscle Aktin wird auch von Perizyten und Gefäßmuskelzellen exprimiert, so dass auch diese Zellen positive Signale zeigten. Zur Differenzierung wurden deshalb in erster Linie die charakteristische morphologische Gestalt der Myofibroblasten, aber auch ihre Lage im Gewebe herangezogen. Zellen in direkter Umgebung von Gefäßen wurden nicht berücksichtigt.

### **2.6.3 Kollagencrimp (deskriptiv und quantitativ)**

Die deskriptive Auswertung des Crimps erfolgte ebenfalls mit Hilfe des in Abschn. 2.6.1 beschriebenen Bildanalyse-Systems. HE-gefärbte Längsschnitte wurden im Polarisationsmikroskop in verschiedenen Vergrößerungen betrachtet. Durch das Polarisationsmikroskop entsteht ein dreidimensional erscheinendes Bild, so dass sich die wellenförmige Struktur des Kollagens besonders gut erkennen und beschreiben lässt. Von Interesse waren dabei die Homogenität des Crimps innerhalb eines Schnittes, die Frequenz der Wellen und die Strukturierung des Gewebes durch bindegewebige Septen. Außerdem diente die Masson-Goldner-Färbung der Analyse der Anordnung von Kollagen und Septen.

Die quantitative Auswertung des Kollagencrimps wurde in denselben 10 Gesichtsfeldern durchgeführt, die zur Auswertung der Gesamtzellzahl ausgewählt worden waren. Die HE- oder  $\alpha$ -sma-gefärbten Schnitte wurden im Polarisationsmikroskop betrachtet, um einen dreidimensionalen Eindruck von der Kollagentertiärstruktur zu erhalten. Anhand einer kalibrierten Skala wurde die Kollagenfibrillenfrequenz dann in den 10 Gesichtsfeldern gemessen. Daraus errechnete das Computerprogramm die mittlere Wellenlänge des Kollagencrimps in  $\mu\text{m}$ .

## 2.6.4 Kollagentypisierung

Die Auswertung der Kollagenspaltprodukte erfolgte mittels eines Densitometers<sup>62</sup>. Nach der Färbung wurden die Gele eingescannt, wodurch die Dichte der einzelnen Banden ermittelt und in elektronische Daten umgewandelt wurde. Mit Hilfe der Analysesoftware Quantity One®<sup>63</sup> konnten diese dann graphisch dargestellt und ausgewertet werden.

Für die Kollagentypen I und III sind aus der Literatur spezifische Markerpeptide bekannt. Es sind Peptide, die bei der Spaltung des jeweiligen Kollagens mit Bromzyan in größerer Menge entstehen. Außerdem stellen sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte verschiedene Banden auf den Gelen dar, so dass sie eindeutig identifiziert werden können. Dabei handelt es sich um  $\alpha_1$ (I) CB7 + CB8 (24+25 kDa) für Kollagen I und  $\alpha_1$ (III) CB3 (7 kDa) für Kollagen III [5, 8, 33, 45, 133]. Zur Identifizierung wurde auf jedem Gel ein Multicolormarker mitgeführten Peptide bekannter Molekulargewichte enthielt. Er diente somit als Skala in der Einheit kDa. Desweiteren wurden Standards von reinem Kollagen I und III mitgeführt, um eine Quantifizierung zu ermöglichen.

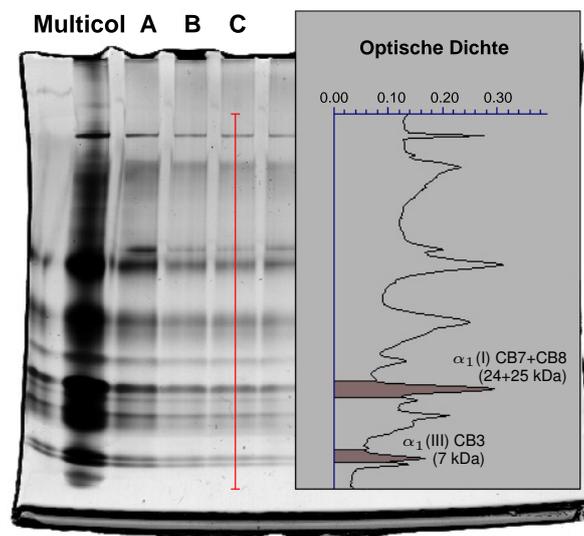


Abb. 2.7: Densitometrische Auswertung der Kollagenspaltprodukte. Die Dichte der Markerpeptid-Banden einer Probe (hier Probe C) werden gemessen und graphisch dargestellt. Die Fläche unter dem Graphen wird errechnet. Grenzen sind die unteren Umkehrpunkte vor und nach dem Peak.

<sup>62</sup>GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad, CA, USA

<sup>63</sup>Quantity One®, Quantitation Software Version 4.2, Bio-Rad, CA, USA

Die Dichte der Banden, die sich aus den Markerpeptiden zusammensetzten, wurde mittels der Analysesoftware errechnet. In der graphischen Darstellung der Bandenmuster wurden die unteren Umkehrpunkte vor und hinter dem jeweiligen Gipfel festgelegt und anschließend die Fläche unter dem Graphen integriert (s. Abb. 2.7). Anhand der Standards sollte die optische Dichte der Markerpeptide bei einer bekannten Menge an reinem Kollagen I bzw. III errechnet werden. Im Rahmen der angewendeten Methode konnte allerdings kein reproduzierbarer Standard etabliert werden. Eine Quantifizierung der Proben war somit nicht möglich.

### **2.6.5 Statistik**

Die Durchführung eines Kolmogorov-Smirnov-Tests zeigte, dass bei den ermittelten Daten keine Normalverteilung vorlag. Außerdem war eine sehr hohe Schiefe der Werte festzustellen. Deshalb wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Rangsummen-Tests, einem nicht parametrischen Test, statistisch ausgewertet.

# 3 Ergebnisse

Bei allen 18 Schafen verliefen die Operation sowie die postoperative Phase komplikationslos. Die Wundheilung verlief unauffällig und nach durchschnittlich 2 Wochen war eine Vollbelastung der operierten Gelenke zu beobachten. Somit musste kein Tier aus der Studie ausgeschlossen werden.

Um die Ergebnisse der PES-sterilisierten Transplantate unserer Arbeitsgruppe einordnen und vergleichend darstellen zu können, werden in diesem Teil der Arbeit nun auch Ergebnisse der in Abschn. 2.1 beschriebenen Vorläuferstudie als Vergleichswerte herangezogen. Diese Arbeitsgruppe hatte mit identischer Methodik autologe und nicht-sterilisierte, allogene VKB-Transplantate vergleichend untersucht.

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mediane, das Signifikanzniveau betrug  $p < 0,05$ .

## 3.1 Zellen

### Zeitpunkt 0

#### *Deskriptiv*

Zum Zeitpunkt Null wurden native Kreuzbänder, native Flexorsehnen und PES-sterilisierte Flexorsehnen analysiert. Bei allen drei Typen waren die Zellen regelmäßig über das ganze Präparat verteilt und longitudinal zwischen den Kollagenfasern ausgerichtet. Das gesamte Gewebe wurde gleichmäßig von bindegewebigen Septen durchzogen, in denen Gefäße verliefen. Die Zellkerne des nativen Kreuzbandes stellten sich stabförmig bis ovoid dar, während die der Flexorsehnen ein langgezogenes, spindelförmiges Erscheinungsbild zeigten. Eine ovoide Morphologie ist dabei Hinweis auf eine metabolische Aktivität der Zelle, spindelförmige Zellen sind dagegen inaktiv. Während die Synovialmembran in der nativen und PES-sterilisierten Flexorsehne 3-5 lagig war, zeigte sie sich im nativen Kreuzband 4-8 lagig, in einzelnen Synovialzotten waren bis zu 20 Zelllagen zu sehen.

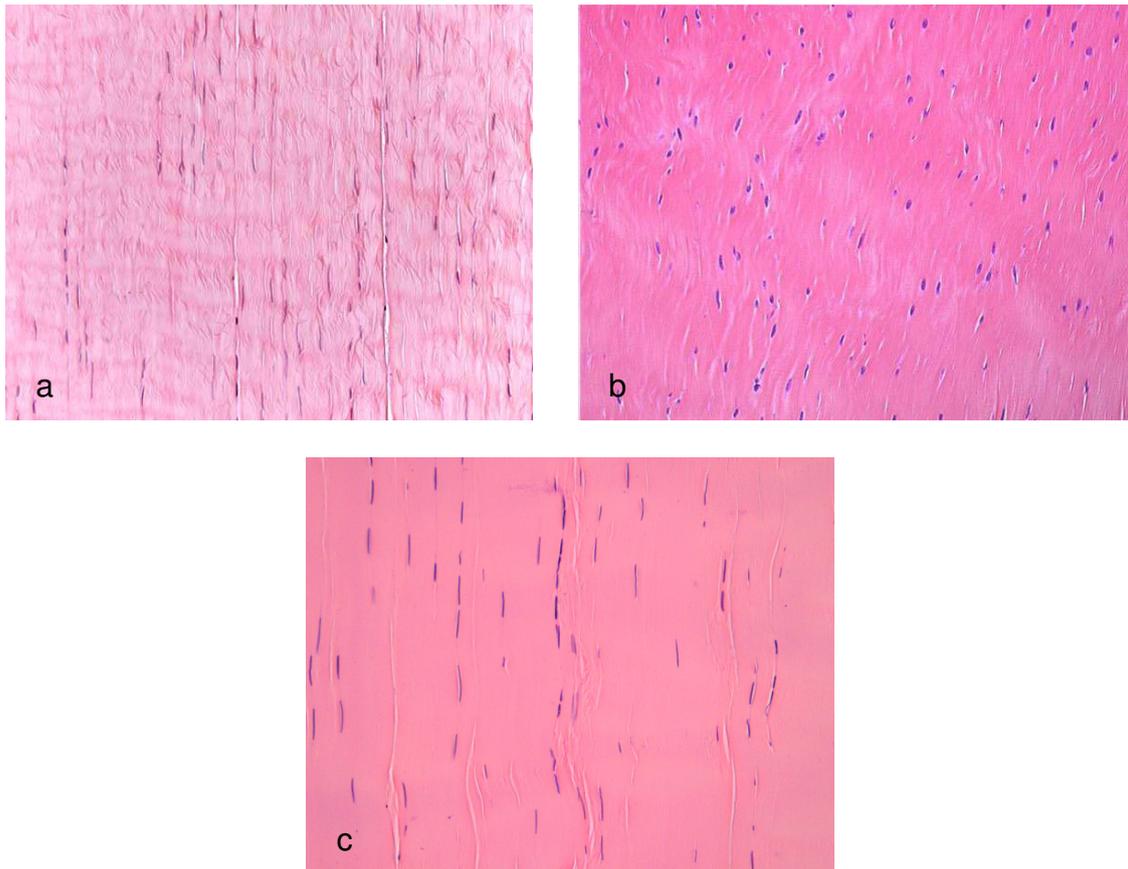


Abb. 3.1: Native Flexorsehne (a), natives VKB (b), HE 20x, aus [41] und PES-sterilisierte Flexorsehne (c): Die Zellen sind gleichmäßig im Gewebe verteilt. Die Zellkerne der nativen und PES-sterilisierten Flexorsehne sind spindelförmig und flach, die des nativen VKBs stabförmig bis ovoid.

### *Quantitativ*

Die Gesamtzellzahl der PES-sterilisierten Flexorsehne betrug zum Zeitpunkt Null  $247,5 / \text{mm}^2$  (Min:  $210,6 / \text{mm}^2$ , Max:  $252,8 / \text{mm}^2$ ) und befand sich damit auf dem gleichen Niveau wie die der nativen Flexorsehne mit  $268,4 / \text{mm}^2$  (Min:  $102,5 / \text{mm}^2$ , Max:  $395,3 / \text{mm}^2$ ). Bei beiden war die Zellzahl signifikant niedriger ( $p=0,000$ ) als im nativen Kreuzband, wo sie bei  $581,1 / \text{mm}^2$  lag.

## **6 Wochen**

### *Deskriptiv*

Nach einer Standzeit von 6 Wochen war in den PES-sterilisierten Transplantaten, ähnlich wie bei den autologen und nicht-sterilisierten, allogenen, eine sehr inhomogene Zellverteilung zu beobachten. Peripher zeigten sich teils hyperzelluläre aber auch avitale Bereiche, in denen keinerlei Zellen zu sehen waren. Zentral waren meist große komplett avitale Bereiche (avaskulär und azellulär), die

von fingerförmig einwachsenden Zellsträngen durchzogen wurden. Dieses zell- und gefäßreiche Granulationsgewebe wuchs von peripher nach zentral ein. Im Vergleich zu den nicht-sterilisierten Allografts waren die avitalen Bereiche in den PES-Transplantaten deutlich ausgeprägter bzw. ausgedehnter. Zwei der PES- Präparate waren, abgesehen von der Synovialschicht, sogar beinahe völlig zellos. Die Zellkerne der Fibroblasten zeigten überwiegend eine spindelförmige Morphologie, was auch bei den nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten der Fall war.

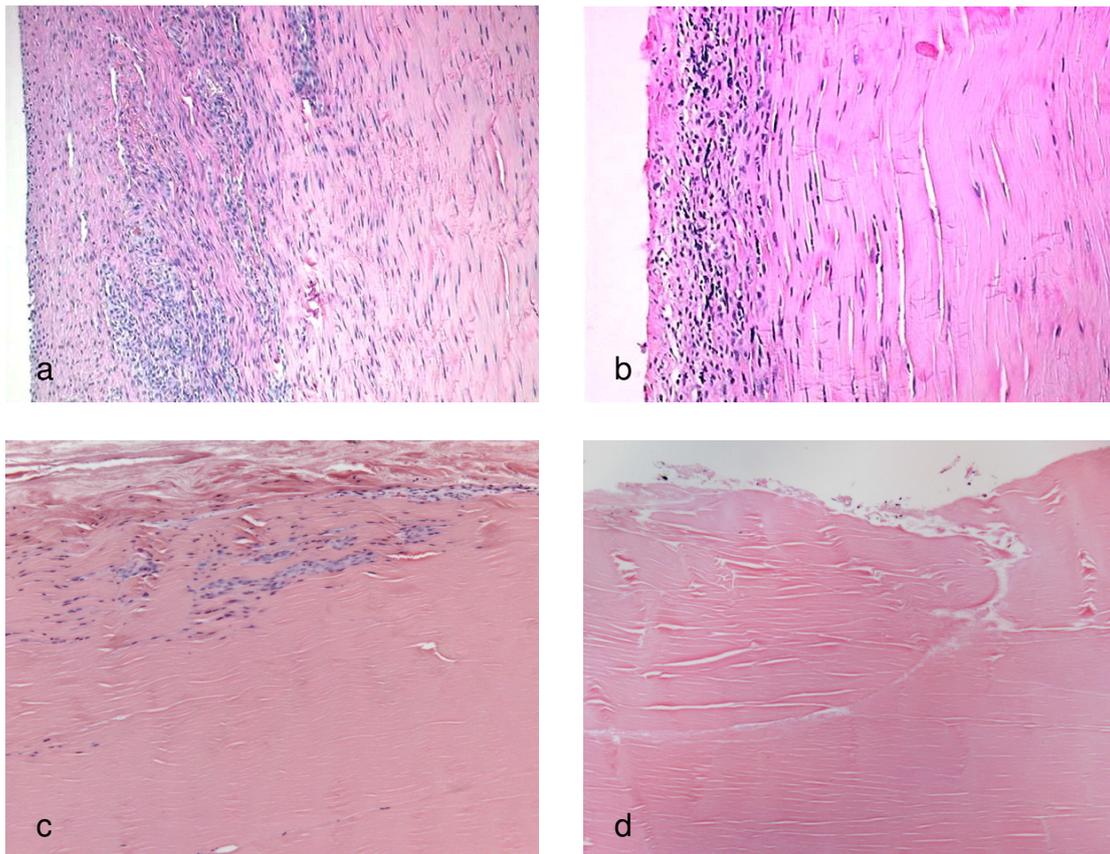


Abb. 3.2: Zellen: Autograft (a), nicht-sterilisiertes Allograft (b) aus [41] und PES-sterilisiertes Allograft (c + d) nach 6 Wochen, HE, 5x: Im autologen und nicht-sterilisierten Transplantat ist die Hyperzellularität in der Peripherie deutlich sichtbar (a + b). Die PES-sterilisierten Transplantate zeigten vereinzelt ein ähnliches Bild (d), große Areale waren jedoch völlig azellulär (d)

Die Synovialmembran stellte sich bei den PES-sterilisierten Transplantaten sehr zell- und kapillarreich dar. Meist war sie 3-10 lagig, bei den nicht-sterilisierten, allogenen war sie überwiegend 4-8 lagig, teilweise waren aber in beiden Gruppen auch bis zu 20 Lagen zu beobachten.

### *Quantitativ*

Bezüglich der Gesamtzellzahl hatte die Vorläuferstudie ergeben, dass sie im nicht-sterilisierten, allogenen Transplantat mit  $137,6/\text{mm}^2$  (Min:  $23,4/\text{mm}^2$ , Max:  $250,7/\text{mm}^2$ ) signifikant geringer ( $p=0,015$ ) als im autologen Gewebe mit  $217,7/\text{mm}^2$  (Min:  $153,8/\text{mm}^2$ , Max:  $350,4/\text{mm}^2$ ) war. Im PES-sterilisierten Transplantat lag sie bei  $92,0/\text{mm}^2$  (Min:  $11,4/\text{mm}^2$ , Max:  $573,6/\text{mm}^2$ ) und war somit niedriger als im autologen (Tendenz), und auch geringfügig niedriger als im nicht-sterilisierten, allogenen Transplantat (PES vs. ALLO  $p=0,481$ , PES vs. AUTO  $p=0,059$ ).

## **12 Wochen**

### *Deskriptiv*

Nach 12 Wochen war in den PES-Präparaten insgesamt schon eine deutlich homogenere Zellverteilung zu erkennen. Die Hyperzellularität in der Peripherie hatte etwas zugenommen, außerdem waren nun auch zentral größere zellreiche Gebiete zu sehen. Der Anteil an avitalen Bereichen im Zentrum hatte im Vergleich zur 6-Wochen-Gruppe abgenommen, bezogen auf die nicht-sterilisierten, allogenen 12-Wochen-Transplantate war er allerdings noch deutlich höher. Im autologen Gewebe waren die Gefäße und Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits wieder über das ganze Transplantat verteilt. Die Zellkerne in den PES-Transplantaten zeigten vereinzelt eine ovoide Form, zu großen Teilen waren sie jedoch nach wie vor von spindelförmiger Gestalt, während sowohl in den Autografts als auch in den nicht-sterilisierten Allografts eine Entwicklung hin zu ovoider Gestalt festzustellen war. Insgesamt etwas weniger stark ausgeprägt als nach 6 Wochen stellte sich die Synovialmembran dar. Sie bestand aus etwa 3-8 Zelllagen, die der allogenen Transplantate aus 5-8.

### *Quantitativ*

Bei der Betrachtung der Gesamtzellzahl fiel auf, dass die der PES-Transplantate im Vergleich zur Zahl nach 6 Wochen zwar leicht, aber nicht signifikant ( $p=0,258$ ) zugenommen hatte. Mit  $169,0/\text{mm}^2$  (Min:  $16,2/\text{mm}^2$ , Max:  $653,3/\text{mm}^2$ ) war sie nicht nur signifikant niedriger ( $p=0,023$ ) als die der autologen ( $446,2/\text{mm}^2$ , Min:  $241,2/\text{mm}^2$ , Max:  $978,2/\text{mm}^2$ ), sondern auch signifikant geringer ( $p=0,040$ ) als die der nicht-sterilisierten, allogenen ( $555,4/\text{mm}^2$ , Min:  $154,2/\text{mm}^2$ , Max:  $1756,1/\text{mm}^2$ ) Transplantate. Der Unterschied zwischen autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten war hingegen nicht mehr signifikant ( $p=0,563$ ).

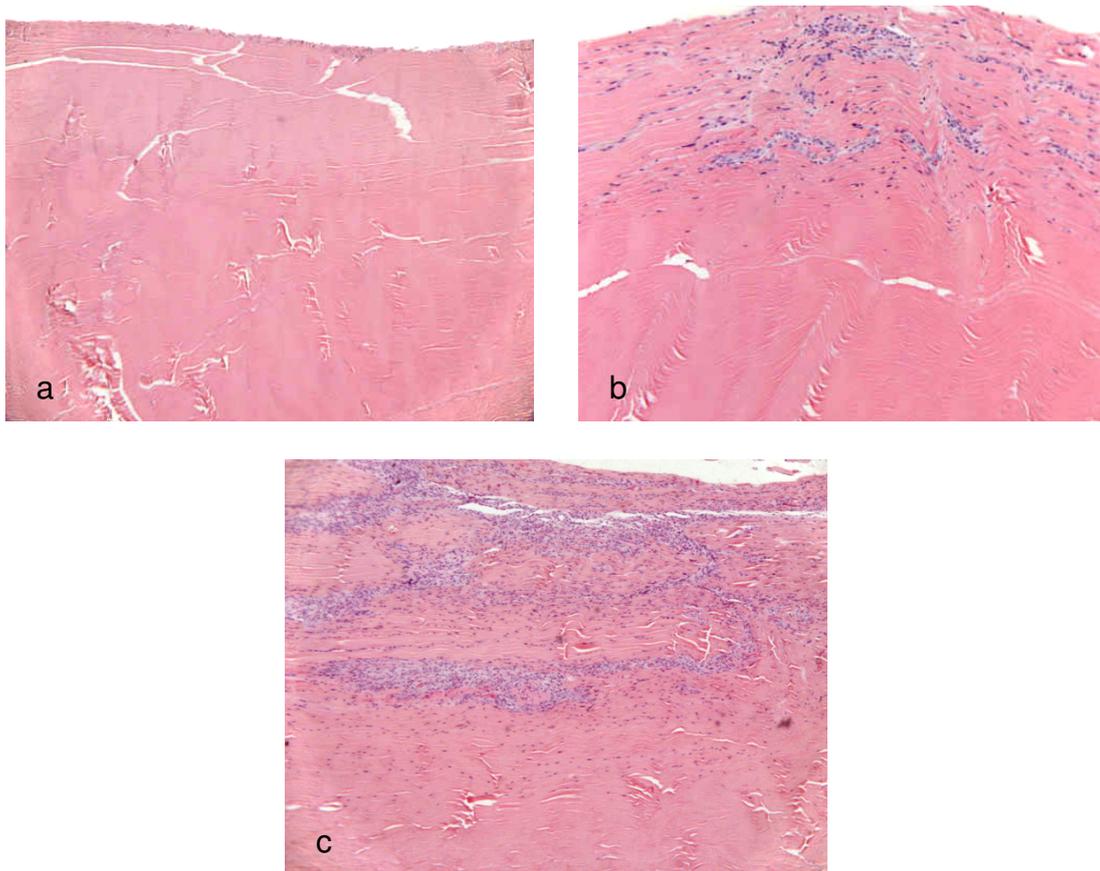


Abb. 3.3: PES-sterilisiertes VKB nach 6 Wochen (a+b) und 12 Wochen (c), HE, 5x: Nach 6 Wochen zeigten sich in vielen Präparaten große azelluläre Bereiche (a), teilweise war die Wiederbesiedlung mit Zellen von der Peripherie ausgehend zu beobachten (b). Von 6 auf 12 Wochen nahm die Zellzahl in einigen Bereichen sichtbar zu (c), stieg insgesamt aber nicht signifikant an.

### Zusammenfassender Vergleich

Der Vergleich der PES-sterilisierten mit nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten zeigte folgende Auffälligkeiten: Die PES-sterilisierten Präparate wiesen schon nach einer Standzeit von 6 Wochen deutlich größere azelluläre und avaskuläre Bereiche auf. Diese waren in den nicht-sterilisierten, allogenen Präparaten nach 12 Wochen von peripher einwachsenden Zellen wieder recht ausgiebig besiedelt worden, während die PES-Präparate noch immer größtenteils avital erschienen. Die Hyperzellularität in der Peripherie, die bei den nicht-sterilisierten Allografts nach 6 Wochen gesehen wurde, war bei den PES-sterilisierten nicht so stark ausgeprägt. Nach 12 Wochen nahm sie zwar deutlich zu, blieb aber auch hier unter dem Niveau der allogenen Gruppe. Bezüglich der Kernmorphologie fiel auf, dass bei den nicht-sterilisierten Allografts im Rahmen des Remodelings nach 12 Wochen eine erkennbare Annäherung an die Gestalt des nativen VKBs stattgefunden hatte. Nach 52 Wochen zeigten sie eine identische Gestalt. Die Kernmorphologie in den

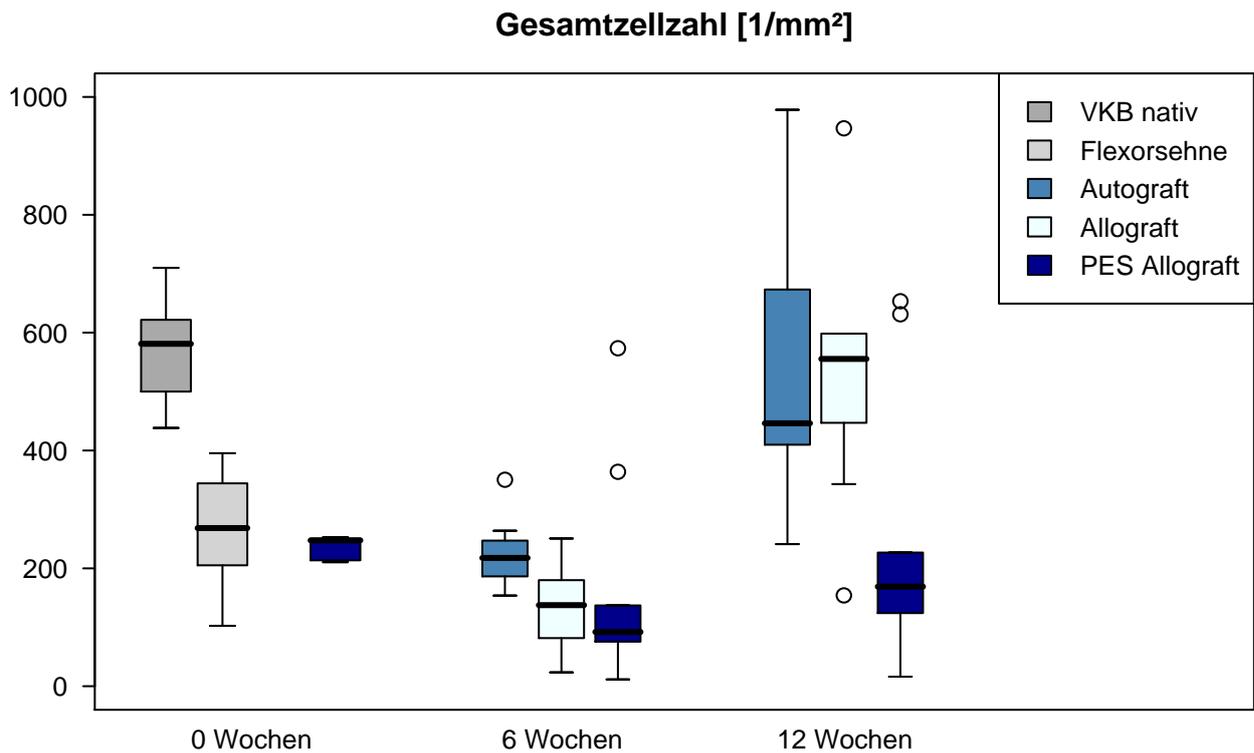


Abb. 3.4: Während sich die Zellzahl von Autograft und nicht-sterilisiertem Allograft nach 12 Wochen der des nativen Kreuzbandes annähern, ist beim PES-sterilisierten Allograft keine signifikante Veränderung von 6 zu 12 Wochen zu erkennen

PES-sterilisierten Präparaten wies dagegen nach 12 Wochen nur bei einzelnen Zellen eine ovoide Form auf, die Annäherung an die Gestalt des nativen VKBs schien langsamer abzulaufen. Die Synovialmembran zeigte sich deutlich reaktiv verbreitert, auffälliger, als es bei den Präparaten der nicht-sterilisierten, allogenen Gruppe zu sehen war. Außerdem waren vereinzelt Entzündungszellen zu finden, was auf eine leichte chronisch granulierende Entzündung hinwies. In den Schnitten der nicht-sterilisierten, allogenen Transplantate ist dies nicht der Fall gewesen.

Die Gesamtzellzahl der PES-sterilisierten Allografts war nach 6 Wochen ähnlich niedrig wie die der nicht-sterilisierten Allografts. Beide waren signifikant niedriger als die der nativen Flexorsehne und des nativen vorderen Kreuzbandes und auch niedriger als die der autologen Transplantate. Nach 12 Wochen war die Zellzahl in den nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten deutlich angestiegen. Sie war nun signifikant höher als die der nativen Flexorsehne und sogar höher also die des nativen VKBs und der autologen Transplantate (wenn auch nicht signifikant). Die Gesamtzellzahl der PES-sterilisierten Transplantate stieg dagegen nur gering an. Sie blieb deutlich unter dem Niveau des nativen Kreuzbandes und war somit signifikant niedriger als die der autologen und auch nicht-sterilisierten, allogenen Gruppe.

Insgesamt waren also durchaus die gleichen Entwicklungstendenzen von 6 zu 12 Wochen zu beobachten, es zeigte sich jedoch, dass das frühe Remodeling bei PES-sterilisierten Transplantaten verzögert ablief.

## 3.2 Myofibroblasten

### Zeitpunkt 0

Bei den immunhistologisch gefärbten Präparaten war zu erkennen, dass die Myofibroblasten in der nativen Flexorsehne relativ gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt waren, die Zellkerne waren schmal und spindelförmig. Im nativen VKB gab es dagegen ausgedehnte Bereiche, in

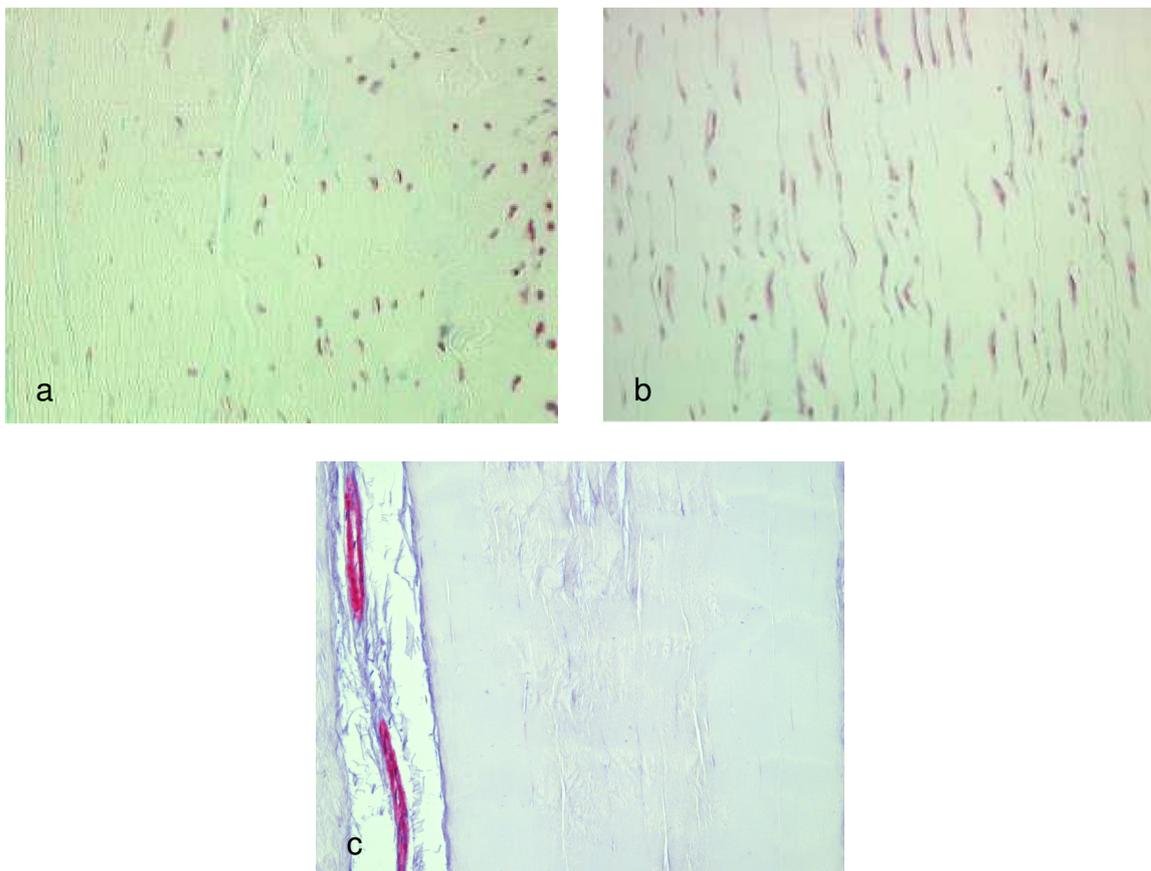


Abb. 3.5: Myofibroblasten zum Zeitpunkt 0,  $\alpha$ -sma Färbung: natives VKB (a), native Flexorsehne (b), 20x, aus [41]. PES-sterilisierte Flexorsehne (c) 5x. Im nativen VKB und der nativen Flexorsehne sind zahlreiche, rot angefärbte Myofibroblasten zu erkennen. In der PES-sterilisierten Flexorsehne ließen sich keine Myofibroblasten anfärben. Das deutlich rote Signal der glatten Muskelzellen der Gefäße zeigt, dass die Färbung selbst funktionierte.

denen sich keine Myofibroblasten befanden, dabei gab es bei den einzelnen Schnitten große Unterschiede. Die Zellkerne zeigten eine stab- bis ovoidförmige Gestalt. Zum Zeitpunkt Null waren in 8 von 9 PES-sterilisierten Sehnen auch nach mehrfacher Wiederholung und leichter Modifikation der Färbung gar keine Myofibroblasten angefärbt worden. In einer Sehne konnte eine minimale Anzahl in einem kleinen Bereich in der Peripherie identifiziert werden. Da aber die als positiv-Kontrolle herangezogenen Gefäße und auch Myofibroblasten in einem Kontroll-Schnitt einer nativen Flexorsehne deutlich angefärbt worden waren, muss davon ausgegangen werden, dass die PES-sterilisierten Flexorsehne keine Myofibroblasten enthielten (s. Abb. 3.5).

## **6 Wochen**

Nach 6 Wochen ergab sich bei den PES-sterilisierten Transplantaten folgendes Bild: Insgesamt war die Verteilung vollkommen inhomogen. Peripher waren stellenweise einzeln liegende Myofibroblasten zu finden, zentral stellten sich vereinzelt aus ASMA-positiven Zellen bestehende, fingerförmige Zellstränge dar. Die Myofibroblasten wuchsen also ausgehend von Synovia und Zellstraßen in das sonst azelluläre, avitale Gewebe ein. Ihre Zellkerne waren wie die der Fibrozyten von spindelförmiger Morphologie. Auch in den Präparaten der autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantate war dies zu sehen, allerdings in einem völlig anderen Ausmaß (s. Abb. 3.6). Das Gewebe erschien zwar insgesamt auch noch recht inhomogen, eine Neubesiedlung des Transplantates durch Myofibroblasten fand aber in vielen Bereichen statt. Ein Großteil der Peripherie war bereits myofibroblastenreich. In den PES-sterilisierten Transplantaten waren insgesamt deutlich weniger Myofibroblasten zu finden. Es befanden sich nur wenige, recht kleine, myofibroblastenreiche Stellen zwischen vielen großen, azellulären Arealen. In zwei Präparaten konnten außerdem praktisch keine Myofibroblasten identifiziert werden.

## **12 Wochen**

In der 12. Woche des Einheilungsprozesses ergab sich bei den PES-sterilisierten Transplantaten weitestgehend das gleiche Bild wie nach 6 Wochen. Die Verteilung der Myofibroblasten hatte sich nicht offensichtlich verändert. Sie war noch immer stark inhomogen. Nur die Morphologie der Zellkerne ließ Unterschiede erkennen. Sie waren nun ovoid bis spindelförmig, was eine Annäherung an die Gestalt der Zellen im nativen VKB darstellte. Die Zellkerne der nicht-sterilisierten, allogenen Transplantate hatten eine identische Morphologie. Anders als im PES-sterilisierten Trans-

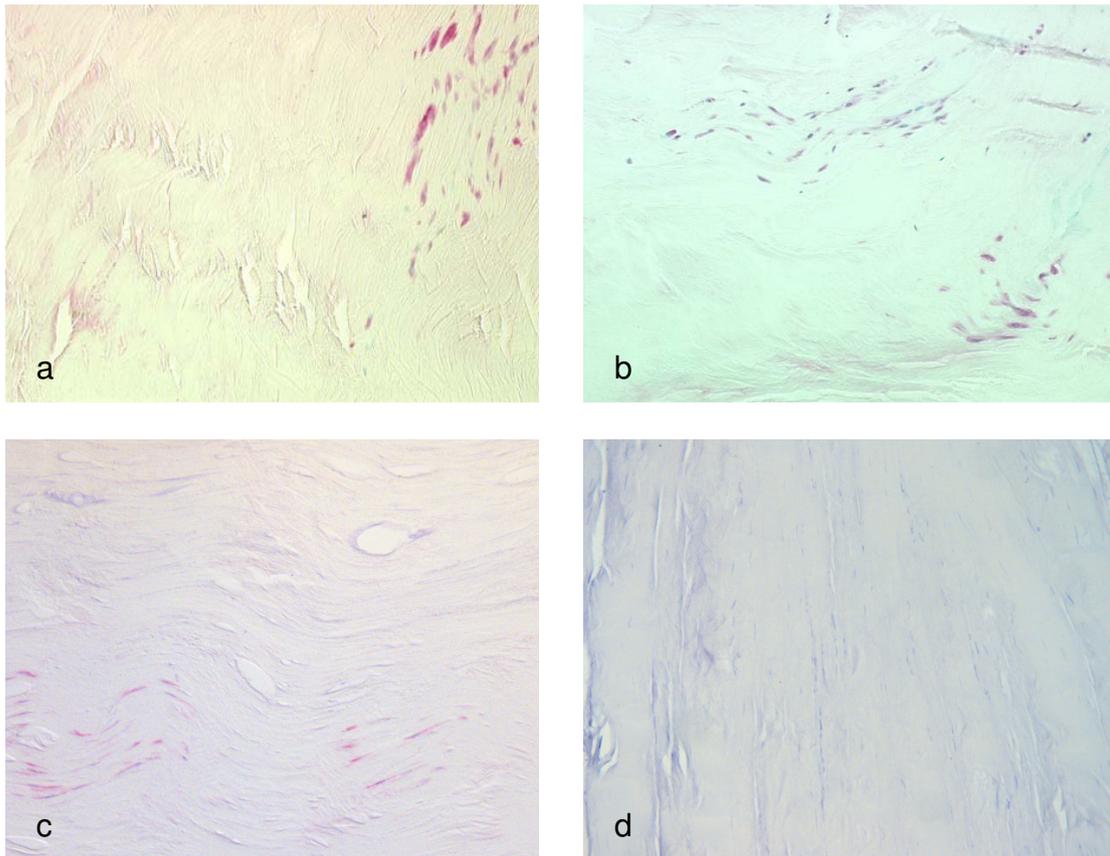


Abb. 3.6: Myofibroblasten nach 6 Wochen in Autograft (a), nicht-sterilisiertem Allograft (b) und PES-sterilisiertem Allograft (c+d),  $\alpha$ -sma Färbung, 20x (d 10x): Bei allen drei Gruppen sind fingerförmig einwachsende Myofibroblasten zu erkennen, allerdings zeigten sich im PES-sterilisierten Allograft zumeist sehr große Bereiche, in denen gar keine Myofibroblasten zu finden waren (d). (a + b aus [41])

plantat war aber eine homogenere Verteilung der Myofibroblasten zu erkennen. Es waren wesentlich weniger myofibroblastenarme Bereiche im Zentrum der Schnitte zu erkennen gewesen. Vor allem in der quantitativen Auswertung konnte eine deutliche Entwicklung von 6 auf 12 Wochen festgestellt werden, die Zahl der Myofibroblasten war signifikant ( $p < 0,05$ ) angestiegen.

Die PES-sterilisierten Transplantate unterschieden sich nach 6 und 12 Wochen hingegen nicht oder höchstens minimal voneinander. Auch nach 12 Wochen waren große Bereiche der Transplantate völlig avital und enthielten nur vereinzelt Myofibroblasten. Es war keine eindeutige Entwicklung zu erkennen, so dass auch anhand der Myofibroblasten ein verzögerter Einheilungsprozess festgestellt wurde.

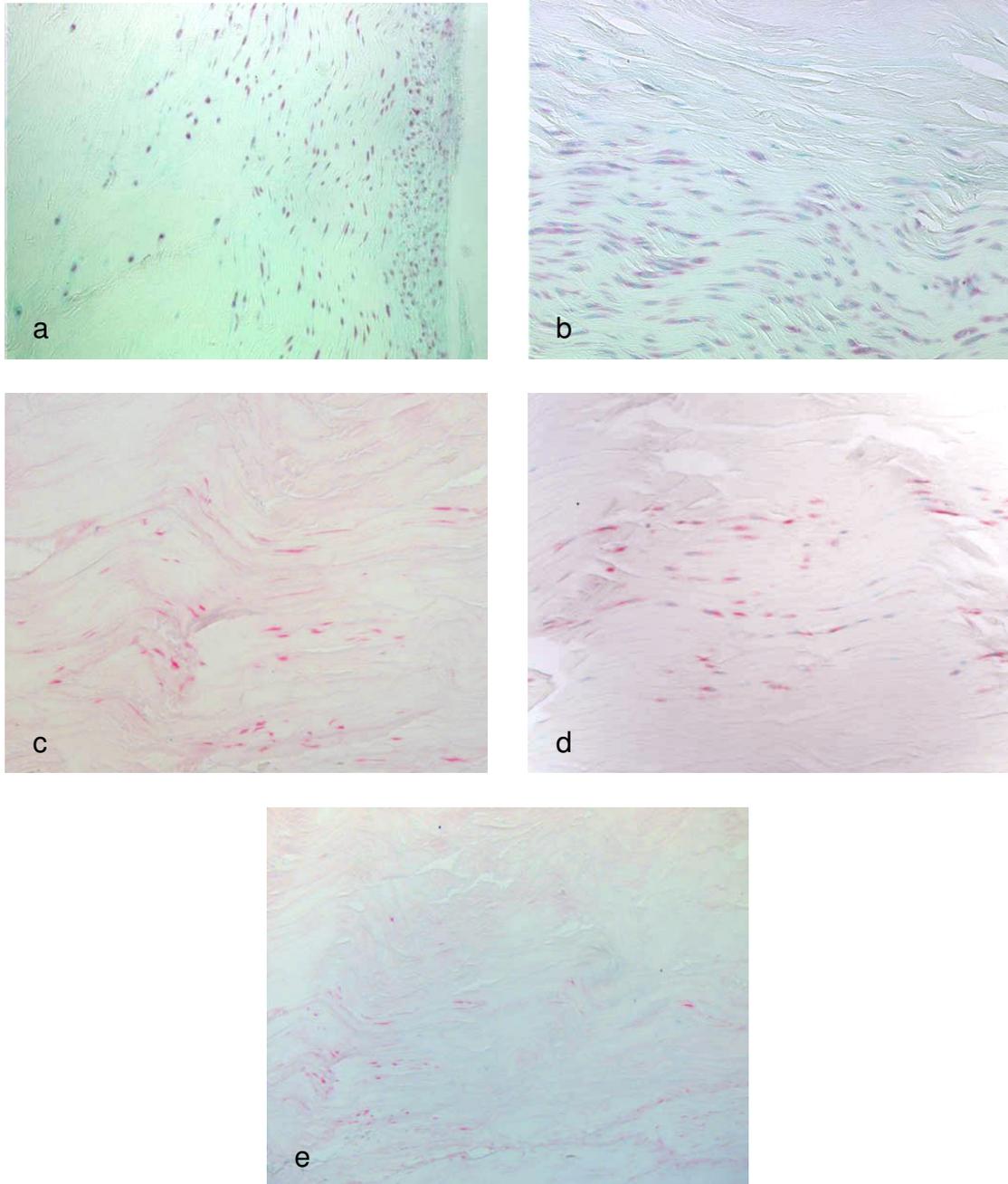


Abb. 3.7: Myofibroblasten nach 12 Wochen in Autograft (a) 10x, nicht-sterilisiertem Allograft (b) 20x und PES-sterilisiertem Allograft (c + d) 20x, (e) 10x,  $\alpha$ -sma Färbung: Nach 12 Wochen sind in den PES-sterilisierten Transplantaten vermehrt fingerförmig einwachsende Myofibroblasten zu erkennen (c + d). Im Vergleich zu den autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten sind insgesamt aber deutlich weniger Myofibroblasten zu sehen, große Bereiche sind noch immer myofibroblastenfrei (e). (a + b aus [41])

Die stark inhomogene Myofibroblastenverteilung bei den PES-sterilisierten Transplantaten nach 6 und auch 12 Wochen war der Grund, weshalb wir diesen Parameter nicht quantitativ auswerteten. Die Auswahl von 10 Gesichtsfeldern zur Zellzählung hätte zu einer Verfälschung der Werte führen können, außerdem wäre das reale Bild der ungleichen Verteilung der Myofibroblasten nicht entsprechend wiedergegeben worden. Gemeinsam mit weiteren Mitarbeitern des Institutes und Doktoranden unserer Vorläuferstudie, die eine quantitative Analyse vorgenommen hatten, entschieden wir, dass eine rein deskriptive Analyse besser geeignet sei, den Sachverhalt darzustellen.

### 3.3 Kollagencrimp

#### Zeitpunkt 0

##### *Deskriptiv*

Die Anordnung des Kollagens im Gewebe des nativen Kreuzbandes, der nativen Flexorsehne und der PES-sterilisierten Flexorsehne war streng longitudinal. Dabei wurden die Kollagenfaserbündel im gesamten Präparat von bindegewebigen Septen durchzogen, welche parallel zueinander verliefen. Insgesamt schienen sich etwas mehr Septen in den Schnitten des VKBs zu befinden, die Gliederung wirkte dadurch ausgeprägter. Die gleiche regelmäßig longitudinale Orientierung zeigte somit auch der Kollagen-Crimp, dessen Struktur im VKB etwas markanter erschien. Der Crimp der PES-sterilisierten Flexorsehne unterschied sich kaum von dem der nativen Flexorsehne. Einzige Auffälligkeit war eine stärkere Auffächerung zwischen den Kollagenfaserbündeln bei den PES-sterilisierten Sehnen, wobei es sich aber höchstwahrscheinlich um Schnittartefakte handelte. Sie waren deutlich härter und somit schwerer zu schneiden gewesen, als die nativen Sehnen.

##### *Quantitativ*

Im intakten VKB stellte sich die Wellenlänge mit  $46,3 \mu\text{m}$  (Min:  $27,1 \mu\text{m}$ , Max:  $135,2 \mu\text{m}$ ) signifikant kürzer ( $p=0,005$ ) als in der nativen ( $138,0 \mu\text{m}$ , Min:  $88,3 \mu\text{m}$ , Max:  $268,8 \mu\text{m}$ ) und PES-sterilisierten Flexorsehne ( $142,4 \mu\text{m}$ , Min:  $127,8 \mu\text{m}$ , Max:  $147,3 \mu\text{m}$ ) dar ( $p=0,001$ ). Die Wellenlänge dieser beiden war annähernd identisch.

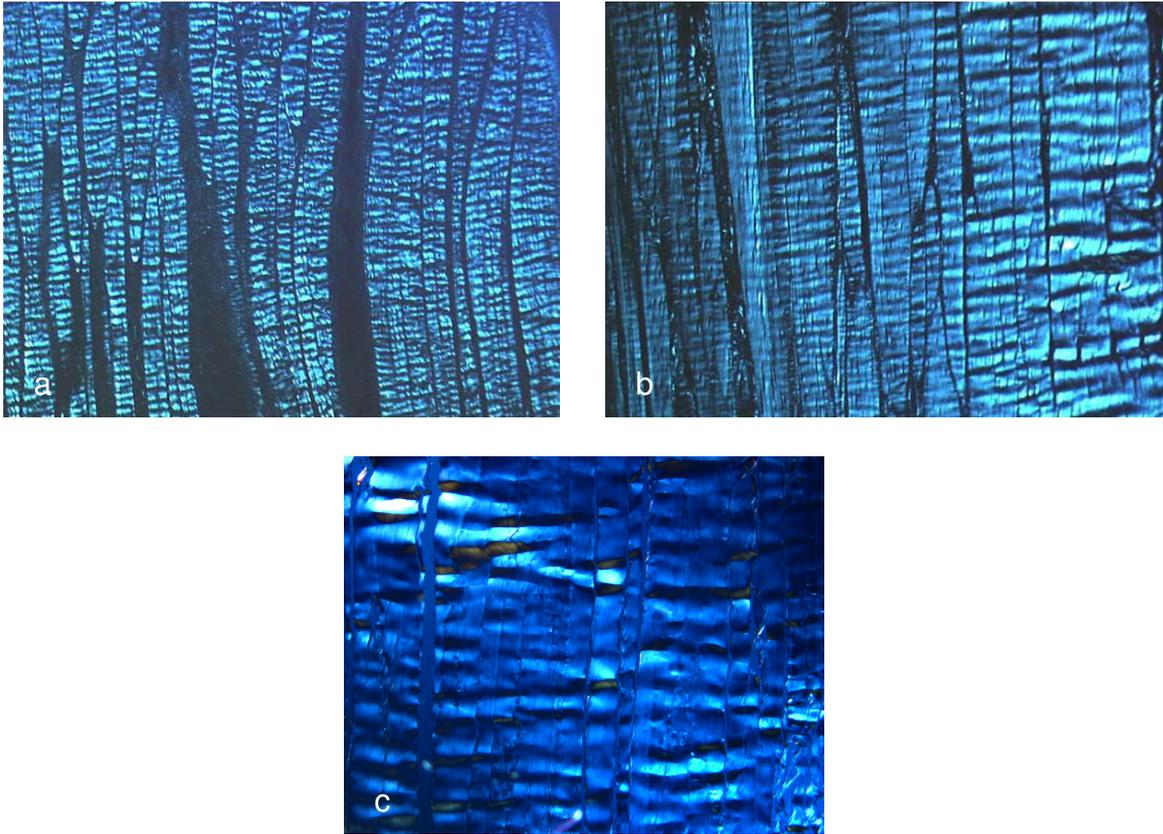


Abb. 3.8: Polarisationsmikroskopisches Bild des Kollagenkrimps zum Zeitpunkt 0, 5x: natives VKB (a), native Flexorsehne (b) und PES-sterilisierte Flexorsehne (c) zeigen die gleiche geordnete Struktur des Crimps (a+b aus [41])

## 6 Wochen

### *Deskriptiv*

Nach einer Standzeit von 6 Wochen fiel in den PES-sterilisierten Transplantaten eine etwas inhomogenere Kollagenanordnung als in den nativen Flexorsehnen auf. Die Ausrichtung der Kollagenfasern war nun nicht mehr streng longitudinal, einzelne Fasern wichen davon ab. Auch die Septierung war weniger regelmäßig. Die Crimpstruktur war ungeordneter als im nativen Gewebe, es zeigten sich aber auch große Bereiche mit homogener Crimpstruktur. Diese Bereiche stellten sich in den histologischen und immunhistologischen Färbungen stark avital dar, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um den ursprünglichen Crimp des Transplantates handelte. Trotz der Azellularität war die Tertiärstruktur des straffen kollagenen Bindegewebes gut erhalten und nur in geringem Maße von neu gebildetem Crimp ersetzt worden. Im Vergleich zu den autologen Transplantaten stellten sich die PES-sterilisierten Allografts insgesamt etwas inhomogener dar, verglichen mit den nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten war aufgrund des geringen Anteils an

neu gebildetem Crimp ein homogeneres Bild zu sehen. Trotzdem schwankte die Crimpfrequenz innerhalb der einzelnen Schnitte teilweise stark.

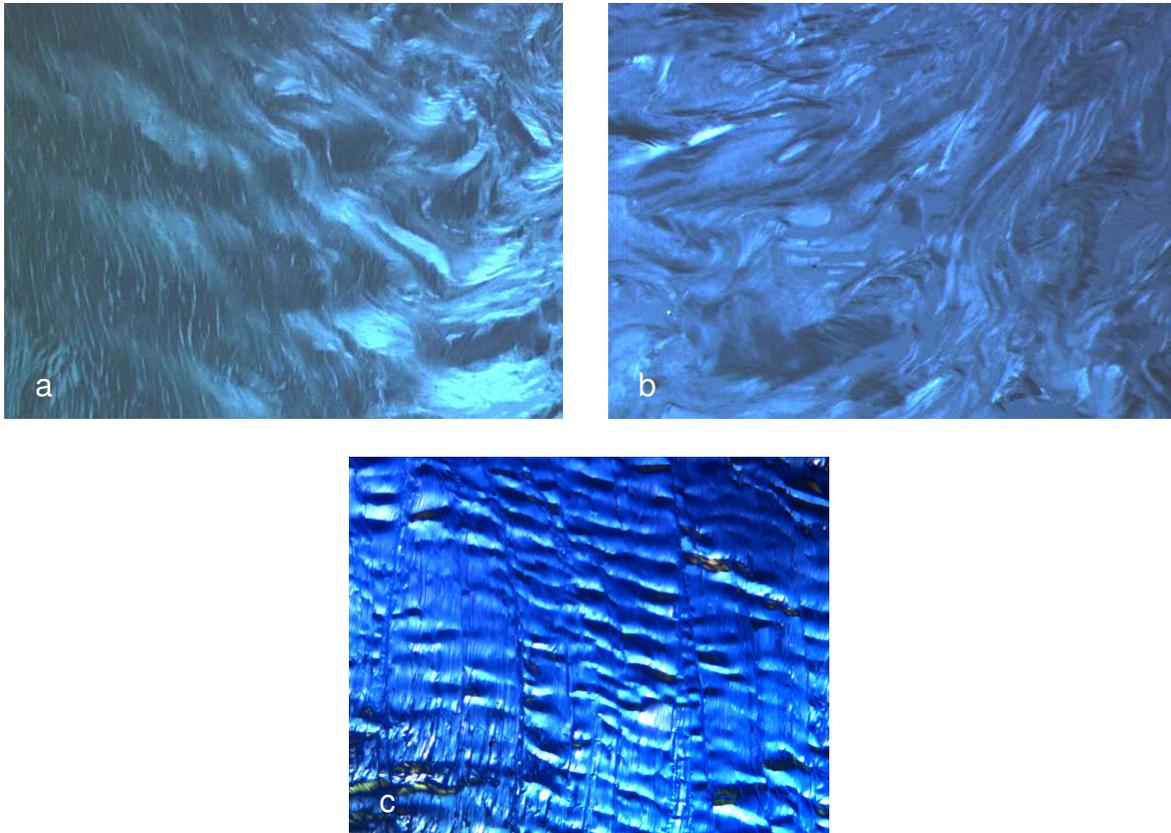


Abb. 3.9: Kollagencrimp nach 6 Wochen, 20x (a+b) bzw. 5x (c): Autograft (a) und nicht-sterilisiertes Allograft (b) zeigen eine stark ungeordnete Struktur. Die Crimpstruktur des PES-sterilisierten Allografts (c) wirkt dagegen sehr gleichmäßig. Vermutlich handelt es sich dabei um den erhaltenen Crimp des Transplantates, Umbauprozesse scheinen kaum stattgefunden zu haben (a+b aus [41]).

### *Quantitativ*

Hinsichtlich der Wellenlänge ergab sich nach 6 Wochen kein signifikanter Unterschied ( $p=0,798$ ) zwischen Autograft ( $148,7 \mu\text{m}$ , Min:  $135,1 \mu\text{m}$ , Max:  $407,5 \mu\text{m}$ ) und nicht-sterilisiertem Allograft ( $188,7 \mu\text{m}$ , Min:  $78,8 \mu\text{m}$ , Max:  $243,8 \mu\text{m}$ ). Die Wellenlänge im PES-sterilisierten Transplantat betrug  $279,8 \mu\text{m}$  (Min:  $197,5 \mu\text{m}$ , Max:  $506,3 \mu\text{m}$ ) und war von 0 nach 6 Wochen signifikant angestiegen ( $p = 0,000$ ). Zu diesem Zeitpunkt war sie signifikant höher als bei nicht-sterilisiertem, allogenen und bei autologem Gewebe (PES vs. ALLO  $p = 0,006$ , PES vs. AUTO  $p = 0,036$ ).

## 12 Wochen

### *Deskriptiv*

In der 12-Wochen-Gruppe der PES-sterilisierten Transplantate fielen kaum Unterschiede zu den 6-Wochen-Präparaten auf. Verglichen mit den nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten wirkten sie noch immer homogener. In den zellreichen Gebieten war nun aber auch eine Veränderung der Crimpstruktur zu sehen. Der Crimp zeigte sich inhomogener und vereinzelt waren von peripher fortschreitende Strukturänderungen, wie bei autologen und allogenen Transplantaten schon nach 6 Wochen, festzustellen. Dabei handelte es sich um neu gebildete Crimpformationen, die im Rahmen des Remodelings von freien Sehnen-Transplantaten typischerweise zu sehen sind.

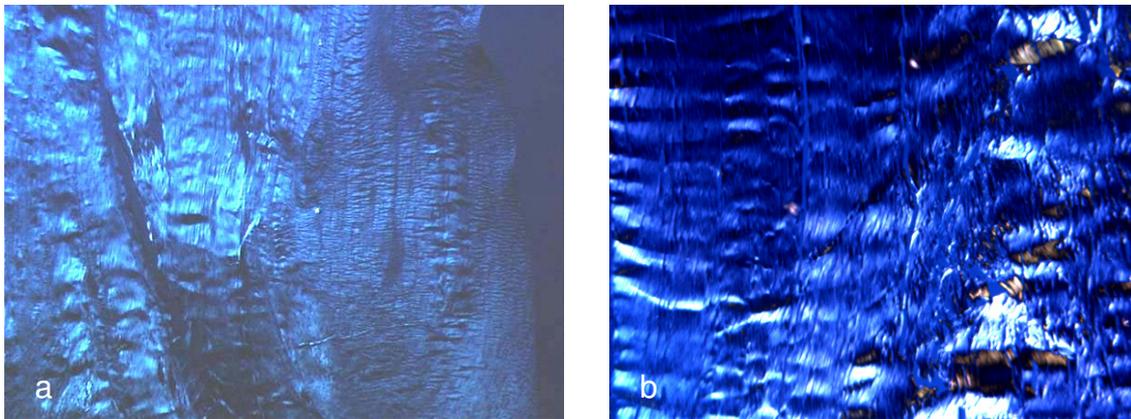


Abb. 3.10: Kollagencrimp nach 12 Wochen, 5x: nicht-sterilisiertes Allograft (a) und PES-sterilisiertes Allograft (b). Das PES-sterilisierte Transplantat zeigt im Vergleich zu 6 Wochen eine etwas ungeordnetere Struktur, neben Arealen mit gut erhaltenem Crimp des ursprünglichen Transplantates. Es scheint eine langsame Entwicklung stattzufinden. Im nicht-sterilisierten Allograft hat die Neubildung des Crimps zu einer stärkeren Ordnung als nach 6 Wochen geführt (a aus [41]).

### *Quantitativ*

Zu diesem Zeitpunkt war die Wellenlänge im autologen Gewebe mit  $175,0 \mu\text{m}$  (Min:  $18,5 \mu\text{m}$ , Max:  $348,7 \mu\text{m}$ ) signifikant höher ( $p = 0,023$ ) als im nicht-sterilisierten, allogenen ( $119,9 \mu\text{m}$ , Min:  $81,9 \mu\text{m}$ , Max:  $155,2 \mu\text{m}$ ). Die Wellenlänge in den PES-sterilisierten Transplantaten war von 6 nach 12 Wochen auf  $340,4 \mu\text{m}$  (Min:  $277,3 \mu\text{m}$ , Max:  $470,8 \mu\text{m}$ ) noch leicht angestiegen und war wiederum signifikant höher als im nicht-sterilisierten, allogenen und im autologen Transplantat (PES vs. ALLO  $p = 0,000$ , PES vs. AUTO  $p = 0,003$ ). Die Crimpfrequenz variierte hier innerhalb

der Schnitte nicht mehr so stark, wie es noch nach 6 Wochen der Fall gewesen ist.

In der Vergleichsgruppe war deutlich geworden, dass sich die Wellenlänge des Crimp in autologen und in nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten im Laufe der Zeit der Länge des VKBs langsam annäherte, nachdem sie initial deutlich gestiegen war. Bei dem PES-sterilisierten Gewebe war diese Entwicklung in der frühen Phase des Remodeling noch nicht zu erkennen. Die Wellenlänge nahm von 6 zu 12 Wochen sogar noch zu, wenn auch nicht signifikant ( $p = 0,258$ ).

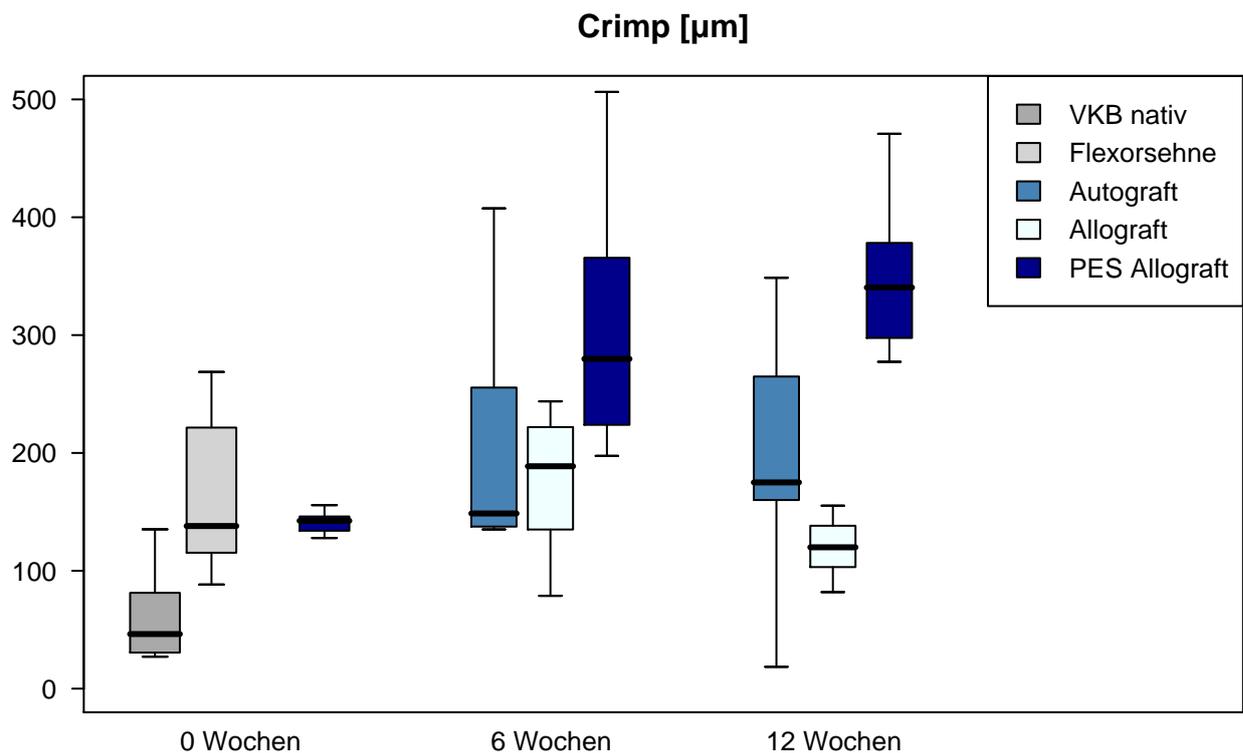


Abb. 3.11: Die Crimplänge zeigte bei Autograft, nicht-sterilisiertem Allograft und PES-sterilisiertem Allograft keine signifikante Entwicklung von 6 zu 12 Wochen. Auffällig ist aber, dass die Wellenlänge der PES-sterilisierten Allografts von 0 auf 6 Wochen signifikant ansteigt und sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen signifikant höher ist, als die der beiden anderen Transplantate

## 3.4 Kollagentypisierung

Zur Auswertung der Kollagenverteilung war eine semiquantitative Analyse vorgesehen. Diese konnte leider nicht durchgeführt werden, da die Etablierung der Standards für Kollagen I und III nicht gelang. Die Auswertung erfolgte deshalb nicht-quantitativ. Die gesuchten Markerbanden wurden anhand der bekannten relativen Laufweite der Markerpeptide für Kollagen I (24+25 kDa) und III (7 kDa) identifiziert. Der auf jedem einzelnen Gel mitgeführte Multicolormarker diente der Skalierung in kDa, so dass die angefärbten Banden unterschiedlicher Molekulargewichte klar zugeordnet werden konnten. Durch die Messung der optischen Dichte war eine Beurteilung der mengenmäßigen Veränderung der Kollagentypen von 0 auf 6 Wochen und von 6 auf 12 Wochen möglich.

### Kollagen I

Zum Zeitpunkt Null betrug die optische Dichte (OD) der Bande des Markerpeptids 0,110 (Min: 0,10, Max: 0,12). Nach 6 Wochen wurde eine OD von 0,070 (Min: 0,03, Max: 0,98) ermittelt, was keine signifikante Veränderung darstellte ( $p=0,909$ ). Gleiches zeigte sich auch nach 12 Wochen. Die OD betrug hier 0,123 (Min: 0,01, Max: 1,65) und war somit minimal angestiegen, hatte sich aber nicht signifikant verändert ( $p=0,931$ ). Der Vergleich der OD nach 0 und 12 Wochen ergab ebenfalls keine signifikante Veränderung ( $p=0,906$ ).

### Kollagen III

Ein im Prinzip identisches Bild ergaben die Messungen der OD für Kollagen III. Sie lag zum Zeitpunkt Null bei 0,079 (Min: 0,07, Max: 0,09), nach 6 Wochen betrug sie 0,089 (Min: 0,02, Max: 0,27) und nach 12 Wochen 0,053 (Min: 0,01, Max: 0,47). Auch hier war also keine signifikante Veränderung von 0 auf 6 Wochen ( $p=0,909$ ), von 6 auf 12 Wochen ( $p=0,931$ ) und von 0 auf 12 Wochen ( $p=0,582$ ) festzustellen.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass sich sowohl der Gehalt an Kollagen I als auch der Gehalt an Kollagen III im Laufe der 12 Wochen nicht signifikant veränderte. Eine direkte Vergleichsgruppe existierte leider nicht. Die Kollagenanalyse autologer und nicht-sterilisierter, allogener Transplantate hätte im Rahmen der Vorläuferstudie durchgeführt werden sollen, konnte aber bisher nicht fertiggestellt werden.

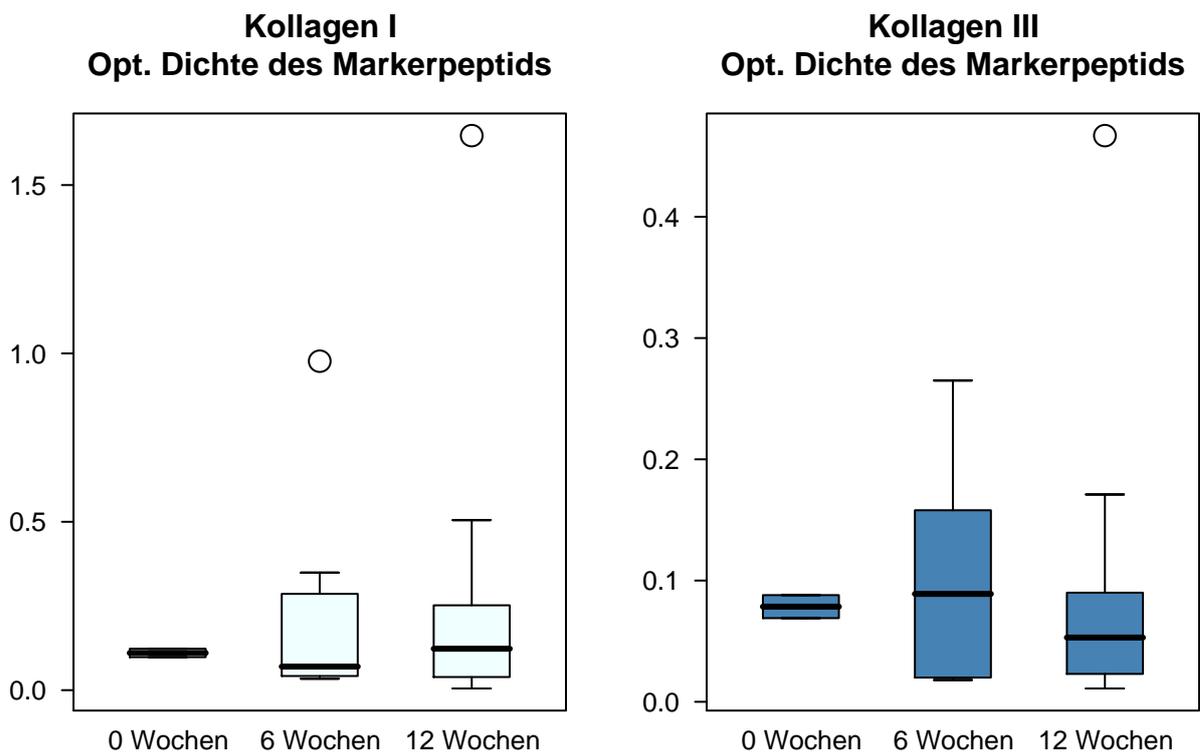


Abb. 3.12: Sowohl bei Kollagen I als auch Kollagen III wurden keine signifikanten Veränderungen der OD von 0 auf 6, von 6 auf 12 und von 0 auf 12 Wochen festgestellt. Dargestellt ist die optische Dichte der Markerpeptide von Kollagen I und III, welche mit der Gesamtmenge des jeweiligen Kollagentyps korreliert. Eine quantitative Auswertung der Kollagentypen war nicht möglich.

## 4 Diskussion

Während in der Vergangenheit nur eine geringe Anzahl von Allografts zur primären VKB-Rekonstruktion eingesetzt wurde, ist die Nachfrage in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Gerade bei Sportlern, jungen Menschen und bei komplexen Knieverletzungen sind Allografts aufgrund der fehlenden Entnahmemorbidity hervorragende Alternativen. Allerdings besteht nach wie vor das Problem, dass bisher kein ideales Sterilisationsverfahren für die Spendertransplantate existiert. Durch die Sterilisation sollen Bakterien, Viren und Pilze abgetötet werden, so dass eine eventuelle Krankheitsübertragung (z.B. HIV, Hepatitis B, Hepatitis C) von Spender zu Empfänger ausgeschlossen werden kann. Alle bisher getesteten Verfahren wiesen jedoch wesentliche Nachteile auf, wie z.B. eine geminderte mechanische Belastbarkeit, oder eine karzinogene oder mutagene Wirkung. Dies führt zu einer limitierten Anwendung von Allografts.

Das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren ist zur Sterilisation von Knochengewebe schon seit längerem im Einsatz. Bei Sehngewebe ist in-vitro kein nachteiliger Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften beobachtet worden. In-vivo Studien, die auch eine Auswirkung auf den Einheilungsprozess zeigen könnten, existierten jedoch nicht. Doch gerade nach primärem Ersatz, der eine frühe, aktive Rehabilitationsphase nach sich zieht, ist es wichtig, ausreichende Kenntnisse über das frühe Remodelingverhalten der Transplantate zu besitzen, um ein vorzeitiges Versagen zu vermeiden und eine langfristige Gelenkstabilität gewährleisten zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Remodeling PES-sterilisierter Allografts anhand der Gesamtzellzahl, der Myofibroblastendichte, der Crimplänge und des Gehaltes an Kollagen I und III zu untersuchen. Diese Daten sollten auch im Zusammenhang mit den Daten weiterer Untersuchungen unserer Studiengruppe zur Revaskularisierung, Biomechanik und Knocheneinheilung der Transplantate betrachtet werden. Außerdem wurden die Ergebnisse einer zuvor in der Charité durchgeführten Studie, die das Remodelingverhalten von autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten untersucht hatte, zum Vergleich mit herangezogen. Die Ergebnisse sollten zeigen, ob das Sterilisationsverfahren mit PES für freie allogene Sehnen-transplantate in der primären Kreuzbandchirurgie für die klinische Anwendung empfohlen werden kann.

## 4.1 Sterilisationsverfahren

Die vorliegende Studie ist die erste, die den Einfluss des Sterilisationsverfahrens mit Peressigsäure auf das Remodeling freier allogener Sehnentransplantate in-vivo untersucht hat. Bisher liegen also keine wirklich vergleichbaren Ergebnisse vor. Zur Sterilisation von Knochengewebe wird das Verfahren jedoch schon seit den frühen 80er Jahren genutzt. Bei allogenen Knochentransplantaten konnte kein negativer Effekt der PES auf strukturelle und biomechanische Eigenschaften festgestellt werden. Pruss et al. [116] untersuchten dies in-vitro. Auch in der Klinik sind keine gegenteiligen Erfahrungen gemacht worden. Seit den 80er Jahren ist das Verfahren außerdem zur Sterilisation von Patellar- und Achillessehnen zugelassen, obwohl weder in-vitro noch in-vivo Studien existierten. Im Jahre 2005 verwendeten Scheffler et al. [129] das Verfahren erstmals zur Sterilisation von Sehngewebe. In dieser in-vitro Studie zeigte sich kein negativer Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der untersuchten BPTB-Transplantate.

Im Laufe der Durchführung der hier vorliegenden Studie wurden schon PES-sterilisierte Allografts zum primären VKB-Ersatz in der Klinik eingesetzt. Ersten mündlichen Berichten der Orthopädischen Klinik Markgröningen und des Klinikums Köln-Merheim zufolge trat hier eine erhebliche Inzidenz von Versagern auf. Diese Beobachtungen könnten durch die Ergebnisse unserer Studie erklärt werden. Im Vergleich zu den Auto- und nicht-sterilisierten Allografts unserer Vorläuferstudie stellten wir eine deutliche Verzögerung des frühen Remodelings fest. Die verminderten strukturellen und biomechanischen Eigenschaften der Transplantate führten offensichtlich zum Versagen.

Es liegt also der Verdacht nahe, dass die PES das Gewebe in nachteiliger Weise beeinflusst. Die Untersuchungen anderer, auch allogener, transplantiertes Gewebe hatten allerdings keinen derartigen Effekt gezeigt. Die Einheilung von Knochengewebe verläuft wie bereits erwähnt völlig unauffällig. Wie in Abschn. 1.5.2 beschrieben, werden PES-sterilisierte Transplantate von der Gewebekbank auf Rückstände der eingesetzten Substanzen untersucht, bevor sie freigegeben werden. Durch den sogenannten Reflectoquant-Peressigsäure-Test wird gesichert, dass weniger als 1 ppm PES im Transplantat verbleibt. Der rasche Zerfall in Essigsäure und Wasserstoffperoxid soll dafür verantwortlich sein. Eventuell wäre es aber möglich, dass eine minimale Restmenge der PES im Transplantat zurückbleibt und das Remodeling nachteilig beeinflusst. Bei so niedrigen Restkonzentrationen von unter 1 ppm erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich. Desweiteren wäre es denkbar, dass die Abtötung aller lebenden Zellen die Ursache für die Verzögerung des Einheilungsprozesses darstellt. Während im Knochengewebe offensichtlich keine im Transplantat ver-

bliebenen Zellen für die Einheilung nötig sind, könnte dies im Weichteiltransplantat anders sein. Auch das spezielle Milieu aufgrund der intraartikulären Lage könnte hier von Bedeutung sein. Allerdings zeigte beispielsweise die Studie von Jackson et al. [72], dass das Remodeling auch bei azellulären Transplantaten unverzögert abläuft. Somit scheint auch diese Möglichkeit nicht sehr wahrscheinlich zu sein.

Es bleibt die Vermutung, dass der Sterilisationsprozess mit PES zu ultrastrukturellen Veränderungen des Transplantates führt. Diese könnten entweder eine sofortige Schwächung des Gewebes zur Folge haben, was allerdings nicht zu den Ergebnissen der erwähnten in-vitro Studie von Scheffler et al. passen würde. Oder sie stellen eine Art Barriere für die Rezellularisierung und Revaskularisierung des Transplantates dar, wodurch es zur Verzögerung des Remodelingprozesses kommen könnte.

## 4.2 Sterilisiertes Sehnen transplantat – Zeitpunkt Null

Bei der histologischen Untersuchung der sterilisierten Flexorsehnen zum Zeitpunkt Null fielen zunächst keine Unterschiede zu nativen Flexorsehnen auf. Spindelförmige Fibrozyten waren gleichmäßig über die gesamte Sehne verteilt zu sehen. Die Gesamtzellzahl war annähernd gleich (Median native Flexorsehne:  $268,4 / \text{mm}^2$ , Median PES-sterilisierte Flexorsehne:  $247,5 / \text{mm}^2$ ). Da die Sterilisation mit PES dazu führen soll, dass keinerlei Bakterien, Viren und Pilze im Transplantat verbleiben, ist davon auszugehen, dass auch alle ortsständigen Zellen (Fibroblasten, Perizyten, usw.) abgetötet werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei den Zellen im PES-sterilisierten Transplantat also um avitale Zellen. Die Betrachtung einfacher histologischer Färbungen lässt allerdings keine Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen zu.

Auch bei der Betrachtung des Crimps fielen keine Unterschiede zur nativen Flexorsehne auf. Im PES-sterilisierten Transplantat war der Crimp ebenfalls geordnet, verlief streng longitudinal und zeigte eine niedrige Wellenlänge (Median native Flexorsehne:  $138,0 \mu\text{m}$ , Median PES-sterilisierte Flexorsehne  $142,4 \mu\text{m}$ ).

Bei der immunhistologischen Färbung zeigte sich jedoch, dass die sterilisierten Sehnen bis auf wenige Ausnahmen keine Myofibroblasten enthielten. Glatte Muskelzellen, die als Positiv-Kontrolle der Färbung herangezogen wurden, waren dagegen deutlich angefärbt worden. Ein Versagen der Färbemethode konnte somit ausgeschlossen werden. In nativen Sehnen ist das Vorkommen von

Myofibroblasten allerdings mehrfach nachgewiesen worden. In unsere Vorläuferstudie fand Dustmann [41] bei seinen Untersuchungen eine Myofibroblastenzahl von  $101,4/\text{mm}^2$  in der Flexorsehne des Schafes. Faryniarz et al. [46] wiesen 1996 Myofibroblasten im medialen Kollateralband des Kaninchens nach, Murray und Spector gelang dies 1999 auch im nativen und rupturierten humanen VKB [99]. Unsere Ergebnisse zeigten, dass sich zum Zeitpunkt Null gar keine Myofibroblasten in den PES-sterilisierten Transplantaten befanden. Sie müssen durch die Sterilisation so verändert worden sein, dass der zur Anfärbung verwendete Antikörper gegen  $\alpha$ -sma nicht mehr spezifisch binden konnte. Da die Sterilisation eingesetzt wird, um Viren, Bakterien und Pilze abzutöten, ist davon auszugehen, dass auch alle weiteren Zellen, wie die Myofibroblasten, im Transplantat zerstört wurden.

### 4.3 Remodeling

Der Prozess des Remodelings von Sehnen-Transplantaten nach VKB-Ersatz wurde schon 1986 von Amiel et al. [8] beschrieben. Am Kaninchenmodell zeigten sie, dass das Transplantat histologisch und biochemisch zunehmend die Gestalt des VKBs annahm. Als Grund für diese Umwandlung vermuteten sie eine Adaptation an die neue Umgebung, also an das synoviale Milieu und die veränderte Belastungssituation. 1993 untersuchten Bosch und Kasperczyk [22] das Remodelingverhalten am Schafsmodell. Sie verwendeten Patellarsehnen als Transplantate, ersetzten aber das hintere Kreuzband. Dabei stellten sie einen charakteristischen Verlauf fest und teilten den Umbauprozess entsprechend der Phasen der Wundheilung in drei Stadien ein: bis zu 2 Wochen dauert die initiale Phase der partiellen ischämischen Nekrose und Degeneration, daran schließt sich die Revitalisierungsphase an (bis 16 Wochen) und als dritte Phase folgt die eigentliche Remodelingphase (bis 6 Monate). Inzwischen ist dieser Umbauprozess anhand einer Vielzahl von Studien nachgewiesen worden. Dabei fiel allerdings auf, dass der Ablauf des Remodelings nicht immer identisch ist. Unterschiedliche Transplantate, Verankerungstechniken, Sterilisationsverfahren und Studienmodelle nehmen Einfluss auf Dauer, Geschwindigkeit und Langzeitergebnisse.

In unserer Studie wurden die Ergebnisse einer Vorläuferstudie, die autologe Transplantate mit nicht-sterilisierten Spendersehnen verglichen hatte, als Kontrollgruppe herangezogen. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wählten wir deshalb sowohl ein identisches Tiermodell, als auch identische Methoden der Aufarbeitung, Untersuchung und Auswertung. Somit kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass, abgesehen von dem Unterschied der

PES-Sterilisation, weitere Faktoren die Ergebnisse beeinflusst haben.

Die Resultate der Vorläuferstudie zeigten, dass der bekannte Remodelingprozess sowohl im autologen, als auch im nicht-sterilisierten, allogenen Transplantat ablief. Dustmann [41] stellte fest, dass der Umbau zunächst mit einer unregelmäßigen Zell- und Kollagenanordnung einherging. Während sich die Peripherie extrem hyperzellulär darstellte, waren in zentralen Bereichen hypo- bis azelluläre Areale vorherrschend. Dabei wanderten die Zellen fingerförmig entlang der Gefäße in das Gewebe ein, nach einem Jahr war das Transplantat wieder vollständig besiedelt. Gleichzeitig war eine stetige Zunahme der longitudinalen Orientierung der Extrazellulärmatrix zu erkennen gewesen. Auch die Gefäßdichte stieg im Verlauf an, die Gefäße verliefen wieder vermehrt longitudinal in bindegewebigen Septen. Weiler et al. [164] hatten diese Dynamik 2002 in ihrer Studie zum Remodelingprozess von autologen VKB-Transplantaten bei identischem Versuchsmodell feststellen können. Zur Beschreibung der Vorgänge hatten sie ebenfalls Zellzahl, Myofibroblasten, Crimp und Vaskularisierung untersucht.

Dustmann stellte fest, dass die Zellzahl und die Crimpfrequenz beider Transplantat-Gruppen 6 Wochen nach dem Ersatz des VKBs noch deutlich denen der nativen Flexorsehne glichen. Von 6 auf 12 Wochen stieg die Zellzahl von Auto- und nicht-sterilisiertem Allograft dann deutlich an und zumindest beim Autograft zeigte sich tendenziell auch eine Verkürzung des Crimps, was eine Annäherung an die Gestalt des nativen VKBs bedeutete. Die Angleichung an das Erscheinungsbild war bezüglich der Zellzahl bereits nach 12 Wochen abgeschlossen. Nach 52 Wochen waren dann auch bei der Myofibroblastenzahl und der Crimpfrequenz in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr zum nativen VKB festzustellen. Lediglich in der deskriptiven Auswertung ließen sich noch Unterschiede in Form eines inhomogenen Bildes der Crimpstruktur erkennen. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Remodeling auch nach 52 Wochen noch nicht vollständig abgeschlossen war.

Es stellte sich allerdings ebenfalls heraus, dass es deutliche Unterschiede zwischen autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten gab. In der 6-Wochen-Gruppe wiesen die nicht-sterilisierten, allogenen Transplantate eine signifikant geringere Gesamtzellzahl auf, gleichzeitig war die Myofibroblastendichte nur tendenziell niedriger. Nach 12 Wochen glichen sich die Transplantate bezüglich der Gesamtzellzahl einander an, die Myofibroblastenzahl und die Crimplänge der nicht-sterilisierten Allografts waren jedoch signifikant höher als die der Autografts. Nach 6 Wochen konnte neben der verzögerten Wiederbesiedlung mit Zellen auch eine verzögerte Revas-

kularisierung festgestellt werden. Die stärksten Abweichungen zeigten sich jedoch bei der deskriptiven Auswertung. Im autologen Gewebe war nach 12 Wochen bereits eine regelmäßige Zell- und Gefäßverteilung und Kollagenstruktur sowie eine deutlichere longitudinale Orientierung zu erkennen. Das nicht-sterilisierte, allogene Gewebe wirkte dagegen noch recht ungeordnet und inhomogen. Erst nach 52 Wochen glichen sich die beiden untersuchten Gruppen einander an. Dustmann et al. fanden also heraus, dass der Remodelingprozess im nicht-sterilisierten Allograft langsamer ablief als im Autograft.

Ähnliche Ergebnisse brachten eine Vielzahl von Tierstudien [29, 41, 60, 74, 81, 101]. Während diese eine Unterlegenheit der Allografts gegenüber Autografts zeigten, ergaben die klinischen Studien widersprüchliche Ergebnisse. [10, 113, 136]

Der Vergleich mit den Ergebnissen unserer PES-sterilisierten Transplantate zeigte nun, dass der Umbauprozess im sterilisierten Gewebe nicht nur deutlich langsamer als im autologen, sondern auch langsamer als im nicht-sterilisierten, allogenen ablief. Sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen war im PES-sterilisierten Allograft eine wesentlich niedrigere Gesamtzellzahl als in beiden anderen Gruppen zu beobachten. Die Crimplänge unterschied sich ebenfalls zu beiden Zeitpunkten auffällig von der autologen und nicht-sterilisierten Transplantate. Sie war jeweils signifikant höher als in den beiden Gruppen, außerdem auch höher als im nativen VKB und in der nativen Flexorsehne (s. Abb. 3.11). Die deskriptive Analyse bestätigte die statistischen Ergebnisse und zeigte die Unterschiede vielleicht sogar am deutlichsten. Nach 6 Wochen waren die PES-sterilisierten Transplantate zumeist stark azellulär und der Crimp war von inhomogener Struktur. Ein ähnliches Bild war bei den nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten zu sehen gewesen, die Schnitte wirkten insgesamt aber schon vitaler. 6 Wochen später stellte sich bei den PES-sterilisierten Allografts kein Unterschied zu der 6-Wochen-Gruppe dar. Die Schnitte sahen zu beiden Zeitpunkten identisch aus und ließen den Eindruck entstehen, dass keinerlei Entwicklung stattgefunden hatte. Bei den nicht-sterilisierten, allogenen und natürlich bei den autologen waren deutliche Veränderungen zu erkennen gewesen. Die Zellularität hatte zugenommen, der Crimp war von geordneterer Struktur und es waren vermehrt einwachsende Myofibroblasten festzustellen.

Ob die Entwicklung der PES-sterilisierten Transplantate nach einem längeren Zeitraum auch ein Angleichen an das histologische Erscheinungsbild des nativen VKBs ergeben hätte, ist durch unsere Studie nicht zu klären. Unser Ziel war, die wichtigen, frühen Prozesse der Transplantateinheilung zu untersuchen. Gerade die ersten drei Monate sind dabei besonders ausschlaggebend, da

eine möglichst frühe Wiederherstellung der vollen Belastbarkeit für den klinischen Erfolg von entscheidender Bedeutung ist. Dabei konnten wir deutlich zeigen, dass das frühe Remodeling gestört oder zumindest verzögert abläuft.

Diese Problematik ist bereits bei anderen Sterilisationsverfahren, die im Rahmen des allogenen VKB-Ersatzes getestet wurden, festgestellt worden. Fideler et al. [48] verglichen im Jahre 1995 Allografts, die durch die Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen sterilisiert worden waren, mit Autografts. Dabei verwendeten sie humane BPTB-Transplantate. Ergebnis ihrer Studie war, dass die Bestrahlung einen dosisabhängigen Effekt auf die biomechanischen Eigenschaften des Transplantates ausübt. Schon bei einer Dosis von 2.0 mrad stellten sie Auswirkungen fest, wobei 1.5 - 2.5 mrad als notwendig angesehen werden, um eine potente Sterilisation zu gewährleisten. Eine klinische Studie von Rappé et al. [119] zeigte ebenfalls die Unterlegenheit von bestrahlten Allografts im Vergleich zu Autografts. In der sterilisierten Gruppe waren 11 von 33 Transplantaten frühe Totalversager, in der autologen Gruppe nur 1 von 42. Auch histologische Untersuchungen, wie von Gorschewsky et al. [60] 2002 an humanen Patellarsehnen, führten zu gleichen Resultaten. Ihre Studie umfasste aufwändige klinische sowie histologische Untersuchungen. 136 Patienten setzten sie Auto- und 132 Patienten  $\gamma$ -bestrahlte Allografts ein und verglichen diese. Neben einer wesentlich höheren Rerupturrate und einer größeren Laxizität im Pivot-Shift-Test und in der KT-1000-Translationsmessung bei der klinischen Untersuchung der Allografts, beobachteten sie auf histologischer Ebene Hinweise auf eine verzögerte Einheilung und einen verlängerten Umbauvorgang. Hyperzellularität und Hypervaskularität waren im allogenen Gewebe länger und deutlicher vorhanden, außerdem war das Kollagengerüst nach einem Jahr noch immer nicht regelmäßig longitudinal ausgerichtet. Der direkte Vergleich des Remodelings von bestrahltem und PES-sterilisiertem Gewebe ist jedoch schwierig. Es sind zwar eindeutig identische Tendenzen zu erkennen. Welches Verfahren einen stärkeren negativen Einfluss ausübt, ist aufgrund der unterschiedlichen Studienmodelle und untersuchten Parameter jedoch schwer festzustellen.

Zusammenfassend lässt sich also Folgendes sagen. In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass nach Ersatz des VKBs durch ein freies Sehnen-Transplantat ein Remodeling stattfindet. Dabei gibt es hinsichtlich der Zeit und der Prozesse einen ganz charakteristischen Ablauf, der in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden konnte. Gleichzeitig wurde herausgefunden, dass dieser Ablauf in verschiedener Weise beeinflusst werden kann. Autologe Transplantate durchlaufen einen schnelleren Remodelingprozess als nicht-sterilisierte, allogene Transplantate. Im allogenen, sterilisierten Transplantat ist das Remodeling besonders stark gestört.

### 4.3.1 Myofibroblasten

In der Vorläuferstudie wurde erstmals die Myofibroblastenzahl als Parameter für den Ablauf des Remodeling-Prozesses zum Vergleich von autologen und allogenen Transplantaten herangezogen. Also wählten auch wir diese Parameter, um eventuelle Unterschiede der Vorgänge bei PES-sterilisierten Allografts darstellen zu können.

In welcher Weise Myofibroblasten das Remodeling beeinflussen, ist noch nicht vollständig geklärt. In-vitro Studien zeigten, dass sie kontraktile Eigenschaften besitzen und dadurch Einfluss auf die extrazelluläre Matrix ausüben [93, 154]. Auch bei der Wundheilung [55] und verschiedenen Erkrankungen, die mit einer Kontraktion des Gewebes einhergehen, wurden sie nachgewiesen [2, 25, 54, 69]. Faryniarz et al. fanden im Jahre 1996 Myofibroblasten in gesunden und heilenden medialen Kollateralbändern des Kaninchens und vermuteten, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Wiederherstellung der in-situ Spannung spielten [46]. Zwei Jahre später gelang Murray und Spector der Nachweis von Myofibroblasten im nativen und rupturierten humanen VKB. Außerdem stellten sie einen Zusammenhang von Crimplänge und Myofibroblastenzahl fest. In Bereichen mit der höchsten Anzahl an Myofibroblasten fanden sie die kürzeste Wellenlänge des Crimps [98, 99]. Auch Weiler et al. zeigten diesen Zusammenhang, als sie im Jahre 2002 Myofibroblasten nach VKB-Ersatz im Schafsmodell untersuchten [164].

Die Ergebnisse der Vorläuferstudie bestätigten diesen Zusammenhang jedoch nicht. Nach 12 Wochen beobachtete Dustmann [41] zwar eine erhöhte Myofibroblastendichte, die Crimplänge stellte sich aber ebenfalls erhöht dar. Unsere Studie zeigt diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse. Sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen lag zwar bei einer niedrigen Myofibroblastendichte eine erhöhte Crimplänge vor. Von 6 auf 12 Wochen stieg die Crimplänge allerdings etwas an, wobei eher eine leichte Erhöhung der Myofibroblastendichte zu beobachten war. Da in unserer Studie aber keine quantitative Auswertung der Myofibroblasten durchgeführt wurde (s. Abschn. 3.2), ist es nicht möglich, einen statistischen Zusammenhang aufzuzeigen.

Auch wenn der Zusammenhang von Myofibroblasten und Crimpformierung in der Literatur kontrovers diskutiert wird, gehen wir davon aus, dass Myofibroblasten eine wichtige Rolle beim Remodelingprozess spielen. Sie scheinen für die in-situ Spannung von Sehnen- und Bandgewebe und auch für den Spannungswiederaufbau im Rahmen des Remodeling-Prozesses verantwortlich zu sein. Als biologisch aktive Zellen stellen sie allemal einen Indikator dafür dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie, abgesehen von den kontraktilelementen, auch über die Fähigkeit

verfügen, sekretorisch aktiv zu werden. Die Myofibroblasten sezernieren die Vorläuferproteine des Kollagens und beeinflussen durch sezernierte Kollagenasen den Gewebeabbau [35, 137, 138], wodurch sie definitiv einen Einfluss auf die Zusammensetzung und die Reißfestigkeit des Gewebes haben.

Desweiteren beschrieb Dustmann in der Vorläuferstudie den Verlauf der Myofibroblastenzahl im Rahmen des Bandremodelings. Nach 6 Wochen war die Zahl bei Autografts und nicht-sterilisierten Allografts unter das Niveau der nativen Flexorsehne gesunken. Bei nicht-sterilisierten Allografts fiel die Zahl jedoch signifikant niedriger aus als bei Autografts. Nach 12 Wochen war die Myofibroblastenzahl im Rahmen des Remodelings deutlich angestiegen, auch dort blieb die Zahl bei nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten signifikant niedriger. Nach 52 Wochen näherten sich die Zahlen in beiden Gruppen dann einander an und entsprachen in etwa dem Niveau von nativer Flexorsehne und nativem VKB.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass das PES-sterilisierte Transplantat zum Zeitpunkt 0 völlig frei von Myofibroblasten war. Nach 6 Wochen waren vereinzelte Gruppen an zentral fingerförmig einwachsenden Myofibroblasten zu erkennen, was nur durch eine Neubesiedlung zu erklären ist. Im Vergleich zu nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten war die Menge zu diesem Zeitpunkt allerdings deutlich geringer. Nach 12 Wochen ergab sich kein verändertes Bild in den PES-sterilisierten Transplantaten. Nach wie vor waren nur vereinzelt Myofibroblasten zu sehen. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass zwar ebenfalls eine gewisse Remodelingaktivität bestand. Insgesamt zeigte sich aber, dass der Prozess im Vergleich zu autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten deutlich verzögert ablief.

### **4.3.2 Kollagenverteilung**

Viele Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass das VKB einen anderen Gehalt an Kollagen I und III als die Flexorsehne aufweist [5, 8, 120, 166]. Beispielsweise stellten Amiel et al. in der Achilles- und Patellarsehne des Kaninchens einen Anteil von über 95 % Kollagen I und weniger als 5 % Kollagen III am Gesamtkollagengehalt fest. Im VKB fanden sie dagegen ca. 90 % Kollagen I und 10-15 % Kollagen III [5].

Außerdem wurde nachgewiesen, dass sich der Kollagengehalt eines Gewebes im Rahmen verschiedener Prozesse verändern kann. Williams et al. fanden 1984 heraus, dass der Gehalt an Kollagen

III in verletzten Bindegewebsstrukturen bereits nach wenigen Wochen stark ansteigt. Die vermehrte Bildung von Kollagen III geht dabei mit einem Abfall des prozentualen Anteils an Kollagen I einher [169].

Diese Dynamik ist auch im Laufe des Remodelings nach Kreuzband-Ersatz zu beobachten. Ng et al. wiesen dies an der Ziege nach (autologes BPTB-Transplantat) [100], Bland und Ashhurst [16] sowie Amiel et al. [8] am Kaninchen (autologes Patellarsehnentransplantat) und auch bei Untersuchungen am Schaf konnten identische Ergebnisse gezeigt werden (autologe Patellar- bzw. Flexorsehnentransplantate) [21, 22, 52]. Bosch et al. beschrieben, dass die vermehrte Bildung von Kollagen III insbesondere während der Revitalisierungsphase des Remodelingprozesses, also ca. von der 3. bis zur 12. Woche nach der Transplantation, stattfindet [22]. Amiel et al. stellten fest, dass der Gehalt an Kollagen III in der eingesetzten Patellarsehne ausgehend von  $< 5\%$  zunächst stetig stieg, so dass nach 6 Wochen 15-18 % Kollagen III nachweisbar waren. Nach ca. 30 Wochen war der Kollagen III-Gehalt wieder leicht gesunken und entsprach mit 11-14 % dem des nativen VKBs [8].

In unserer Studie konnte ein Anstieg des Kollagen III-Gehaltes nicht festgestellt werden. Der Gehalt veränderte sich weder innerhalb der ersten 6, noch von 6 auf 12 Wochen signifikant. Gleiches gilt für den Gehalt an Kollagen I. Auch hier wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet. In Anbetracht der Vielzahl an Studien, die diese Prozesse im Rahmen des Remodelings bewiesen haben, deuten unsere Ergebnisse also auf eine Verzögerung bzw. Störung des Remodelings bei der Verwendung von PES-sterilisierten Transplantaten hin. Sie fügen sich somit in das Bild ein, das bei unseren Untersuchungen der Gesamtzellzahl, der Myofibroblasten und des Crimps entstanden war.

Ein Problem bei der Einordnung der Ergebnisse ist allerdings, dass bisher keine Studien an allogenen Transplantaten durchgeführt wurden. Eigentlich hätte dies im Rahmen unserer Vorläuferstudie stattfinden sollen. Geplant war, autologe und nicht-sterilisierte, allogene Transplantate im identischen Modell und mit identischen Methoden bezüglich der Veränderungen ihres Kollagengehaltes zu vergleichen. Da dieser Teil des Projekts nicht abgeschlossen wurde, ist keine direkte Vergleichsgruppe vorhanden. Eine Beurteilung im Vergleich zu nicht-sterilisierten Allografts ist somit nicht möglich.

Es wäre durchaus denkbar, dass auch nicht-sterilisierte, allogene Transplantate erst zu einem späteren Zeitpunkt als nach 12 Wochen eine Erhöhung des Kollagen III-Gehaltes und einen Abfall des

Kollagen I-Gehaltes aufweisen. Der Vergleich von Autografts mit nicht-sterilisierten Allografts hatte im Bezug auf andere histologische Parameter einen langsamer ablaufenden Remodelingprozess gezeigt [41]. Um die Frage zu klären, ob das verzögerte Remodeling der PES-sterilisierten Transplantate allein bzw. hauptsächlich auf die PES zurückzuführen ist, wären Untersuchungen nicht-sterilisierten Allografts von großer Bedeutung.

## 4.4 Limitierungen der Studie

Zunächst müssen an dieser Stelle generelle Limitierungen von Tiermodellen genannt werden, welche natürlich auch für unsere Studie gelten. Es ist beispielsweise nicht möglich, die postoperative Rehabilitationsphase ausreichend zu protokollieren und zu beeinflussen. Die postoperative Belastung kann nicht kontrolliert werden, Schmerzen und Beweglichkeit sind schwer einzuschätzen und eine Rehabilitation nach vorgegebenem Schema ist nicht realisierbar. Alle Tiere belasteten die operierten Kniegelenke so früh wie möglich wieder voll, was nach spätestens zwei Wochen der Fall war. Der frühe Heilungsprozess könnte also auch durch eine zu hohe Gewichtsbelastung negativ beeinflusst worden sein. Da aber die nicht-sterilisierten Allografts unserer Vorgängerstudie anhand des identischen Tiermodells untersucht wurden, kann das verzögerte Remodeling der PES-sterilisierten Allografts nicht alleine durch die genannten Faktoren erklärt werden.

Da die Transplantate der Vergleichsgruppe ausschließlich aus fresh-frozen Allografts bestanden, sind die Ergebnisse insbesondere im Vergleich zu diesem Gewebe zu bewerten. Andere Transplantattypen, wie kryopräservierte, gefriergetrocknete oder bestrahlte Sehnen, die durchaus unterschiedliche biologische und mechanische Qualitäten aufweisen könnten, wurden im Rahmen unserer Studie nicht untersucht.

Desweiteren ist es schwierig, Ergebnisse aus Tierstudien direkt auf den Menschen zu übertragen. Ein Beispiel dafür ist der Vergleich von autologen und allogenen Sehnentransplantaten zum VKB-Ersatz. Viele klinische und tierexperimentelle Studien haben sich mit dieser Thematik beschäftigt. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass Allografts besonders in der frühen Phase der Einheilung zumeist unterlegen sind [29, 41, 60, 74, 81, 101]. Histologische und biomechanische Untersuchungen ergaben ein verzögert ablaufendes Remodeling bei allogenen Transplantaten. Die Ergebnisse der klinischen Studien (beim Menschen) variierten dagegen stark, sie deuten auf keinen klaren Vor- oder Nachteil von Allografts hin [10, 113, 136, 159].

Eine weitere Einschränkung entstand durch die Wahl der Standzeiten von 6 und 12 Wochen. Der Zeitpunkt, zu dem der Remodelingprozess eines Sehnentransplantates als VKB-Ersatz abgeschlossen ist, wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Die Angaben liegen zwischen 30 Wochen und einem Jahr [8, 22, 44, 158]. Unsere Studie gibt keinerlei Auskunft über Langzeitergebnisse. Ob sich das Gewebe des Transplantates letztlich dem eines nativen VKBs angleicht, ist nicht festzustellen. Allerdings wurde bewusst nur das frühe Remodeling untersucht. Wenn gute Ergebnisse festgestellt worden wären, hätte eine Langzeitstudie angeschlossen werden sollen. Da aber alle betrachteten Parameter schon zu den frühen Zeitpunkten auf eine deutliche Verzögerung des Heilungsprozesses hinwiesen, wurde keine weitere Studie durchgeführt. Denn gerade für die klinische Anwendung wäre eine verlangsamte Heilungsphase, die zu einer verspäteten Mobilisierung des Patienten führen würde, extrem ungünstig.

Zudem ist es nicht möglich gewesen, die Daten der Kollagenanalyse semiquantitativ auszuwerten. Die dazu benötigten Standards konnten trotz hohen Aufwands nicht reproduzierbar etabliert werden. Es wurden sowohl für Kollagen I als auch für Kollagen III Standards von zwei verschiedenen Firmen bezogen. Die Aufarbeitung erfolgte unabhängig voneinander durch zwei Personen, die mit der Methode gut vertraut waren. Dennoch zeigte sich nach Auftrennung der Bromzyan-Spaltprodukte nicht das erwartete Bild. Die Identifizierung der Markerpeptide für Kollagen I und III war jedoch auch ohne die Standards möglich. Sie sind in einer Vielzahl von Studien als Markerpeptide herangezogen worden und werden über ihre Laufweite auf dem Gel detektiert [5, 8, 33, 45, 120, 133]. Ein mitgeführter Multicolormarker mit Peptiden bekannter Laufweite diente dabei als Skala in kDa.

Die Analyse der Myofibroblastendichte konnte nicht analog der Vorstudien über Auto- und nicht-sterilisierte Allografts quantitativ erfolgen, da die Verteilung der Zellen in unseren immunhistologisch angefärbten Schnitten sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen sehr inhomogen war. Dadurch wäre eine für das Gesamttransplantat gültige Myofibroblastendichte nicht legitim, zumal teilweise keine Myofibroblasten im Transplantat zu beobachten waren. Dieses konnte in keiner der Sehnen der Vorstudie festgestellt werden. Wir fanden wesentlich größere Areale vor, in denen gar keine Myofibroblasten existierten. Nach gemeinsamer Betrachtung der Schnitte beider Arbeitsgruppen entschieden wir schließlich, keine quantitative Analyse der PES-sterilisierten Allografts durchzuführen. Um das reale Bild möglichst genau wiedergzugeben, erschien es uns sinnvoller, die Auswertung rein deskriptiv vorzunehmen. Somit konnte ein statistischer Vergleich der Myofibroblastenzahl nicht durchgeführt werden.

## 4.5 Ergebnisse der gesamten Arbeitsgruppe im Zusammenhang

Um die Eigenschaften und Veränderungen der PES-sterilisierten Transplantate umfassend beurteilen zu können, wurden im Rahmen unserer Studie auch andere als die bereits beschriebenen Parameter untersucht. Dabei handelte es sich um Revaskularisierung, Biomechanik, Knochen-Sehnen-Einheilung und die Expression von Wachstumsfaktoren.

Bei der Revaskularisierung zeigten sich deutliche Unterschiede im Vergleich zu nicht-sterilisierten Allografts und Autografts. Nach 6 Wochen war in allen Zonen der PES-sterilisierten Transplantate eine signifikant geringere Anzahl an Kapillaranschnitten pro  $\text{mm}^2$  nachzuweisen. Nach 12 Wochen ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier war die Gefäßdichte der PES-sterilisierten Transplantate in fast allen Regionen signifikant niedriger als die der allogenen, nicht-sterilisierten, und der autologen Transplantate. Lediglich in der subsynovialen Zone zeigte sich im Vergleich zu den nicht-sterilisierten Allografts eine nicht signifikante Verringerung.

Die histologischen Ergebnisse könnten gleichzeitig die Beobachtungen der biomechanischen Testungen erklären. In allen Testungen war das PES-sterilisierte Allograft dem Autograft und dem nicht-sterilisierten Allograft unterlegen. Besonders deutlich war dies nach 12 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt wurden signifikante Unterschiede in der Versagenskraft, der Laxizität und der Steifigkeit festgestellt. 44,4 % der PES-sterilisierten Allografts rissen bereits beim vorderen Schubladentest unter submaximalen Belastungen.

Diese Ergebnisse fügen sich also in das Bild, das bei der histologischen Untersuchung dieser Arbeit entstanden war, ein. Alle Parameter weisen im Vergleich zu Autografts und nicht-sterilisierten Allografts auf eine deutliche Verzögerung des Remodelings bei PES-sterilisierten Transplantaten hin.

Die Untersuchungen der Knochen-Sehnen-Einheilung ergaben interessanterweise jedoch ein anderes Bild. Es zeigte sich, dass die ossäre Integration des PES-sterilisierten Allografts in den Knochenkanal gegenüber der des nicht-sterilisierten beschleunigt verläuft. Die PES könnte also einen osteoinduktiven Effekt bewirken, eine Ursache dafür ist bisher nicht bekannt.

## 4.6 Schlussfolgerung

Anhand der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass das Remodeling in PES-sterilisierten, allogenen Transplantaten beim VKB-Ersatz langsamer abläuft als in nicht-sterilisierten Allografts. Innerhalb der frühen Phase von 0 bis 12 Wochen ist kaum eine Entwicklung in den PES-Allografts zu erkennen. Die Gesamtzellzahl und die Crimpfrequenz bleiben auf einem annähernd gleichen Niveau und die Verteilung der Zellen verändert sich kaum. Auch die Myofibroblasten zeigen zu diesen Zeitpunkten wenig Dynamik, in beiden Gruppen sind nur vereinzelt strahlförmig einwachsende Zellgruppen zu erkennen, welche auf ein beginnendes Remodeling hinweisen. Die Kollagentypisierung zeigte, dass es im Laufe der ersten 12 Wochen nach Transplantatersatz keine signifikante Veränderung des Gehalts an Kollagen I und III gibt.

Ob das Remodeling nur verzögert abläuft oder auch zu schlechteren Endergebnissen führt, ist nicht erfasst worden. Allerdings ist dies hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse auch nicht wirklich relevant. Gerade die frühe Phase der Einheilung von allogenen Transplantaten ist entscheidend, um Patienten eine rasche Mobilisierung und Rehabilitierung zu ermöglichen. Die Grundvoraussetzung dafür ist eine rasch voranschreitende biologische Heilung und die Wiederherstellung der mechanischen Funktion. Beides ist beim PES-sterilisierten Transplantat offenbar gestört, was sich auch in der klinischen Anwendung zu bestätigen scheint. Entsprechend sollte aktuell von einem weiteren Einsatz des Verfahrens in der Klinik abgesehen werden. In zukünftigen Studien gilt es, ein präzises Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse zu erlangen, um entweder dieses Verfahren komplett zu verlassen oder entsprechende Modifikationen vornehmen zu können, so dass ein sicherer Einsatz zu gewährleisten ist.

# 5 Zusammenfassung

Im Verlauf der letzten Jahre ist der Bedarf an allogenen Sehnentransplantaten in der Kreuzbandchirurgie stark angestiegen. In Deutschland und insbesondere in den USA werden sie immer häufiger auch zum primären Ersatz des vorderen Kreuzbandes genutzt, da sie autologen Transplantaten gegenüber eine Vielzahl von Vorteilen aufweisen. Problematisch ist jedoch die relativ geringe Verfügbarkeit aufgrund von Infektionsgefahr und komplizierten Transplantationsgesetzen. Anlass der vorliegenden Arbeit waren die bisher unbefriedigenden Ergebnisse verschiedener Sterilisationsverfahren. Durch die Etablierung eines wirksamen und nebenwirkungsarmen Sterilisationsverfahrens ließe sich die Verfügbarkeit allogener Transplantate deutlich verbessern.

Das in dieser Studie angewendete Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren wird seit Jahren zur Sterilisation von Knochengewebe erfolgreich eingesetzt. Im Tiermodell untersuchten wir nun seine Auswirkungen auf das Remodelingverhalten von Sehnentransplantaten, die in der vorderen Kreuzbandchirurgie eingesetzt werden.

Dazu transplantierten wir 18 Schafen allogene, PES-sterilisierte, freie Sehnen des *M. flexor digitalis superficialis*. Nach 6 und 12 Wochen Standzeit erfolgte die Entnahme des transplantierten Gewebes, anschließend wurde es umfangreich histologisch untersucht. Zum Vergleich wurden die Daten einer vorher durchgeführten Studie mit autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten herangezogen. Versuchsaufbau und Methoden waren identisch.

Die Ergebnisse zeigen, dass der frühe Remodeling-Prozess der PES-sterilisierten Transplantate deutlich verzögert ablief. Nach 6 Wochen war eine niedrigere Gesamtzellzahl als bei autologen und nicht-sterilisierten, allogenen Transplantaten festzustellen, nach 12 Wochen war dieser Unterschied dann signifikant. Die Crimplänge stellte sich nach 6 und nach 12 Wochen signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen dar. Eine Verkürzung, die eine Annäherung an die histologische Morphologie des nativen VKBs bedeutet hätte, war in diesem Zeitraum noch nicht zu beobachten. Auch die Betrachtung der Myofibroblasten zeigte zu diesen Zeitpunkten im Vergleich eine deutlich geringere Dynamik im Remodeling. Nur vereinzelt konnten einwachsende Myofibroblasten nachgewiesen werden. Der Gehalt an Kollagen I und III änderte sich über den gesamten beobachteten Zeitraum nicht signifikant, obwohl im Rahmen des Remodelings ein Anstieg von Kollagen

III zulasten von Typ I zu erwarten gewesen wäre. Auch hier wurde also ein gestörter oder verzögerter Ablauf des Remodelings festgestellt. Da alle Rahmenbedingungen und äußeren Einflüsse prinzipiell identisch mit denen der Vergleichsgruppe waren, kommen wir zu dem Schluss, dass die PES für die Verzögerung verantwortlich war.

Der Einsatz der PES zur Sterilisation von allogenen, freien Sehnentransplantaten zum Ersatz des VKBs kann dieser Studie zufolge also nicht empfohlen werden. Langzeitstudien könnten klären, ob nur der zeitliche Verlauf oder auch das Endergebnis des Remodelings durch die PES beeinflusst wird. Auf jeden Fall bedeutet eine langsamere Einheilung mit anhaltender Instabilität aber, dass Patienten nach VKB-Ersatz länger geschont werden müssten und erst zu einem späteren Zeitpunkt volle Belastbarkeit erlangen könnten. Dies widerspräche allerdings den derzeit gängigen Therapiekonzepten.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] *Immunistologische Färbung, ABC-Technik. Lexikon der Biochemie.* <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biochemie/9>, September 2007.
- [2] ADLER, K. B., J. E. CRAIGHEAD, N. V. VALLYATHAN und J. N. EVANS: *Actin-containing cell in human pulmonary fibrosis.* Am J Pathol, 102(3):427–37, 1981.
- [3] AGLIETTI, P., R. BUZZI, S. D'ANDRIA und G. ZACCHEROTTI: *Patellofemoral problems after intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction.* Clin Orthop, (288):195–204, 1993.
- [4] AMIEL, D., W. H. AKESON, F. L. HARWOOD und C. B. FRANK: *Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization.* Clin Orthop Relat Res, (172):265–70, 1983.
- [5] AMIEL, D., C. FRANK, F. HARWOOD, J. FRONEK und W. AKESON: *Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison.* J Orthop Res, 1(3):257–65, 1984.
- [6] AMIEL, D., C. B. FRANK, F. L. HARWOOD, W. H. AKESON und J. B. KLEINER: *Collagen alteration in medial collateral ligament healing in a rabbit model.* Connect Tissue Res, 16(4):357–66, 1987.
- [7] AMIEL, D., J. B. KLEINER und W. H. AKESON: *The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin.* Am J Sports Med, 14(6):449–62, 1986.
- [8] AMIEL, D., J. B. KLEINER, R. D. ROUX, F. L. HARWOOD und W. H. AKESON: *The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon.* J Orthop Res, 4(2):162–72, 1986.
- [9] ANDERSSON, C., M. ODENSTEN und J. GILLQUIST: *Knee function after surgical or non-surgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament: a randomized study with a long-term follow-up period.* Clin Orthop, (264):255–63, 1991.
- [10] ANDREWS, M., F. R. NOYES und S. D. BARBER-WESTIN: *Anterior cruciate ligament allograft reconstruction in the skeletally immature athlete.* Am J Sports Med, 22(1):48–54, 1994.
- [11] ARNOCKY, S. P.: *Anatomy of the anterior cruciate ligament.* Clin Orthop, (172):19–25, 1983.

- [12] ARNOCKY, S. P., R. M. RUBIN und J. L. MARSHALL: *Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs.* J Bone Joint Surg Am, 61(8):1221–9, 1979.
- [13] ARNOCKY, S. P., R. F. WARREN und M. A. ASHLOCK: *Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft. An experimental study.* J Bone Joint Surg Am, 68(3):376–85, 1986.
- [14] AUNE, A. K., M. HUKKANEN, J. E. MADSEN, J. M. POLAK und L. NORDSLETTEN: *Nerve regeneration during patellar tendon autograft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction: an experimental and clinical study.* J Orthop Res, 14(2):193–9, 1996.
- [15] BHATHAL, P. S.: *Presence of modified fibroblasts in cirrhotic livers in man.* Pathology, 4(2):139–44, 1972.
- [16] BLAND, Y. S. und D. E. ASHHURST: *Changes in the distribution of fibrillar collagens in the collateral and cruciate ligaments of the rabbit knee joint during fetal and postnatal development.* Histochem J, 28(5):325–34, 1996.
- [17] BÖCK, P. (HRSG.) ET AL.: *Romeis Mikroskopische Technik*, Band 17. Urban & Schwarzenberg, 1989.
- [18] BÖHM, R. und H. STOCKINGER: *Ergebnisse der experimentellen Desinfektionsmittelprüfung an Sporen verschiedener Clostridienarten mit Formaldehyd und Peressigsäure.* Hyg Med, 10:44–48, 1985.
- [19] BONNET, A.: *Traité de thérapeutique des maladies articulaires.* Baillères, Paris, Seiten 354–357, 1853.
- [20] BOSCH, U., B. DECKER, H. D. MOLLER, W. J. KASPERCZYK und H. J. OESTERN: *Collagen fibril organization in the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction. A quantitative evaluation in a sheep model.* Am J Sports Med, 23(2):196–202, 1995.
- [21] BOSCH, U. und W. J. KASPERCZYK: *Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction—a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model.* American Journal of Sports Medicine, 20(5):558–66, 1992.
- [22] BOSCH, U. und W. J. KASPERCZYK: *The healing process after cruciate ligament repair in the sheep model.* Orthopade, 22(6):366–71, 1993.
- [23] BRÜCKNER, H.: *Eine neue Methode der Kreuzbandplastik.* Chirurg, 37:413–414, 1966.

- [24] BUCHER, O. und H. WARTENBERG: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Band 12. Verlag Hans Huber, 1997.
- [25] BUNKER, T. D. und P. P. ANTHONY: *The pathology of frozen shoulder. A Dupuytren-like disease*. J Bone Joint Surg Br, 77(5):677–83, 1995.
- [26] BUSECK, M. S. und F. R. NOYES: *Arthroscopic evaluation of meniscal repairs after anterior cruciate ligament reconstruction and immediate motion*. Am J Sports Med, 19(5):489–94, 1991.
- [27] CAMPBELL, W. C.: *Repair of the ligaments of the knee*. Surg. Gynecol. Obstet., 62:964, 1936.
- [28] CANNON, W. D., JR. und J. M. VITTORI: *The incidence of healing in arthroscopic meniscal repairs in anterior cruciate ligament-reconstructed knees versus stable knees*. Am J Sports Med, 20(2):176–81, 1992.
- [29] CHANG, S. K.: *Anterior cruciate ligament reconstruction: allograft versus autograft*. Arthroscopy, 19(5):453–62, 2003.
- [30] CHEN, C. H., W. J. CHEN und C. H. SHIH: *Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon-patellar bone autograft*. J Trauma, 46(4):678–82, 1999.
- [31] CLANCY, W. G., JR., R. G. NARECHANIA, T. D. ROSENBERG, J. G. GMEINER, D. D. WISNEFSKE und T. A. LANGE: *Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys*. J Bone Joint Surg Am, 63(8):1270–84, 1981.
- [32] CLANCY, W. G., JR., J. M. RAY und D. J. ZOLTAN: *Acute tears of the anterior cruciate ligament. Surgical versus conservative treatment*. J Bone Joint Surg Am, 70(10):1483–8, 1988.
- [33] COLE, W. G. und D. A. BEAN: *Analysis of collagen cyanogen bromide peptides using electrophoresis in continuous concave gradient polyacrylamide gels*. Anal Biochem, 92(1):183–8, 1979.
- [34] CORRIGAN, J. P., W. F. CASHMAN und M. P. BRADY: *Proprioception in the cruciate deficient knee*. J Bone Joint Surg Br, 74(2):247–50, 1992.
- [35] CORRY, I. S., J. M. WEBB, A. J. CLINGELEFFER und L. A. PINCZEWSKI: *Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. A comparison of patellar tendon autograft and four-strand hamstring tendon autograft*. American Journal of Sports Medicine, 27(4):444–54, 1999.

- [36] CROSS, M. J., G. ROGER, P. KUJAWA und I. F. ANDERSON: *Regeneration of the semitendinosus and gracilis tendons following their transection for repair of the anterior cruciate ligament*. American Journal of Sports Medicine, 20(2):221–3, 1992.
- [37] DAHLSTEDT, L., N. DALEN und U. JONSSON: *Goretex prosthetic ligament vs. Kennedy ligament augmentation device in anterior cruciate ligament reconstruction. A prospective randomized 3-year follow-up of 41 cases*. Acta Orthop Scand, 61(3):217–24, 1990.
- [38] DANDY, D. J.: *Arthroscopic surgery of the knee*. Br J Hosp Med, 27(4):360, 362, 365, 1982.
- [39] DANIEL, D. M., W. H. AKESON und O'CONNOR J. J.: *Knee Ligaments - Structure, Function, Injury and Repair*. Raven Press, New York, 1 Auflage, 1990.
- [40] DELAY, B.S., R.J. SMOLINSKI, W.M. WIND und D.S. BOWMAN: *Current practices and opinions in ACL reconstruction and rehabilitation*. American Journal of Knee Surgery, 14:85–91, 2001.
- [41] DUSTMANN, M.: *Histologische und immunhistologische Untersuchungen zum Transplantat-Remodeling nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes mit freiem autologen und allogenen Sehnentransplantat*. Zentrum für Muskuloskeletale Chirurgie. Medizinische Fakultät - Universitätsmedizin Berlin, 2007.
- [42] EBERHARDT, C., A. JÄGER, G. SCHWETLICH und M. A. RAUSCHMANN: *Geschichte der Chirurgie des vorderen Kreuzbandes*. Der Orthopäde, 31(8):702–709, 2002.
- [43] ENGBRETSSEN, L., P. BENUM, O. FASTING, A. MOLSTER und T. STRAND: *A prospective, randomized study of three surgical techniques for treatment of acute ruptures of the anterior cruciate ligament*. Am J Sports Med, 18(6):585–90, 1990.
- [44] FALCONIERO, R. P., V. J. DISTEFANO und T. M. COOK: *Revascularization and ligamentization of autogenous anterior cruciate ligament grafts in humans*. Arthroscopy, 14(2):197–205, 1998.
- [45] FAN, L., K. SARKAR, D. J. FRANKS und H. K. UHTHOFF: *Estimation of total collagen and types I and III collagen in canine rotator cuff tendons*. Calcif Tissue Int., 61(3):223–9, 1997.
- [46] FARYNIARZ, D. A., C. CHAPONNIER, G. GABBIANI, I. V. YANNAS und M. SPECTOR: *Myofibroblasts in the healing lapine medial collateral ligament: possible mechanisms of contraction*. J Orthop Res, 14(2):228–37, 1996.
- [47] FEAGIN, J. und W. CURL: *Isolated tear of the anterior cruciate ligament. 5-year follow-up study*. Am J Sports Med, 4:95–100, 1976.

- [48] FIDELER, B. M., JR. VANGSNESS, C. T., B. LU, C. ORLANDO und T. MOORE: *Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts*. Am J Sports Med, 23(5):643–6, 1995.
- [49] FIDELER, B. M., JR. VANGSNESS, C. T., T. MOORE, Z. LI und S. RASHEED: *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, 76(7):1032–5, 1994.
- [50] FRANK, C. B. und D. W. JACKSON: *The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament*. J Bone Joint Surg Am, 79(10):1556–76, 1997.
- [51] FREIWALD, J., M. ENGELHARDT, I. REUTER, A. GNEWUCH und P. KONRAD: *Sensorische Versorgung - Afferente Fortleitung - Verschaltung - Funktion*. Krankengymnastik (KG), 50(2):212–27, 1998.
- [52] FRITZ, F.: *Untersuchungen zum Prozess der Ligamentisation und der Sehnendefektheilung beim Ersatz des vorderen Kreuzbandes im juvenilen Schafmodell*. Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover und Klinik für Unfallchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover, 2006.
- [53] FU, F. H. und K. R. SCHULTE: *Anterior cruciate ligament surgery 1996. State of the art?* Clin Orthop, (325):19–24, 1996.
- [54] GABBIANI, G. und G. MAJNO: *Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study*. Am J Pathol, 66(1):131–46, 1972.
- [55] GABBIANI, G., G. B. RYAN und G. MAJNE: *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction*. Experientia, 27(5):549–50, 1971.
- [56] GARRETT, W. E.: *The Basic Science of Allografts - Allografts: Where's the Beef?* Soft Tissue Allografts in Orthopaedics: Science and Application. AOSSM Allograft Workshop, Atlanta, GA, January 14-16, 2005.
- [57] GIRGIS, F. G., J. L. MARSHALL und A. MONAJEM: *The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis*. Clin Orthop, (106):216–31, 1975.
- [58] GOETJES, H.: *Über Verletzungen der Ligamenta cruciata des Kniegelenkes*. Dtsch Z Chir, 123:221–289, 1913.
- [59] GORADIA, V. K., M. C. ROCHAT, M. KIDA und W. A. GRANA: *Natural history of a hamstring tendon autograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model*. Am J Sports Med, 28(1):40–6, 2000.

- [60] GORSCHESKY, O., A. BROWA, U. VOGEL und E. STAUFFER: *Klinisch-histologischer Vergleich des allogenen und autologen Patellarsehndrittels (Bone-Tendon-Bone) zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbands*. Unfallchirurg, 105(8):703–14, 2002.
- [61] GRINNELL, F., M. ZHU, M. A. CARLSON und J. M. ABRAMS: *Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue*. Exp Cell Res, 248(2):608–19, 1999.
- [62] HALATA, Z., C. WAGNER und K. I. BAUMANN: *Sensory nerve endings in the anterior cruciate ligament (Lig. cruciatum anterius) of sheep*. Anat Rec, 254(1):13–21, 1999.
- [63] HAMNER, D. L., JR. BROWN, C. H., M. E. STEINER, A. T. HECKER und W. C. HAYES: *Hamstring tendon grafts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: biomechanical evaluation of the use of multiple strands and tensioning techniques*. Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume, 81(4):549–57, 1999.
- [64] HANSON, A. N. und J. P. BENTLEY: *Quantitation of type I to type III collagen ratios in small samples of human tendon, blood vessels, and atherosclerotic plaque*. Anal Biochem, 130(1):32–40, 1983.
- [65] HARNER, C. D., G. H. BAEK, T. M. VOGRIN, G. J. CARLIN, S. KASHIWAGUCHI und S. L. WOO: *Quantitative analysis of human cruciate ligament insertions*. Arthroscopy, 15(7):741–9, 1999.
- [66] HARNER, C. D., E. OLSON, J. J. IRRGANG, S. SILVERSTEIN, F. H. FU und M. SILBEY: *Allograft versus autograft anterior cruciate ligament reconstruction: 3- to 5-year outcome*. Clin Orthop Relat Res, (324):134–44, 1996.
- [67] HAUS, J., Z. HALATA und H. J. REFIOR: *Proprioception in the anterior cruciate ligament of the human knee joint - morphological bases. A light, scanning and transmission electron microscopy study*. Z Orthop Ihre Grenzgeb., 130(6):484–94, 1992.
- [68] HEY-GROVES, E. W.: *Operation for repair of the crucial ligaments*. Lancet, 2:674, 1917.
- [69] HILDEBRAND, K. A., C. SUTHERLAND und M. ZHANG: *Rabbit knee model of post-traumatic joint contractures: the long-term natural history of motion loss and myofibroblasts*. J Orthop Res, 22(2):313–20, 2004.
- [70] HINZ, B., D. MASTRANGELO, C. E. ISELIN, C. CHAPONNIER und G. GABBIANI: *Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation*. Am J Pathol, 159(3):1009–20, 2001.

- [71] JACKSON, D. W., E. S. GROOD, S. P. ARNOCKY, D. L. BUTLER und SIMON T. M.: *Freeze dried anterior cruciate ligament allografts. Preliminary studies in a goat model.* Am J Sports Med, 15(4):295–303, 1987.
- [72] JACKSON, D. W., E. S. GROOD, B. T. COHN, S. P. ARNOCKY, T. M. SIMON und J. F. CUMMINGS: *The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats.* J Bone Joint Surg Am, 73(2):201–13, 1991.
- [73] JACKSON, D. W., G. E. WINDLER und T. M. SIMON: *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, 18(1):1–10, 1990.
- [74] JACKSON, D. W. ET AL.: *A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model.* Am J Sports Med, 21(2):176–85, 1993.
- [75] JARVELA, T., T. PAAKKALA, P. KANNUS und M. JARVINEN: *The incidence of patellofemoral osteoarthritis and associated findings 7 years after anterior cruciate ligament reconstruction with a bone-patellar tendon-bone autograft.* Am J Sports Med, 29(1):18–24, 2001.
- [76] JENSEN, K. U. und W. KLEIN: *Probleme und Komplikationen beim künstlichen Kreuzbandersatz.* Arthroscopy, 3:15–23, 1990.
- [77] JOHANSSON, H., P. SJOLANDER und P. SOJKA: *A sensory role for the cruciate ligaments.* Clin Orthop, (268):161–78, 1991.
- [78] JUNQUEIRA, L.C., J. CARNEIRO und T.H. SCHIEBLER: *Histologie*, Band 4. Springer Verlag, 1996.
- [79] KENNEDY, J. C., H. W. WEINBERG und A. S. WILSON: *The anatomy and function of the anterior cruciate ligament. As determined by clinical and morphological studies.* J Bone Joint Surg Am, 56(2):223–35, 1974.
- [80] KIESER, C. W und R.W. JACKSON: *Severin Nordentoft: The First Arthroscopist.* Arthroscopy, 17(5):532–535, 2001.
- [81] KIRKPATRICK, J. S., A. V. SEABER, R. R. GLISSON und F. H. BASSETT: *Cryopreserved anterior cruciate ligament allografts in a canine model.* J South Orthop Assoc, 5(1):20–9, 1996.
- [82] KLEIN, W. und K. U. JENSEN: *Synovitis and artificial ligaments.* Arthroscopy, 8(1):116–24, 1992.

- [83] KUSTOS, T., L. BÁLINT, P. THAN und T. BÁRDOS: *Comparative study of autograft or allograft in primary anterior cruciate ligament reconstruction*. Int Orthop, 28(5):290–3, 2004.
- [84] LANE, J. G., P. MCFADDEN, K. BOWDEN und D. AMIEL: *The ligamentization process: a 4 year case study following ACL reconstruction with a semitendinosus graft*. Arthroscopy, 9(2):149–53, 1993.
- [85] LAURENT, G. J., P. COCKERILL, R. J. MCANULTY und J. R. HASTINGS: *A simplified method for quantitation of the relative amounts of type I and type III collagen in small tissue samples*. Anal Biochem, 113(2):301–12, 1981.
- [86] LENSING, H. H. und H. L. OEI: *Investigations on the sporocidal and fungicidal activity of disinfectants*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg, 181:487–95, 1985.
- [87] LIGHT, N. D.: *Estimation of types I and III collagens in whole tissue by quantitation of CNBr peptides on SDS-polyacrylamide gels*. Biochim Biophys Acta, 702(1):30–6, 1982.
- [88] LINDEMANN, K.: *Über den plastischen Ersatz der Kreuzbänder durch gestielte Sehnenverpflanzung*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 79:316–334, 1950.
- [89] LO GRIPPO, G.: *Procedure for bone sterilization with beta-propiolacton*. J Bone Joint Surg Am, 39:1356–1364, 1987.
- [90] LOMAS, R. J., L. M. JENNINGS, J. FISHER und J.N. KEARNEY: *Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts*. Cell and Tissue Banking, (00):1–12, 2004.
- [91] MACEY, H. B.: *A new operative procedure for repair of ruptured cruciate ligaments of the knee joint*. Surg Gynecol Obstet, 69:108–109, 1939.
- [92] MARCACCI, M., S. ZAFFAGNINI, A. VISANI, F. IACONO, M. P. NERI und A. PETITTO: *Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament with Leeds-Keio ligament in non-professional athletes. Results after a minimum 5 years' follow-up*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 4(1):9–13, 1996.
- [93] MASUR, S. K., H. S. DEWAL, T. T. DINH, I. ERENBURG und S. PETRIDOU: *Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density*. Proc Natl Acad Sci USA, 93(9):4219–23, 1996.
- [94] MCFARLAND, E. G., B. F. MORREY, K. N. AN und M. B. WOOD: *The relationship of vascularity and water content to tensile strength in a patellar tendon replacement of the anterior cruciate in dogs*. Am J Sports Med, 14(6):436–48, 1986.

- [95] MIYASAKA, K.C., D.M. DANIEL, M.L. STONE und P. HIRSHMAN: *The incidence of knee ligament injuries in the general population*. American Journal of Knee Surgery, 4(1):3–8, 1991.
- [96] MUNTING, E., J. WILMART, A. WIJNE, P. HENNEBERT und C. DELLOYE: *Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone*. Acta Orthop Scand, 59:34–38, 1988.
- [97] MURRAY, A. W. und M. F. MACNICOL: *10-16 year results of Leeds-Keio anterior cruciate ligament reconstruction*. Knee, 11(1):9–14, 2004.
- [98] MURRAY, M. M., S. D. MARTIN, T. L. MARTIN und M. SPECTOR: *Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture*. J Bone Joint Surg Am, 82-A(10):1387–97, 2000.
- [99] MURRAY, M. M. und M. SPECTOR: *Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells*. J Orthop Res, 17(1):18–27, 1999.
- [100] NG, G. Y., B. W. OAKES, O. W. DEACON, I. D. MCLEAN und D. R. EYRE: *Long-term study of the biochemistry and biomechanics of anterior cruciate ligament-patellar tendon autografts in goats*. J Orthop Res, 14(6):851–6, 1996.
- [101] NIKOLAOU, P. K., A. V. SEABER, R. R. GLISSON, B. M. RIBBECK und F. H. BASSETT: *Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique*. Am J Sports Med, 14(5):348–60, 1986.
- [102] ODENSTEN, M. und J. GILLQUIST: *Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction*. J Bone Joint Surg Am, 67(2):257–62, 1985.
- [103] O’DRISCOLL, S. W., R. B. SALTER und F. W. KEELEY: *A method for quantitative analysis of ratios of types I and II collagen in small samples of articular cartilage*. Anal Biochem, 145(2):277–85, 1985.
- [104] OSTROWSKY, K.: *Free radicals in bone grafts sterilized with ionizing radiation*. Sborn Ved Prac Lek, Seiten 561–563, 1968.
- [105] OUWELEEN, K. M. und J. J. MCELROY: *A unique complication following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction [see comments]*. Arthroscopy, 11(2):225–8, 1995.
- [106] PAPAGEORGIOU, C. D., C. B. MA, S. D. ABRAMOWITZ, T. D. CLINEFF und S. L. WOO: *A multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model*. Am J Sports Med, 29(5):620–6, 2001.

- [107] PAPANDEA, P., M.C. VULPIANI, A. FERRETTI und F. CONTEDECA: *Regeneration of the semitendinosus tendon harvested for anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 28(4):556–561, 2000.
- [108] PERSIKOV, A. V. und B. BRODSKY: *Unstable molecules form stable tissues*. Proc Natl Acad Si USA, 99(3):1101–3, 2002.
- [109] PERTHES, G.: *Über die Wiederbefestigung des abgerissenen vorderen Kreuzbandes im Kniegelenk*. Zentralbl Chir, 53:866–827, 1926.
- [110] PETERSEN, W. und B. TILLMANN: *Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint*. Anat Embryol (Berl), 200(3):325–34, 1999.
- [111] PETERSEN, W. und B. TILLMANN: *Anatomy and function of the anterior cruciate ligament*. Orthopäde, 31(8):710–18, 2002.
- [112] PETERSON, L. und P. RENSTRÖM: *Verletzungen im Sport: Prävention und Behandlung*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 3 Auflage, 2002.
- [113] PETERSON, R. K., W. R. SHELTON und A. L. BOMBOY: *Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction: A 5-year follow-up*. Arthroscopy, 17(1):9–13, 2001.
- [114] PINCZEWSKI, L. A., A. J. CLINGELEFFER, D. D. OTTO, S. F. BONAR und I. S. CORRY: *Integration of hamstring tendon graft with bone in reconstruction of the anterior cruciate ligament*. Arthroscopy, 13(5):641–3, 1997.
- [115] PRUSS, A.: *Durchführung der Prüfung des Peressigsäure-Restgehaltes in allogenen avitalen Gewebetransplantaten*. SOP-Nr. GP-004/1, Institut für Transfusionsmedizin, Charité, 2001.
- [116] PRUSS, A., U. B. GÖBEL, G. PAULI, M. KAO, M. SEIBOLD, H.J. MÖNING, A. HANSEN und R. VON VERSEN: *Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue transplants—a reliable sterilization method*. Ann Transplant, 8(2):34–42, 2003.
- [117] PRUSS, A., C. PERKA, P. DEGENHARDT, U. MARONNA, K. BÜTTNER-JANZ, B. PAUL, K. MÜLLER, C. KLUMPP, J. C. BRUCK und R. VON VERSEN: *Clinical efficacy and compatibility of avital tissue transplants sterilized with a peracetic acid/ethanol mixture*. Cell and Tissue Banking, Seiten 235–243, 2002.
- [118] PUTZ, R. und R. PAPST: *Sobotta - Anatomie des Menschen*. Urban & Schwarzenberg, 1997.

- [119] RAPPÉ, M., M. HORODYSKI, K. MEISTER und P. A. INDELICATO: *Nonirradiated versus irradiated Achilles allograft: in vivo failure comparison*. Am J Sports Med, 35(10):1653–8, 2007.
- [120] RIECHERT, K., K. LABS, K. LINDENHAYN und P. SINHA: *Semiquantitative analysis of types I and III collagen from tendons and ligaments in a rabbit model*. J Orthop Sci, 6(1):68–74, 2001.
- [121] RIESLE, J., A. P. HOLLANDER, R. LANGER, L. E. FREED und G. VUNJAK-NOVAKOVIC: *Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks*. J Cell Biochem, 71(3):313–27, 1998.
- [122] RISPOLI, D.M., T.G. SANDERS, M.D. MILLER und W.B. MORRISON: *Magnetic resonance imaging at different time periods following hamstring harvest for anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy, 17(1):2–8, 2001.
- [123] ROBERTS, T. S., D. DREZ JR., W. MCCARTHY und R. PAINE: *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, 19(1):35–41, 1991.
- [124] ROBSON, A. M.: *Ruptured cruciate ligaments and their repair by operation*. Ann Surg, 37:716–718, 1903.
- [125] ROOS, H., M. ORNELL, P. GÄRDESELL, L. S. LOHMANDER und A. LINDSTRAND: *Soccer after anterior cruciate ligament injury—an incompatible combination? A national survey of incidence and risk factors and a 7-year follow-up of 310 players*. Acta Orthop Scand, 66(2):105–6, 1995.
- [126] ROSENBERG, L. S. und M. F. SHERMAN: *Meniscal injury in the anterior cruciate-deficient knee. A rationale for clinical decision-making*. Sports Med, 13(6):423–32, 1992.
- [127] RUBINSTEIN, R. A., JR., K. D. SHELBOURNE, C. D. VANMETER, J. C. MCCARROLL und A. C. RETTIG: *Isolated autogenous bone-patellar tendon-bone graft site morbidity*. Am J Sports Med, 22(3):324–7, 1994.
- [128] RUSHTON, N., D. J. DANDY und C. P. NAYLOR: *The clinical, arthroscopic and histological findings after replacement of the anterior cruciate ligament with carbon-fibre*. J Bone Joint Surg Br, 65(3):308–9, 1983.
- [129] SCHEFFLER, S. U., J. SCHERLER, A. PRUSS, R. VON VERSEN und A. WEILER: *Bio-mechanical properties of human bone-patellar tendon-bone autografts and allografts after sterilization with peracetic acid-ethanol*. Cell and Tissue Banking, 6:109–15, 2005.

- [130] SCHIEBLER, T.H., W. SCHMIDT und K. ZILLES: *Anatomie*. Springer Verlag, 7 Auflage, 1997.
- [131] SCHÜRCH, W., T. A. SEEMAYER und G. GABBIANI: *The myofibroblast: a quarter century after its discovery*. *Am J Surg Pathol*, 22(2):141–7, 1998.
- [132] SCHUTTE, M. J., E. J. DABEZIES, M. L. ZIMNY und L. T. HAPPEL: *Neural anatomy of the human anterior cruciate ligament*. *J Bone Joint Surg Am*, 69(2):243–7, 1987.
- [133] SCOTT, P. G. und A. VEIS: *The cyanogen bromide peptides of bovine soluble and insoluble collagens. I. Characterization of peptides from soluble type I collagen by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis*. *Connect Tissue Res*, 4(2):107–16, 1976.
- [134] SERINI, G. und G. GABBIANI: *Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation*. *Exp Cell Res*, 250(2):273–83, 1999.
- [135] SHELBOURNE, K. D. und J. H. WILCKENS: *Intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction in the symptomatic arthritic knee*. *Am J Sports Med*, 21(5):685–8, 1993.
- [136] SHELTON, W. R., L. PAPANDICK und A. D. DUKES: *Autograft versus allograft anterior cruciate ligament reconstruction*. *Arthroscopy*, 13(4):446–9, 1997.
- [137] SHINO, K., M. INOUE, S. HORIBE, J. NAGANO und K. ONO: *Maturation of allograft tendons transplanted into the knee. An arthroscopic and histological study*. *J Bone Joint Surg Br*, 70(4):556–60, 1988.
- [138] SHINO, K., T. KAWASAKI, H. HIROSE, I. GOTOH, M. INOUE und K. ONO: *Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogenic tendon graft. An experimental study in the dog*. *J Bone Joint Surg Br*, 66(5):672–81, 1984.
- [139] SHINO, K., T. KIMURA, H. HIROSE, M. INOUE und K. ONO: *Reconstruction of the anterior cruciate ligament by allogenic tendon graft. An operation for chronic ligamentous insufficiency*. *J Bone Joint Surg Br*, 68(5):739–46, 1986.
- [140] SIEBOLD, R., J. U. BUELOW, L. BOES und A. ELLERMANN: *[Primary- and revision-reconstruction of the anterior cruciate ligament with allografts: a retrospective study including 325 patients]*. *Zentralbl Chir*, 127(10):850–4, 2002.
- [141] SILVAGGIO, V. J., F. H. FU, H. I. GEORGESCU und C. H. EVANS: *The induction of IL-1 by freeze-dried ethylene oxide-treated bone-patellar tendon-bone allograft wear particles: an in vitro study*. *Arthroscopy*, 9(1):82–6, 1993.

- [142] SIMANK, H.G., J. GRAF, U. SCHNEIDER, B. FROMM und F.U. NIETHARD: [*Demonstration of the blood supply of human cruciate ligaments using the plastination method*]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.*, 133(1):39–42, 1995.
- [143] SIMONIAN, P. T., S. D. HARRISON, V. J. COOLEY, E. M. ESCABEDO, D. A. DENEKA und R. V. LARSON: *Assessment of morbidity of semitendinosus and gracilis tendon harvest for ACL reconstruction*. *Am J Knee Surg*, 10(2):54–9, 1997.
- [144] SKALLI, O. ET AL.: *Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes*. *J Histochem Cytochem*, 37(3):315–21, 1989.
- [145] SOMMERLATH, K., J. LYSHOLM und J. GILLQUIST: *The long-term course after treatment of acute anterior cruciate ligament ruptures. A 9 to 16 year followup*. *Am J Sports Med*, 19(2):156–62, 1991.
- [146] SPRÖSSIG, M. und H. MÜCKE: *Die Virusdesinfektion durch Peressigsäure in Gegenwart von Alkoholen*. *Wiss. Z. Humboldt-Univ., Math. -Nat. R.*, 18:1171–1173, 1969.
- [147] SPRÖSSIG, M., H. MÜCKE und C. TILGNER-PETER: *Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure*. *Pharmazie*, 22:517–519, 1967.
- [148] STARK, J.: *Two cases of ruptured crucial ligaments of the knee-joint*. *Med Surg (Edinburgh)*, 5:267–271, 1850.
- [149] STARKE, R., H. A. HACKENSELLNER und R. VON VERSEN: [*Experimental studies of the sterilization of transplantation material with peracetic acid*]. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe*, 17(5):254–8, 1984.
- [150] STEIN, K.H. und H. FLENKER: *Basiswissen Histologie und Zytologie*. Umschau Zeitschriftenverlag, 1998.
- [151] STEVENSON, S., G. A. DANNUCCI, N. A. SHARKEY und R. R. POOL: *The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs*. *J Bone Joint Surg Am*, 71(9):1297–307, 1989.
- [152] TOM, J. A. und RODE: *Soft tissue allografts for knee reconstruction in sports medicine*. *Clin Orthop Relat Res*, (402):135–56, 2002.
- [153] TOMASEK, J. J., G. GABBIANI, B. HINZ, C. CHAPONNIER und R. A. BROWN: *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(5):349–63, 2002.

- [154] TOMASEK, J. J., C. J. HAAKSMA, R. J. EDDY und M. B. VAUGHAN: *Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum*. Anat Rec, 232(3):359–68, 1992.
- [155] TOMITA, F., K. YASUDA, S. MIKAMI, T. SAKAI, S. YAMAZAKI und H. TOHYAMA: *Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-Patellar tendon-Bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy, 17(5):461–76, 2001.
- [156] TSUDA, E. ET AL.: *Direct evidence of the anterior cruciate ligament-hamstring reflex arc in humans*. Am J Sports Med, 29(1):83–7, 2001.
- [157] TUGWELL, B. D. ET AL: *Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor*. Ann Intern Med, 143(9):648–54, 2005.
- [158] UNTERHAUSER, F. N.: *Revaskularisierung und Nachweis von Myofibroblasten im freien Sehnentransplantat nach vorderem Kreuzbandersatz - Histologische 2-Jahres Untersuchung am Schaf-*. Zentrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Medizinische Fakultät - Universitätsmedizin Berlin, Seite 96, 2004.
- [159] VORLAT, P., R. VERDONK und G. ARNAUW: *Long-term results of tendon allografts for anterior cruciate ligament replacement in revision surgery and in cases of combined complex injuries*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 7(5):318–22, 1999.
- [160] WALLACE, M. P., S. M. HOWELL und M. L. HULL: *In vivo tensile behavior of a four-bundle hamstring graft as a replacement for the anterior cruciate ligament*. J Orthop R, 15(4):539–45, 1997.
- [161] WARREN, R. F.: *Meniscectomy and repair in the anterior cruciate ligament-deficient patient*. Clin Orthop Relat Res, (252):55–63, 1990.
- [162] WEILER, A.: *Anatomische „Hamstringsehnen“ Verankerung mit Interferenzschrauben beim Kreuzbandersatz*. Habilitationsschrift, 2002.
- [163] WEILER, A., S. SCHEFFLER und J. HOHER: *[Transplant selection for primary replacement of the anterior cruciate ligament]*. Orthopade, 31(8):731–40, 2002.
- [164] WEILER, A., F. N. UNTERHAUSER, H.-J. BAIL, M. HÜNING und N. P. HAAS: *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, 20(2):310–7, 2002.
- [165] WELSH, R. P.: *Knee joint structure and function*. Clin Orthop Relat Res, 147:7–14, 1980.

- [166] WIGGINS, M. E., P. D. FADALE, H. BARRACH, M. G. EHRLICH und W. R. WALSH: *Healing characteristics of a type I collagenous structure treated with corticosteroids*. Am J Sports Med, 22(2):279–88, 1994.
- [167] WILHELM, S.M. ET AL.: *Human fibroblast collagenase: glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis*. Proc Natl Acad Sci USA, 83(11):3756–60, 1986.
- [168] WILK, R. M. und J. C. RICHMOND: *Dacron ligament reconstruction for chronic anterior cruciate ligament insufficiency*. Am J Sports Med, 21:374–379, 1993.
- [169] WILLIAMS, I. F., K. G. MCCULLAGH und I. A. SILVER: *The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon*. Connect Tissue Res, 12(3-4):211–27, 1984.
- [170] YANG, L. ET AL.: *Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis*. Am J Pathol, 159(6):2147–57, 2001.
- [171] YASUDA, K. und K. HAYASHI: *Remodeling of tendon graft in ligament reconstruction*. In: HAYASHI, K., A. KAMIYA und K. ONO (Herausgeber): *Biomechanics: Functional adaptation and remodeling*, Seiten 213–250. Springer, Heidelberg, New York, 1997.
- [172] YASUDA, K., J. TSUJINO, Y. OHKOSHI, Y. TANABE und K. KANEDA: *Graft site morbidity with autogenous semitendinosus and gracilis tendons*. Am J Sports Med, 23(6):706–14, 1995.
- [173] YOSHIYA, S., M. NAGANO, M. KUROSAKA, H. MURATSU und K. MIZUNO: *Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction*. Clin Orthop Relat Res, (376):278–86, 2000.
- [174] ZOLTAN, D. J., C. REINECKE und P. A. INDELICATO: *Synthetic and allograft anterior cruciate ligament reconstruction*. Clin Sports Med, 7(4):773–84, 1988.

# 7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Andreas Weiler und bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Haas für die freundliche Überlassung des Themas bedanken.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Sven Scheffler, danke ich für das große entgegengebrachte Vertrauen, für die ausgezeichnete Betreuung in vielen Stunden gemeinsamer wissenschaftlicher Arbeit und für die umfangreiche Hilfe in allen Bereichen.

Auch Frau Karin Schlichting hat aufgrund ihrer ausgezeichneten Beratung in veterinärmedizinischen, wissenschaftlichen und organisatorischen Fragestellungen einen großen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt natürlich meinen Mitdoktoranden Tassilo Böhm, Johannes Gonnermann und Sebastian Metzloff für all die lustigen Stunden und die gemeinsame Bewältigung der schwierigen Momente während der letzten Jahre.

Der medizinisch-technischen Angestellten Frau Dorothea Przybilla danke ich für unendlich viel Einsatz und Hilfe beim aufwändigsten Teil meiner Untersuchungen. Frau Marzena Princ, Frau Camilla Bergmann, Herr Martin Wolny und Frau Gabriele Hardung sind ebenfalls eine sehr wertvolle Hilfe bei den Laborarbeiten gewesen.

Außerdem danke ich dem Doktoranden der Vorläuferstudie, Moritz Dustmann, der mir besonders zu Beginn des Projekts mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern Gisela und Prof. Dr. med. Hans-Dieter Kamp, bei meinen Brüdern Christian, Steffen und Martin sowie bei David für die liebevolle Unterstützung auf allen Ebenen, für offene Ohren und für Gedrängel. Ohne Steffen würde meine Dissertation wohl nicht so aussehen und ohne sie alle wäre ich vielleicht nie fertig geworden.

# 8 Lebenslauf

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

## 9 Publikationen

**Scheffler S. U., Gonnermann J., Kamp J., Przybilla D., Pruss A.:** *Remodeling of ACL allografts is inhibited by peracetic acid sterilization.* Clin Orthop Relat Res. 2008 Aug; 466(8):1810-8. Epub 2008 May 20.

Meeting Abstract

**Scheffler S. U., Kamp J., Gonnermann J., Schlichting K., Pruss A.:** *Die Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren inhibiert das Transplantatremodeling von Allografts als Ersatz des vorderen Kreuzbandes im Schafmodell.* Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2007, Berlin. German Medical Science GMS Publishing House, Oktober 2007.

# 10 Erklärung

Ich, Julia Evi-Katrin Kamp, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchung des frühen Bandremodelings von allogenen Bandtransplantaten als Ersatz des vorderen Kreuzbandes nach Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift