

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

DISSERTATION

**Ein neuer Ansatz bei der Sterilisation von allogenen
Sehnentransplantaten zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Gonnermann
aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. N. P. Haas
2. Prof. Dr. med. B.-D. Katthagen
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Pruß

Datum der Promotion: 18.09.2009

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	5
1.2 Modus der Kreuzbandverletzungen	6
1.3 Therapieoptionen	6
1.4 Überblick über das operative Vorgehen	7
1.5. Transplantatauswahl	8
1.5.1 Autografts	8
1.5.2 Allografts	9
1.6 Sterilisationsverfahren	11
1.6.1 Status Quo	11
1.6.2 Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren	13
1.7 Transplantatremodeling	13
1.8 Revaskularisierung	15
1.9 Biomechanik	16
2 PROBLEMSTELLUNG UND HYPOTHESEN	19
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Studiendesign	21
3.1.1 Versuchstiere	22
3.1.2 Tiermodell	23
3.1.3 Transplantatauswahl	23
3.1.4 Transplantatvorbehandlung	24
3.2 Tierversuch	26
3.2.1 Prämedikation, Narkose und Analgesie	26
3.2.2 Operation	26
3.2.3 Postoperativ	29
3.2.4 Probenentnahme: Tötung der Tiere und Explantation	30
3.3 Biomechanische Testung	30
3.3.1 Versuchsaufbau	30
3.3.2 Test-Protokoll	31
3.3.3 Messgrößen	33
3.3.4 Auswertung (EDV)	34
3.4 Histologische Untersuchungen	35
3.4.1 Probengewinnung und histologische Aufarbeitung	35
3.5 Konventionelle Färbungen	35
3.5.1 Deskriptive Auswertung	36
3.6 Immunhistologie	36
3.6.1 Theorie der Immunhistologie	36

3.6.2 von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII-Färbung	38
3.6.3 Quantitative Auswertung: von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII	39
3.7 Statistik	40
4 ERGEBNISSE	41
4.1 Vorbemerkung	41
4.2 Makroskopische Auswertungen.....	41
4.2.1 Standzeit 0 Wochen.....	41
4.2.2 Frühe Remodelingphase (Standzeit 6 Wochen)	41
4.2.3 Intermediäre Remodelingphase (Standzeit 12 Wochen)	42
4.3 Mikroskopische Auswertungen.....	43
4.3.1 Konventionelle Färbungen: Deskriptive Auswertung	43
4.3.2 Immunhistologie: Auswertung von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII	47
4.4 Biomechanik	54
4.4.1 PES-Allograft nach 6 Wochen	54
4.4.2 PES-Allograft nach 12 Wochen	57
5 DISKUSSION	63
5.1 Revaskularisierung	64
5.2 Biomechanik	65
5.3 Entzündungszeichen	67
5.4 Bezug zu anderen Ergebnissen der Arbeitsgruppe	68
5.5 Limitierungen der Studie	69
5.6 Schlussfolgerung und klinische Bedeutung.....	71
6 ZUSAMMENFASSUNG	72
7 LITERATURVERZEICHNIS	74
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	85
9 GLOSSAR.....	88
10 DANKSAGUNG	89
11 PUBLIKATIONEN	90
12 CURRICULUM VITAE.....	91
13 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	93

1 Einleitung

1.1 Stellenwert der Kreuzbandverletzungen

Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes (VKB) ist die häufigste Bandverletzung des menschlichen Kniegelenkes mit einer geschätzten Inzidenz in den Industriestaaten von 1:1000 bis 1:3500 Einwohner pro Jahr [108, 148]. Eine Kreuzbandinsuffizienz führt in dem überwiegenden Anteil der Patienten zu einer chronisch funktionellen Knieinstabilität und konsekutiv zu beschleunigten degenerativen Veränderungen von weiteren Knieinnenstrukturen im Rahmen einer Früharthrose [57, 62, 81, 84, 170]. Im Gegensatz zu anderen Bandstrukturen des Knies wie z.B. den Kollateralbändern [74] zeigt das rupturierte VKB eine allenfalls geringe Heilungsrate [89] und wird daher bei Insuffizienz gemäß aktueller Leitlinien primär operativ versorgt [44].

In den USA, dem Land mit der weltweit größten Anzahl an Kreuzbandoperationen, beläuft sich diese auf mehr als 300.000 Eingriffe jährlich [178]. In Deutschland ist die Kreuzbandersatzplastik mit ca. 14.000 Operationen pro Jahr die am häufigsten durchgeführte bandplastische Operation am Bewegungsapparat und hat dementsprechend eine nicht unerhebliche volkswirtschaftliche Bedeutung bekommen [191]. Das autologe, freie Patellarsehndrittel mit zwei Knochenblöcken gilt auf Grund seiner schnellen, ossären Verankerung noch in den meisten Kliniken als sog. „Golden Standard“. Allerdings konnten sich die autologen Sehnen des Pes anserinus (engl. *hamstring*), insbesondere die Semitendinosus- und Gracilissehne, als Transplantatalternative im letzten Jahrzehnt auf Grund der geringeren Entnahmemorbidität und verbesserter Fixationstechniken verstärkt durchsetzen.

Es konnte jedoch eindeutig belegt werden, dass die Entnahme autologen Gewebes mit einer Morbidität im Sinne u.a. der Schwächung des Streck- (Patellarsehne) bzw. Beugeapparates (Hamstringsehnen) verbunden ist, die noch bis zu einem Jahr postoperativ nachweisbar ist [137, 146]. Eine Alternative stellen allogene Kreuzbandtransplantate verstorbener Organspender mit den Vorteilen der fehlenden Transplantatentnahmemorbidität, der Instandhaltung des Streck- und Beugeapparates des Kniegelenkes und einer somit geringeren postoperativen Bewegungseinschränkung, der beliebigen Dimensionierung des Transplantates und einer Verkürzung der Operationszeit dar [92]. Allerdings steht diesen Vorteilen der große Nachteil des potentiellen Infektionsrisikos gegenüber. Um diesem zu entgegnen, wurden verschiedene Sterilisationsverfahren entwickelt. Jedoch existiert bis dato kein Sterilisationsverfahren, welches einen kompletten Schutz vor Kontamination und Infektion bei Erhaltung der initialen biomechanischen Eigenschaften und ohne Beeinträchtigung der Biologie des Transplantates

liefert. Ein weiterer Nachteil besteht in der geringen Transplantatverfügbarkeit. In Europa übersteigt heutzutage die Nachfrage nach Allografts bei Revisionseingriffen und multiplen Bandverletzungen bei weitem das Angebot [105].

1.2 Modus der Kreuzbandverletzungen

Das häufigste Verletzungsmuster ist das sogenannte Valgus-Rotations-Trauma. Dabei kann das Trauma entweder durch direkte/externe Krafteinleitung, z.B. als Schlag auf das Kniegelenk oder den Unterschenkel, oder häufiger durch indirekte/interne Krafteinwirkung, wie sie vor allem bei abrupten Bremsbewegungen mit Drehung des Oberkörpers über das fixierte Bein auftreten, erfolgen.

Beim sehr häufig auftretenden Flexions-Valgus-Außenrotationstrauma kommt es zuerst zu einem Zerreißen des medialen Kapselbandapparates. Wirkt die Kraft weiter fort, reißt auch das VKB. Häufig kombiniert ist dieser Unfallmechanismus mit einer medialen Meniskusläsion und wird dann nach O'Donoghue als "unhappy triade" bezeichnet [115].

Eine mögliche Ursache für eine isolierte vordere Kreuzbandverletzung ist die Hyperextension im Kniegelenk mit ausgeprägter, plötzlicher Innenrotation des Unterschenkels und gleichzeitiger Bremsung der Vorwärtsbewegung oder die direkte dorsale Krafteinwirkung auf die Tibia bei fixiertem Fuß im Sinne einer anterioren Tibiatranslation [87, 90].

Knieverletzungen gehören zu den häufigsten Sportverletzungen, wobei bestimmte Sportarten als besonders verletzungsintensiv für das VKB einzustufen sind. Die Klassifizierung der sportspezifischen Kniebelastung nach dem Innsbruck Knee-Sports Rating Scale [56] erfolgt in high-risk-pivoting Sport (Fußball, Handball, Basketball, Squash, Tennis, Ski alpin), low-risk-pivoting Sport (Skilanglauf, Bergwandern, Joggen, Klettern, Volleyball, Aerobic) und no-risk-pivoting Sport (Radfahren, Schwimmen).

1.3 Therapieoptionen

Der aktuelle Stand der Diagnostik und Behandlung der VKB-Ruptur spiegelt sich in der S1-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft wieder (AWMF) [44]. Konservative Therapie oder vordere Kreuzband-Plastik mit autologem (körpereigenem) oder allogenen (homologem) Gewebe stellen dabei die gesamte Bandbreite an Therapiemöglichkeiten bei VKB-Ruptur bzw. -Insuffizienz dar.

Die Indikation zur Operation ist abhängig vom Status der Knieinstabilität, dem Alter des Patienten, dem angestrebten Aktivitätsniveau und der Art der Verletzung (komplette oder inkomplette Ruptur, isolierte oder kombinierte Verletzung). Allen Patienten mit ausgeprägter

Knieinstabilität und höherem körperlichem Anspruchsniveau muss dringend zu einem Ersatz des vorderen Kreuzbandes geraten werden [44]. Eine komplette Ruptur des VKB resultiert bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten in einer objektiv messbaren translatorischen und rotatorischen Knieinstabilität [9, 18, 20]. Die Folge ist eine erhöhte Inzidenz von Meniskusläsionen und degenerativen, arthrotischen Gelenkveränderungen [52, 62, 81, 84]. Besonders bei häufig auftretenden Kombinationsverletzungen mit Beteiligung der Menisken oder weiterer Bandstrukturen ist das Auftreten von einer posttraumatischen Früharthrose signifikant erhöht [32, 52, 86, 186]. Allerdings konnte die Verminderung degenerativer Veränderungen durch eine Kreuzbandplastik in Langzeitstudien bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden [15, 62, 170]. Jedoch wurde im Vergleich zur konservativen Versorgung eine signifikant höhere langfristige Kniestabilität bei zeitlich verzögertem Auftreten einer Arthrose beobachtet [20, 33].

Die Indikation für eine konservative Therapie besteht, wenn klinische und instrumentelle Tests (Lachman, Pivot-Shift, KT-1000/2000) keine erhebliche mechanische Instabilität des Knies aufweisen, der Patient keine funktionelle Instabilität bei alltäglicher Belastung verspürt und von körperlichen Belastungen absehen werden kann, die die Stabilität des Kniegelenkes gefährden könnten. Hierbei versucht man, durch entsprechendes Kraft- und Koordinationstraining der Beinmuskulatur das Kniegelenk wieder zu stabilisieren. Allerdings muss für diesen Therapieansatz selbst bei guter funktionell-muskulärer Stabilität eingeräumt werden, dass die Arthrokinematik verändert ist und stärkere Belastungen für die erhaltenen Strukturen (Menisken, Knorpel) mit einer konsekutiv erhöhten Inzidenz an degenerativen Veränderungen die Folge sind [20, 33]. Häufig ist eine operative Rekonstruktion des Kreuzbandes auf längere Sicht erforderlich [174].

Auf Grund verbesserter Rekonstruktionstechniken und der ungünstigen Langzeitprognose ist die konservative Therapie somit in den letzten Jahren immer mehr in den Hintergrund getreten [43, 71, 84, 106, 160].

1.4 Überblick über das operative Vorgehen

Der Ersatz des VKB mit freien Sehnentransplantaten ist die am häufigsten durchgeführte bandplastische Operation am Bewegungsapparat [191].

Die heute bestehenden Rekonstruktionstechniken sind Konsequenz einer Entwicklung der letzten 100 Jahre. Gegen die damalige Auffassung, die konservative Therapie als Methode der Wahl bei Kreuzbandverletzungen zu akzeptieren, setzte M. Robson am Leeds General Infirmary im Jahre

1895 den Startpunkt der Kreuzbandchirurgie, indem er eine akute Kreuzbandruptur eines Bergarbeiters mittels Catgut im Sinne einer Primärnaht versorgte und das erfolgreiche Ergebnis 8 Jahre später veröffentlichte [140]. Die primäre Bandnaht wurde vor allem im Falle einer akuten Ruptur bis in die Mitte der 70er Jahre empfohlen, bis Studien die enttäuschenden Langzeitergebnisse mit einer Versagerrate von bis zu 50% aufdeckten [48, 51, 117].

Heutzutage gelten die VKB-Rekonstruktionen aus autologem Band- bzw. Sehngewebe mit dem Patellarsehndrittel (mittleres und seltener mediales oder laterales Drittel) [28, 31], mit den Sehnen des Pes anserinus/Hamstringsehnen (Semitendinosussehne teilweise kombiniert mit Gracilissehne) [37, 95, 99] und mit dem zentralen Anteil aus der Quardizepssehne [60, 172] als die am häufigsten verwendeten Techniken [191].

1.5. Transplantatauswahl

1.5.1 Autografts

Über viele Jahre hat sich der VKB-Ersatz mit dem autologen, mittleren Drittel des Lig. patellae (8-11 mm Sehnenbreite) unter Mitnahme zweier endständiger Knochenblöcke aus Tibia und Patella (bone patellar tendon bone, BPTB) als allgemein akzeptierter "Golden Standard" bewährt. Die immer wieder angeführten Vorteile dieses Transplantats sind die gute maximale Reißfestigkeit der Sehne, je nach Literatur und getesteter Sehnenbreite etwa zwischen 1700 und 2900 N [41, 114, 173, 195], die Möglichkeit einer primär stabilen Fixierung mit Interferenzschrauben und die zuverlässige Knochen-Knochen-Einheilung im Bohrkanal [122, 155, 179]. Als nachteilig sind die erhöhten Komplikationen im Rahmen der Entnahmemorbidität (donor site morbidity) wie Schwächung des Knie-Streckapparates [143, 146], Verkürzung der verbleibenden Patellarsehne mit postoperativem Streckdefizit [79, 110], femoropatellare Schmerzen und Krepitation [1, 48] sowie Schmerzpersistenz an den Entnahmestellen besonders beim Hinknien anzumerken [85]. Diese Symptome lassen sich unter dem Begriff „vorderer Knieschmerz“ zusammenfassen. Sehr selten bestehen Risiken einer Patellarfraktur [38] oder Patellarsehnenruptur [21, 118]. Für viele dieser Probleme wird die Verletzung des Hoffa'schen Fettkörpers mit anschließend narbiger Kontraktur und Fibrose verantwortlich gemacht. Bei reduzierter Mobilität der Patellarsehne und Adhärenz an der Tibiavorderkante kann es bis zum infrapatellären Kontraktur-Syndrom mit einer Prädisposition zur Arthrose kommen [79, 120].

Für die Technik mit den autologen Hamstringsehnen spricht, dass die üblicherweise benutzten, mehrsträngigen Sehnentransplantate der Mm. semitendinosus et gracilis über eine sehr hohe initiale Zugfestigkeit von ca. 240-280% des VKB verfügen [69, 138]. Vorteilhaft ist außerdem

die geringe Entnahmemorbidity und die besseren kosmetischen Ergebnisse auf Grund des kleineren Hautschnitts von ca. 2,5-3 cm Länge [198]. Es entsteht kein zusätzliches Trauma für den Streckapparat des Kniegelenkes und es kommt nicht zu der von der Patellarsehne berichteten Entnahmedefekt-Arthropathie [176]. Jedoch wird eine Verminderung der Kraft der ischiokruralen Muskulatur als wichtiger Agonist des VKB sowie die Störung der Innenrotation durch die Entnahme der Semitendinosussehne in Kombination mit der Gracilissehne kritisch diskutiert [181]. Allerdings besitzen die Hamstringsehnen die Fähigkeit zur kompletten strukturellen Regeneration, wodurch die postoperative Kraft- und Funktionseinschränkung der Hamstringmuskulatur ungefähr nach 3-4 Monaten wiederkehrt [42, 96, 137, 198]. Durch moderne Verankerungstechniken wie biodegradierbare Interferenzschrauben [102, 193], Endopearls [190], und Transfixationssysteme [39] konnte der anfängliche Schwachpunkt dieser Rekonstruktionstechnik, die im Vergleich zur schnellen, direkten Knochen-Knochen-Einheilung der BPTB-Transplantate langsamere ossäre Integration der Sehnen-Knochen-Einheilung der Hamstringsehnen, weitgehend behoben werden [187, 188].

In retrospektiven sowie prospektiv randomisierten Studien wurden keine funktionellen Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden, jedoch weniger Beschwerden durch die geringere Entnahmemorbidity in der Hamstring-Gruppe [104, 126, 127, 142, 149, 185].

Eine weitere Transplantatalternative ist die Quadrizepssehne. Sie wird erst seit kurzem und vergleichsweise selten genutzt. Die Quadrizepssehne kann mit einem Knochenblock aus dem superioren Patellapol entnommen werden. Obwohl die Entnahmemorbidity in den wenigen Studien geringer als bei der Patellarsehne scheint, führt die Explantation ebenfalls zur Schwächung des Streckapparates und zu schlechteren kosmetischen Ergebnissen im Vergleich zu den Hamstringsehnen [35, 36, 65, 94].

1.5.2 Allografts

In der Historie wurden Allografts primär bei Revisionseingriffen und multiplen Bandverletzungen eingesetzt [183]. Mittlerweile werden sie aber auch als primärer VKB-Ersatz [45], als hintere Kreuzband (HKB)-Plastik [23] sowie als Ersatz des medialen und lateralen Kollateralbandes [22, 113] verwendet. Als Allografts dienen vor allem Sehnen mit Knochenblöcken (Patellar-, Achilles- und Quadrizepssehne) aber auch knochenblockfreie Sehnentransplantate (Hamstringsehnen, Sehnen des Tibialis anterior bzw. posterior, Fascia lata) [4, 163]. Wobei die biomechanischen Eigenschaften und Unterschiede der einzelnen Allografts denen der Autografts ähneln.

Der primäre Vorteil der Allografts gegenüber den Autografts ist die fehlende Transplantatentnahmemorbidität. Hieraus ergeben sich sekundäre Vorteile wie eine kürzere Rehabilitationszeit durch Verringerung der Invasivität des operativen Eingriffs bzw. der Instandhaltung des Streck- und Beugeapparates des Kniegelenkes und eine somit geringere postoperative Bewegungseinschränkung. Des Weiteren sind eine Verkürzung der Operationszeit und eine beliebige Dimensionierung des Transplantates zu verzeichnen [92]. Klinische Studien liefern allerdings eine kontroverse Datenlage. Einerseits werden die klinischen Resultate und biomechanischen Eigenschaften der Allografts bei Revisionseingriffen und komplexen Knieinstabilitäten und sogar beim primären Einsatz als sehr gut [14] und zu den Autografts als nicht signifikant unterschiedlich beschrieben, der Einsatz der Allografts auf Grund der genannten Vorteile wird sogar empfohlen [92, 93, 125, 165-167]. Andererseits wird von einem verlängerten Remodelingprozess [75, 88], einem potentiellen Infektions- und Kontaminationsrisiko [24, 80], einer nicht auszuschließenden Immunreaktion des Empfängers auf das allogene Material [75], einer erhöhten Laxizität und von einer leicht erhöhten Rerupturrate ausgegangen [34, 66, 128, 163].

Während in der Vergangenheit die Verwendung der Allografts von den meisten Autoren insbesondere bei Revisionseingriffen und multiplen Bandverletzungen des Kniegelenkes im Sinne eines „Salvage“-Verfahrens, bei dem die Nachteile der Allografts auf Grund des Mangels an Autografts akzeptiert werden, propagiert wurde [58, 168, 183], ist es hier in den letzten Jahren vor allem im angloamerikanischen Raum zu einem Paradigmenwechsel gekommen. Im Jahre 2005 wurden in den USA bei 20% aller VKB-Rekonstruktionen Allografts verwendet [178]. Entsprechend hatte sich das Angebot an muskuloskeletalen Transplantaten von 350.000 im Jahre 1990 auf 875.000 im Jahre 2001 mehr als verdoppelt [83]. In Deutschland muss jedoch von einer geringeren Rate ausgegangen werden. Aktuelle Befragungen gehen von einer Nutzung von Allografts in ca. 1-2% aller Rekonstruktionen des vorderen Kreuzbandes aus [105]. Die Gründe liegen vor allem am substantiell niedrigen Angebot an allogenen Bandtransplantaten durch Gewebebanken, an der geringen Spendebereitschaft in Deutschland, am Fehlen von kommerziellen Spenderbanken, sowie rechtlichen, die Nutzung von Spendergewebe einschränkenden, Auflagen in Europa. Auch der Bezug von Gewebe aus dem Ausland ist kostenintensiv und derzeit nur sehr eingeschränkt möglich.

Der Einsatz von Spendergewebe soll durch das neue Artikelgesetz vom 01.08.2007 (Umsetzung der EU-Richtlinien 2004/23/EG, 2006/17/EG und 2006/86/EG), bei dem allogenes Gewebe dem Arzneimittelgesetz untergeordnet wird, erleichtert werden [30]. Das Gesetz enthält u.a. die Festlegung von Sicherheits- und Qualitätsstandards für die Spende, Beschaffung, Verarbeitung,

Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen. Mittelfristig kann also davon ausgegangen werden, dass es im europäischen Raum zu einer erheblichen Zunahme der Nutzung von Spendergewebe in der rekonstruktiven Versorgung von Bandverletzungen am Bewegungsapparat der Menschen kommen wird.

1.6 Sterilisationsverfahren

1.6.1 Status Quo

Die potentielle Infektions- und Kontaminationsgefahr durch Bakterien, Pilze und Viren ist das Hauptargument der Kritiker gegen die Nutzung von allogenen Bandgewebe. Um dieser Gefahr zu entgegnen wurden im Laufe der Jahre diverse Sterilisationsverfahren entwickelt.

Neben der reinen Konservierung von allogenen Sehnen- und Bandtransplantaten durch Tiefkühlung bei -70° bis -80°C , durch Kryopräservierung bzw. -konservierung mittels flüssigem Stickstoff oder durch Gefriertrocknung mit einer Restfeuchte unter 5-6% existieren verschiedene Verfahren, die einer Kontamination oder Infektion des zu transplantierenden Gewebes vorbeugen sollen [177]. Die Sterilisation mit γ -Bestrahlung und die chemische Vorbehandlung mit Ethylenoxid (EO) nahmen neben dem Schutz vor oberflächlicher Kontamination durch antiseptische (Alkohole) oder antibiotische Lösungen in den 90er Jahren einen besonderen Stellenwert ein. Jedoch wurden im Zusammenhang mit dem Einsatz von EO und seiner Abbauprodukte (Ethylenchlorhydrin) verschiedene Nebenwirkungen wie Entzündungs- und Immunreaktionen mit resultierenden chronischen Synovitiden beobachtet, so dass der Einsatz von EO heutzutage als obsolet gilt [76, 139, 169]. Ferner konnte in Studien gezeigt werden, dass bei der γ -Bestrahlung ein ausreichender bakterieller und vor allem viraler Infektionsschutz erst bei Strahlendosen von über 4 Mrad (40.000 Gy) gewährleistet ist [55, 130]. Allerdings führt eine Strahlendosis oberhalb von 2 Mrad (20.000 Gy) zu einer signifikanten Reduktion der biomechanischen Eigenschaften von Band- und Sehngewebe [54, 55, 139].

Auf Grund dieser Nebenwirkungen wird heutzutage von vielen Autoren im angloamerikanischen Raum die Verwendung steril entnommener, engmaschig „gescreenter“, konservierter aber eben nicht „sekundär-sterilisierter“ Allografts empfohlen. Die Konservierung kann dabei zwar die antigenwirksame Oberflächenstrukturen (major histocompatibility class II) des Allografts zerstören und somit eine Immunantwort des Empfängers unterdrücken [13], aber nur eine partielle Abtötung von Bakterien und Viren, im besonderen HIV-1 und -2 sowie Hepatitis-B- und -C-Virus (HBV, HBC), gewährleisten. Kryopräservierung zeigt als Alternative keinen

1.6.2 Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren

Das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren ist ein etabliertes und kostengünstiges Sterilisationsverfahren bei allogenen Knochentransplantaten mit einem adäquaten antibakteriellen, antimykotischen und antiviralen Schutz [133, 182]. In den achtziger Jahren eingeführt [171], wurden mit Peressigsäure (PES, $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$) und Ethanol bis heute mehr als 60.000 allogene Knochentransplantate sterilisiert [131]. Mehrere Studien belegen die ausreichende Wirksamkeit und Sicherheit des Verfahrens und konnten keinen nachteiligen Effekt auf die strukturellen und biomechanischen Eigenschaften der Transplantate nachweisen [132, 133]. Der virale Schutz bestätigte sich ebenfalls bei der Sterilisation von Weichteiltransplantaten wie Achillessehne, Knorpel und Haut [152]. Des Weiteren konnten Scheffler et al. in einer in-vitro Studie keine Beeinträchtigung der Struktur- und Materialeigenschaften von humanen BPTB-Allografts nach Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren nachweisen [153]. Ferner zeigte PES in einer weiteren in-vitro Studie keinen zytotoxischen noch pro-inflammatorischen Effekt auf humane Patellarsehnen-Allografts [98]. Bis dato existiert jedoch keine in-vivo Studie, die den Effekt der PES auf das Transplantatremodeling allogener Band- und Sehnen transplantate untersucht hat.

1.7 Transplantatremodeling

Allografts durchlaufen ebenso wie Autografts beim Kreuzbandersatz einen typischen Einheilungs- und Umbauprozess, der die Phasen der Nekrose, der Revaskularisierung, der Fibroblastenproliferation und der Kollagensynthese umfasst.

Bereits 1905 wurde von Wilhelm Roux die Theorie der funktionellen Adaptierung eines Organs in Folge einer quantitativen oder qualitativen Funktionsänderung beschrieben [145]. Amiel et al. berichteten erstmals 1986 aufbauend auf ihrer Erkenntnis, dass sich Band- und Sehngewebe strukturell, biochemisch und histologisch unterscheiden [6], am Kaninchenmodell über die Metamorphose eines freien, autogenen Sehnen transplantates (BPTB) 30 Wochen nach VKB-Ersatz zu einem bandähnlichen Gewebe [7]. Sie nannten diesen Prozess „Ligamentisierung“ und führten ihn als funktionelle Adaptation des Transplantates auf die veränderten mechanischen Kräfte und das synoviale Milieu zurück. Dieser Prozess wurde 1990 von Bosch aufgegriffen, mit einem neuen Begriff dem „Remodeling“ versehen und ausführlich beim autogenen HKB-Ersatz mittels Patellarsehnen transplantat im Schafsmodell beschrieben [25]. Dabei werden grundsätzlich drei ineinander übergehende Phasen unterschieden.

In der initialen Degenerationsphase findet eine partiell ischämische Nekrose des freien, avaskulären Transplantates statt, welche die biomechanischen und viskoelastischen Eigenschaften zunehmend reduzieren. Es kommt peripher zur Invasion eines zell- und gefäßreichen Granulationsgewebes mit Entzündungszellen wie Monozyten, Leukozyten und Makrophagen, welche Zytokine und Wachstumsfaktoren produzieren. Im Transplantatzentrum dominieren Nekrosen mit Zell- und Strukturverlust.

Die Revitalisierungsphase ist durch eine überschießende Zellproliferation (Hyperzellularität) und Revaskularisierung ausgehend von einer neugebildeten Synovialhülle und vom Hoffa'schen Fettkörper von peripher nach zentral charakterisiert [72]. Außerdem kommt es zum Organisationsverlust und Umbau der Extrazellulärmatrix. Die Zunahme des Kollagengehaltes vom Typ III, sowie ein Anstieg an Fibronectin und Glycosaminoglykanen typisieren die reparativ-proliferativen Prozesse. Bosch et al. fanden 6-8 Wochen postoperativ die geringste Zugfestigkeit und Elastizität des VKB-Transplantates [27].

In der finalen Remodelingphase reorganisiert sich die Extrazellulärmatrix. Es kommt zur Abnahme an Kollagen Typ III und Fibronectin sowie zu einer zunehmenden Längsorientierung der Kollagenfaserbündel. Auch die Zellularität normalisiert sich. Am Ende der Phase findet sich ein dem nativen vorderen Kreuzband ähnelndes Bandgewebe mit ähnlichen biomechanischen Eigenschaften.

Später wurde das Remodeling ebenfalls bei autologen VKB-Transplantaten am Menschen nachgewiesen [49, 64, 72, 144]. In Korrelation mit klinischen Beobachtungen und Untersuchungen wird heute von ca. 12 Monaten für das Remodeling autologer Transplantate nach VKB-Ersatz beim Menschen ausgegangen [49]. Bei Allografts scheint hingegen das Remodeling leicht verzögert abzulaufen [59, 154, 196]. Nach Abschluss des Umbauprozesses zeigen jedoch beide Transplantattypen identische histologische und biomechanische Befunde [77].

Für die Langzeitstabilität der VKB-Rekonstruktion spielen hierbei vor allem die biologischen Umbauvorgänge in den ersten drei Monaten eine große Bedeutung, da 6-12 Wochen nach Implantation der Einbau des Transplantates in den umgebenden Knochen abgeschlossen ist und die primäre Stabilität nicht mehr von den mechanischen Eigenschaften der Verankerung, sondern von den biologischen Eigenschaften des einheilenden Transplantates abhängt [187, 188]. Der größte Teil des Remodelingprozesses spielt sich zudem in den ersten 12 Wochen ab [180].

1.8 Revaskularisierung

Die Revaskularisierung bzw. Angiogenese ist die Grundvoraussetzung des Remodeling und des Langzeitüberlebens eines freien, avitalen und avaskulären Sehnentransplantates ohne synoviale Oberfläche [3, 12, 180]. Nach anfänglich reiner Nutrition durch Permeation der synovialen Flüssigkeit wachsen aus dem periligamentären bzw. peritransplantärem Bindegewebe (Hoffa'scher Fettkörper, neugebildete synoviale Hülle) Kapillaren [12], welche durch Fibroblasten exprimierte Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) [121] stimuliert werden, in die Außenzone des Transplantates und gewährleisten die wichtige Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Dieser Prozess schreitet von peripher nach zentral weiter fort. Vorübergehend ist das Transplantat im Vergleich zum nativen Kreuzband hyperzellulär und hypervaskularisiert. Unterhauser et al. [180] fanden in immunhistochemisch angefärbten Querschnitten von Autografts im Schafsmodell eine maximale Gefäßdichte im subsynovialen, peripheren Bereich 6 Wochen nach Operation sowie intermediär und zentral entsprechend später in der 12. postoperativen Woche. Im weiteren Verlauf nahm die Gefäßdichte wieder ab und der Gefäßstatus glich dem nativen VKB nach ca. 24 Wochen.

Dustmann et al. fanden im Schafsmodell bei der Revaskularisierung von unsterilisierten, allogenen VKB-Transplantaten einen analogen Remodelingprozess mit einer jedoch zeitlich verzögerten Dynamik [46].

Andere tierexperimentelle Studien wiesen bei Kreuzbandplastiken allerdings nur eine begrenzte bzw. gar keine Revaskularisierung nach und gehen von einer reinen Versorgung mittels Diffusion der synovialen Flüssigkeit aus [5, 78, 164]. Diese kontroversen Aussagen lassen sich durch die Verwendung unterschiedlicher Studiendesigns mit unterschiedlichen Techniken und damit unterschiedlicher Sensitivität der Gefäßdarstellung erklären. Techniken wie Tuscheinjektion, Spalteholztechnik und Kontrastmitteln sind in ihrer Sensitivität in der Darstellung des endoligamentären Kapillarnetzwerkes auf ihre Partikelgröße und Perfusionskapazität limitiert und vermögen nur Gefäße bis zur Arteriole oder Venole sicher nachzuweisen [123, 180]. Die Laser-Doppler-Flowmetrie ist eine elegante nicht-invasive Methode, welche aber nur den oberflächlichen Blutstrom mit einer maximalen Eindringtiefe von 250 μm messen kann. Unterhauser et al. benutzten 2002 einen polyklonalen Faktor VIII/von-Willebrand-Faktor-Primärantikörper zur gezielten Markierung von Endothelzellen neugebildeter Gefäßkapillaren. Im Gegensatz zur ebenfalls häufig zum Gefäßnachweis eingesetzten immunhistochemischen Markierung von α -smooth-muscle Aktin in glatten Gefäßmuskelzellen ermöglicht sie sogar die Detektion kleinster Kapillaren ohne glatte Muskelzellen und stellt

besonders bei der Darstellung der frühen auf kapillärer Ebene stattfindenden Revaskularisierung die Methode der Wahl dar [180].

1.9 Biomechanik

Die Funktion des Kniegelenkes ähnelt dem Modell einer überschlagenen Viergelenksskette, in dem die Kreuzbänder die Gelenkstangen darstellen. Die Gelenkstangen sind in 40° zueinander an beiden Enden beweglich aufgehängt und sorgen durch die Position ihrer Verankerung und bei kongruenter Knochenform von Tibia und Femur für den ungehinderten Ablauf der physiologischen Roll-Gleit-Bewegung des Kniegelenks [97, 107]. Die Hauptfunktion des vorderen Kreuzbandes ist die Führung und Stabilisierung des Kniegelenks bei Translationsbewegungen der Tibia nach anterior bzw. des Femur nach posterior [150]. Die Spannungszustände der einzelnen Faserbündel des VKB verändern sich dabei nicht einheitlich, sondern individuell. Die Faserverlaufsrichtung ist im Gegensatz zum Sehngewebe nicht parallel sondern scherengitterartig gekreuzt. Die Kollagenstrukturen verhalten sich dabei viskoelastisch, d.h. bei schneller (Stoss-)Belastung verhält sich das Band steifer als bei langsamem Belastungsanstieg, die biomechanischen Eigenschaften sind somit abhängig von der Frequenz der Krafteinwirkung und von der Geschwindigkeit des Stressmoments [61]. Funktionell lassen sich beim Erwachsenen ein anteromediales Bündel (AMB) und ein posterolaterales Bündel (PLB) unterscheiden [116, 123]. Ein histologisches Korrelat, wobei die Bündel durch ein deutlich ausgebildetes Septum von einander getrennt werden, konnte allerdings nur beim Feten nachgewiesen werden [53]. In Streckung und Überstreckung sind alle Fasern des VKB gespannt und verlaufen nahezu parallel, wobei das posterolaterale Bündel primärer Stabilisator ist [124, 150]. Mit zunehmender Flexion im Kniegelenk verschiebt sich die femorale Insertionszone des AMB nach dorsal. Das AMB spannt sich, während das PLB um dieses rotiert und sich durch die Verlagerung seiner femoralen Ansatzzone nach ventral entspannt [199]. Somit ist das AMB primärer Stabilisator bei postero-anteriorer Tibiatranslation, wohingegen das PLB in der Endphase der Streckung (Schlussrotation) das Kniegelenk sekundär gegen extreme Rotationsbewegungen (Innenrotation > Außenrotation) stabilisiert. Die primäre Rotationssicherung erfolgt in erster Linie durch Kollateralbänder, Menisci und die Kapsel [68]. Das Ziel einer Kreuzbandplastik sollte darin bestehen biomechanische Eigenschaften aufzuweisen, die dem intakten Kreuzband vergleichbar sind. Dabei können die biomechanischen Eigenschaften wie Steifigkeit, Elongation und Versagenslast durch Materialtestmaschinen ermittelt werden. Die maximale Versagenslast besagt bei welcher Spitzenlast die

Transplantatfixation versagt. Sie charakterisiert die Mechanik der Fixation jedoch nur unvollständig und wenig realitätsnah, da diese Last im Rahmen der Rehabilitation in der Regel nicht erreicht wird. Viel wichtiger ist die Beurteilung der Transplantatfixation im submaximalen Lastbereich. Die lineare Steifigkeit in simulierten Schubladentests gibt an, um welche Strecke sich die Fixation unter einer bestimmten Last elastisch bzw. reversibel elongiert. Sie wird in N/mm angegeben. In biomechanischen Testungen zeigte sich eine höhere lineare Steifigkeit bei direkten, gelenknahen (anatomischen) Transplantatverankerungen gegenüber den gelenkfernen, indirekten Fixationen [155]. Die Elongation in mm beschreibt die Laxizität bzw. Auslenkung des Transplantates unter einer bestimmten Zugkraft.

Im intakten vorderen Kreuzband wird von einer maximalen Versagenslast von ca. 2000 N bei einer Steifigkeit von 242 ± 28 N/mm ausgegangen [151, 197]. Dies entspricht in etwa den biomechanischen Eigenschaften einer 10 mm breiten Patellarsehne (maximale Versagenslast 1784 ± 580 N, Steifigkeit 210 N/mm) und einer 4-strängigen Hamstringsehne (maximale Versagenslast 2422 ± 538 N, Steifigkeit 238 N/mm) [195].

Basierend auf Untersuchungen von Arnoczky et al. [10] unterliegt jedes Transplantat einer Phase des Umbaus (Transplantatremodeling siehe Kapitel 1.7), in dem es bis zu 60% seiner initialen Belastbarkeit verliert. Damit das Transplantat seiner funktionellen Aufgabe im weiteren Verlauf gerecht wird, bedarf es jedoch in der Phase des Remodeling trotzdem einer adäquaten mechanischen Belastung, damit die histologischen Eigenschaften des Sehnengewebes ausgebildet werden [8]. Eine Immobilisation des operierten Kniegelenkes nach Kreuzbandersatz würde hingegen den Verlust der Elastizität und der Belastbarkeit von Sehnengewebe bewirken [112]. Die heutzutage etablierte, forcierte frühfunktionelle Nachbehandlung führt zu einer sofortigen erhöhten mechanischen Beanspruchung sowohl für das Transplantat als auch für die Fixation [162].

Erste Schätzungen zur Beanspruchung des vorderen Kreuzbandes unter verschiedenen physiologischen Belastungen wurden von Paulos 1981 und Noyes 1984 geäußert [114, 119]. Beim Fahrradfahren werden ca. 26 N Zuglast am vorderen Kreuzband angenommen, beim Gehen 178 N und beim Joggen 556 N. Noyes beobachtete, dass unter physiologischer Belastung das vordere Kreuzband einer Zuglast bis zu 454 N ausgesetzt wird [114]. In-vivo-Messungen zeigten eine Längenänderung im anteromedialen Bündel des vorderen Kreuzbandes bei aktiver Flexion zwischen 15° und 45° von 1,1 bis 2,6 mm [17]. Kreuzbänder sind somit keine reinen isometrischen Strukturen, sondern unterliegen unterschiedlichen Zugbeanspruchungen in Abhängigkeit zur Gelenkstellung. Markolf [100] untersuchte die resultierende Kraft im vorderen Kreuzband an humanen Präparaten und berichtete über Zugbelastungen von 200 N während der

letzten 10 Grad der Extension. Andere biomechanische Kadaver-Studien ermittelten Zugbelastungen von 249 bis 296 N [147].

Die Kreuzbandplastik wird als ein Konstrukt betrachtet, bestehend aus Transplantat sowie femoraler und tibialer Verankerung. Bis zur ossären Integration des Transplantates werden die biomechanischen Eigenschaften des Konstruktes von der Verankerung bestimmt. Erst nach femoraler und tibialer ossärer Integration des Transplantates werden die Eigenschaften vom Transplantat selbst bestimmt. Anhand von tierexperimentellen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass in Abhängigkeit von der Art des Transplantates und seiner Fixation nach 6 bis 12 Wochen zunehmend das Transplantat selbst die biomechanische Schwachstelle der Kreuzbandersatzplastik darstellt und in diesem Zeitraum die geringsten biomechanischen Eigenschaften im Rahmen des Remodelings anzutreffen sind [19, 67, 141, 188]. Ferner konnte bei Allografts gegenüber Autografts in Kombination mit einem verzögerten Remodeling im Verlauf ein größerer Verlust der initialen Belastbarkeit nachgewiesen werden [75]. Mit Fortschreiten des Umbauprozesses erholt sich jedoch die Biomechanik sowohl der Autografts als auch der Allografts wieder und nähert sich derer des nativen Kreuzbandes immer weiter an.

2 Problemstellung und Hypothesen

Bei allogenen Kreuzbandtransplantaten bieten bestehende Sterilisationsverfahren wie γ -Bestrahlung keinen sicheren Schutz vor Infektion und Kontamination ohne deren initiale biomechanische und strukturelle Eigenschaften zu beeinträchtigen [54, 55, 101, 135, 156]. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit Alternativen in der Sterilisationsbehandlung zu finden, um eine sichere Anwendung dieser Transplantate beim Menschen gewährleisten zu können.

Durch die Gewebebank des Instituts für Transfusionsmedizin an der Charité ist mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren eine Sterilisation von allogem Knochengewebe entwickelt worden, die einen adäquaten antibakteriellen, antimykotischen und antiviralen Schutz bietet, der herkömmlichen Verfahren überlegen ist, ohne die mechanischen Eigenschaften der behandelten Transplantate zu beeinträchtigen [129, 132, 133, 182]. In weiteren mikrobiologischen und in-vitro Studien [98, 131, 153, 171] konnte die sehr gute Anwendung dieses Verfahrens mit einer ausreichenden Gewebepenetration und ohne Beeinträchtigung der initialen biomechanischen und strukturellen Eigenschaften auch für die Entkeimung humanen Sehngewebes gezeigt werden [152]. Jedoch existierten bis dato keine Studien, die den Effekt dieses Verfahrens auf die mechanischen Eigenschaften und die biologischen Umbauvorgänge im Rahmen des Bandremodelings in einem in-vivo Modell untersucht haben. Dies ist jedoch die zwingende Voraussetzung für einen sicheren Einsatz dieses Verfahrens zur Sterilisation von allogenen Kreuzbandtransplantaten beim Menschen.

Ziel dieser Studie am Schafsmodell ist die Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften und der Revaskularisierung im Rahmen des frühen Bandremodelings von freien allogenen Sehnen-transplantaten, die mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren sterilisiert wurden. Auf Grund der gleichen Wahl des Tiermodells und der Methoden wie bei einer Vorstudie, die das Bandremodeling und die biomechanischen Eigenschaften von Autografts mit unsterilisierten, rein tiefgefrorenen (fresh-frozen) Allografts verglichen hatte, konnten die in jener Studie gewonnenen Daten als Referenzdaten herangezogen werden [154].

Hypothesen

- 1: Die Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren hat keinen negativen Einfluss auf die Revaskularisierung im Rahmen des Remodelings von allogenen Sehnen transplantaten
- 2: Die Sterilisation allogener Sehnen transplantate mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren beeinträchtigt nicht die biomechanischen Eigenschaften in-vivo.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Alle Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die zuständigen Behörden (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Tierversuchsvorhaben G0029/04). Im Rahmen unserer Studie wurde an 18 ausgewachsenen, weiblichen Merino-Mix-Schafen eine Ersatzplastik des vorderen Kreuzbandes am linken Hinterlauf durchgeführt. Hierbei wurden die Ergebnisse mit einer Vorstudie [154], in der der Remodeling-Prozess von autologen und tiefgefrorenen, allogenen knochenblock-freien Flexorsehnentransplantaten im Schafsmodell untersucht wurde, verglichen. Diese Studie wurde ebenfalls durch die staatliche Tierversuchskommission (Antragsnummer G0073/02) genehmigt.

Die Rekonstruktion des VKB erfolgte mit einem allogenen, freien und PES-behandelten Sehnentransplantat des Musculus flexor digitalis superficialis. Die Transplantate wurden extrakortikal femoral über einen Endobutton sowie tibial über eine Faden-Knochenbrücke fixiert. Die Standzeiten der Tiere betragen 6 und 12 Wochen mit jeweils 9 Tieren.

Nach 6 Wochen beginnt normalerweise das frühe Remodeling mit einem in der Literatur beschriebenen Maximum an zellulären Umbauvorgängen in den äußeren Transplantatregionen und einer beginnenden Revaskularisierung. Daher wurde als erster Untersuchungszeitpunkt eine Standzeit von 6 Wochen gewählt, um Unterschiede der Umbauvorgänge einschätzen zu können. Der zweite Untersuchungszeitpunkt nach 12 Wochen diente der Evaluation der Art und Weise sowie der Dynamik des Remodeling, da zu diesem Zeitpunkt ein sich in allen Regionen im Umbauprozess befindendes Transplantat mit beginnender Konsolidierung und Proliferation zu erwarten war. Für eine spätere Beurteilung der Sehnen-Knochen-Heilung als Teilaspekt weiterer Studien des Projektes wurden alle Tiere nach einem standardisierten Protokoll mit fluoreszierenden Knochenfarbstoffen markiert. Nach der Tötung und Entnahme des linken Hinterlaufes erfolgten, nach einer makroskopischen Evaluation des Gelenkes bezüglich Arthrose, Gefäßinjektionen, Entzündungszeichen und der Synovia, die biomechanischen Versuche zur Ermittlung der Bandlaxizität, der Steifigkeit und der Versagenskraft. Da sich in Vorstudien gezeigt hatte, dass die Biomechanik keinen Einfluss auf die histologischen Folgeuntersuchungen hat, konnten jeweils an allen Tieren einer Standzeit sowohl biomechanische als auch histologische Untersuchungen durchgeführt werden. Anschließend wurde der intraartikuläre Anteil des Transplantates entnommen und getrennt von den Knochenteilen histologisch

weiterverarbeitet. Es wurden konventionelle histologische und immunhistologische Färbungen zur Beurteilung der Revaskularisierung im Transplantatremodeling durchgeführt.

Tabelle 3-1: postoperative Standzeiten der PES-Allografts

Standzeiten	PES-Allografts
	<i>Biomechanik + Histologie</i>
6 Wochen	n = 9
12 Wochen	n = 9
Summe	n = 18

Tabelle 3-2: postoperative Standzeiten der Kontrollgruppen aus [154]

Standzeiten	Autografts		Allografts (unsterilisiert)	
	<i>Biomechanik + Histologie</i>	<i>Histologie</i>	<i>Biomechanik + Histologie</i>	<i>Histologie</i>
6 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2
12 Wochen	n = 7	n = 2	n = 7	n = 2
Summe	n = 18		n = 18	

3.1.1 Versuchstiere

In unserer Studie wurden ausgewachsene, weibliche Merino-Mix Schafe mit einem Alter von zwei bis drei Jahren und einem durchschnittlichen Gewicht von 72,1 kg ($\pm 6,5$) verwendet. Die Tiere wurden von eingetragenen Züchtern erworben und vor ihrer Aufnahme in den Versuch in Quarantäne einer klinischen allgemeinen Untersuchung sowie einer Ultraschalluntersuchung zum Ausschluss einer Trächtigkeit durch einen Tierarzt unterzogen. Tiere mit Störungen des Allgemeinbefindens, trächtige Tiere sowie Tiere, die anhand des Zahnalters jünger als zwei bzw. älter als drei Jahre eingestuft wurden, wurden vom Versuch ausgeschlossen. Außerdem diente eine präoperative Röntgenkontrolle der Knie in zwei Ebenen (anteroposteriorer und seitlicher Strahlengang) zum Ausschluss von Tieren mit offenen Wachstumsfugen. Die Tiere, die den Vorgaben entsprachen, wurden mittels einer Ohrmarke gekennzeichnet, sowie ein Antiparasitikum¹, ein Immunstimulanz² sowie ein Prostaglandin- Analogon³ zur Unterbrechung einer evtl. sehr früh bestehenden Trächtigkeit verabreicht.

¹ Ivomec S®, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland

² Baypamune®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

³ Pronilen®, Intervet GmbH, Tönisvorst, Deutschland

Anschließend wurden die Tiere zur Operation in den tierexperimentellen Einrichtungen im Forschungshaus des Charité Campus Virchow Klinikums untergebracht. Nach Abschluss der Wundheilung hatten die Schafe freien Auslauf auf dem Außengelände des Institutes für Tierzucht der Freien Universität Berlin (**Abb. 3-1**). In beiden Einrichtungen befanden sich die Tiere unter veterinärmedizinischer und tierpflegerischer Aufsicht.



Abb. 3-1: Merino-Schafe auf dem Freigelände des Institutes für Tierzucht der Freien Universität Berlin

3.1.2 Tiermodell

Das Schafsknie eignet sich vor allem auf Grund seiner anatomischen und funktionellen Ähnlichkeiten zum menschlichen Kniegelenk und seiner guten Verfügbarkeit besonders als Tiermodell für Rekonstruktionen des VKB mit freien Sehnentransplantaten [73, 134]. Die Größe der Tiere gewährleistet eine genaue Platzierung der Knochentunnel. Die Entnahme der Sehne des M. flexor digitalis superficialis führt zu keinen funktionellen Einschränkungen mit Rückkehr zur vollen Belastbarkeit der operierten Kniegelenke nach etwa 3-4 Wochen. Es konnten in Studien weder Knieinstabilitäten und Bewegungseinschränkungen noch Zeichen einer Arthrose festgestellt werden [73]. Des Weiteren wurden Schafe bereits in zahlreichen Studien zum VKB-Ersatz verwendet, was eine Vergleichbarkeit der Daten auch mit Vorgängerstudien gewährleistet [26, 73, 121, 180, 187-189, 192].

3.1.3 Transplantatauswahl

Als Allograft wurde die Sehne des Musculus flexor digitalis superficialis transplantiert. Die Vorteile sind die einfache chirurgische Präparation und die guten biomechanischen Eigenschaften [73]. Ihre Entnahme wird vom Schaf gut toleriert. Die beim Menschen häufig

verwendeten Hamstringsehnen sind beim Schaf eher flächig und kurz angelegt und daher als Transplantat aus unserer Sicht ungeeignet (**Abb. 3-2**).

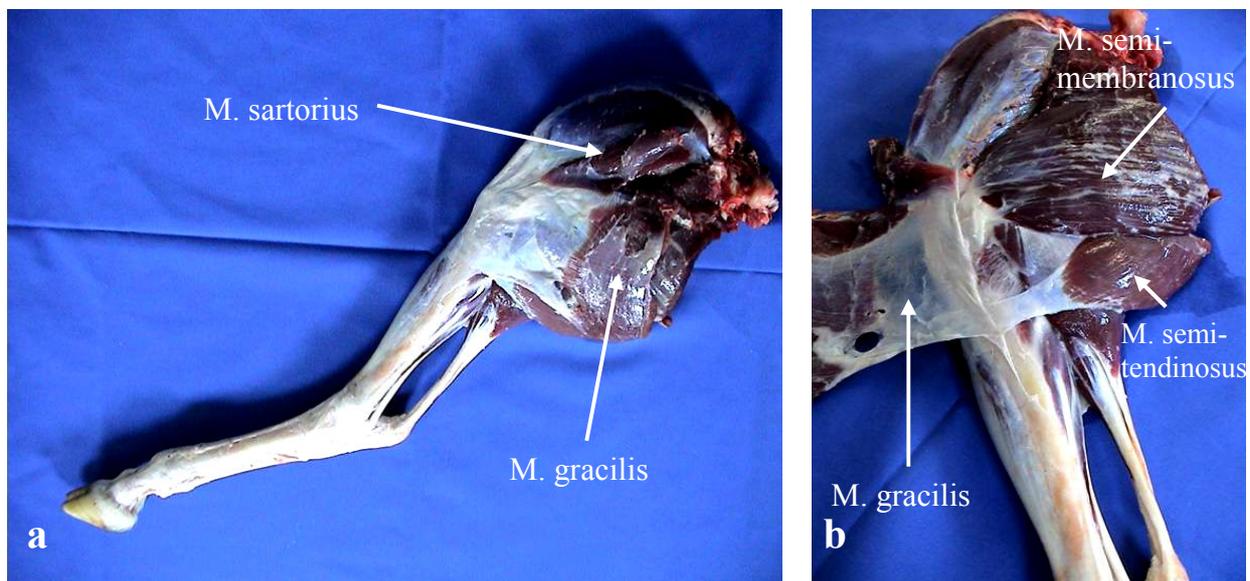


Abb. 3-2: a) Übersicht über die rechte, hintere Extremität des Schafes b) Nach Aufklappen des M. gracilis ist die flächige und kurze Sehne des M. semitendinosus zu erkennen.

3.1.4 Transplantatvorbehandlung

Die Sehne des M. flexor digitalis superficialis wurde als Allograft nach dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren vom Institut für Transfusionsmedizin (Gewebebank) der Charité sterilisiert. Hierbei wurde die Flexorsehne nach der Zwischenlagerung bei $< -18^{\circ}\text{C}$ für max. 6 Tage unter fließendem sterilen Wasser für 30 min gewässert und in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (Mischungsverhältnis 2:1) für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln⁴ entfettet. Anschließend wurden die verbliebenen Chloroformreste durch 8maliges Spülen mit Methanol für je 15 min im Ultraschallbad⁵ beseitigt. Methanol wurde durch zweimaliges Spülen mit sterilem deionisiertem Wasser entfernt. Es folgte der eigentliche Sterilisationsprozess mit der Peressigsäurelösung (2% Peressigsäure⁶, 96% Ethanol⁷, Aqua ad iniectabilia⁸ im Mischungsverhältnis 2:1:1) in einem Exsikkator unter Einwirkung eines Unterdruckes von 16 kPa (=200 mbar) bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln für 4 Stunden (**Abb. 3-3**). Dann wurde die Peressigsäurelösung durch 6-maliges Spülen mit Aqua ad

⁴ Schüttelgerät THYS 2, MLW, Leipzig, Deutschland

⁵ Sonorex RK 510 H, Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland

⁶ Wofasteril®, Kesla Pharma Wolfen GmbH, Wolfen, Deutschland

⁷ Ethanol 96%, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

⁸ Aqua ad iniectabilia, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland

infectabilia à 20 min entfernt. Am Schluss erfolgte die Testung zum Ausschluss verbliebener Peressigsäurelösung durch den Merchoquant-Test⁹ mit einer Sensitivität von 5 ppm.

Peressigsäure (CH₃CO-OOH) ist eine farblose und wasserlösliche Flüssigkeit, die sich chemisch von der Essigsäure ableitet und zu den Peroxycarbonsäuren gehört. Beim Erhitzen über den Siedepunkt (105°C) zerfällt die Peressigsäure explosionsartig. Sie wirkt auf Grund ihrer funktionellen Gruppe stark oxidierend und findet als hochwirksames und ökologisch unbedenkliches Desinfektionsmittel auch in vielen Betrieben der Nahrungsmittelindustrie Verwendung. Dennoch ist ein sicherer Umgang mit PES erforderlich, da es stark reizend auf Haut, Augen und die Atemwege wirkt. Ferner ist Peressigsäure weder karzinogen noch terratogen [91, 109].

Nach der Sterilisation erfolgte die sterile, trockene Lagerung der PES-behandelten Flexorsehne bei -80 °C bis zur Implantation.

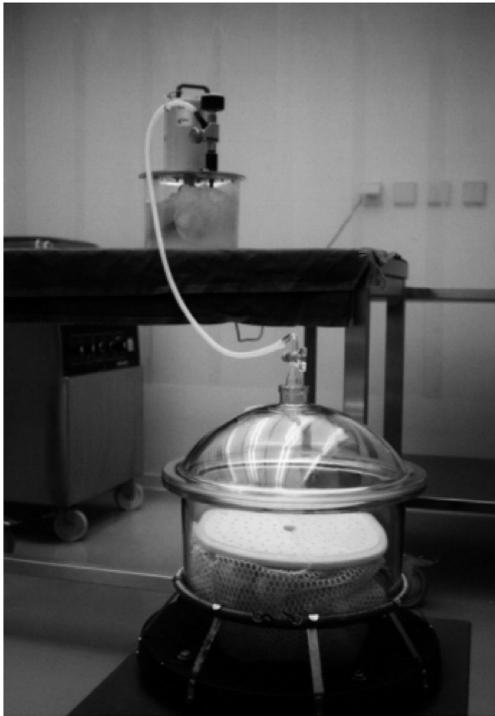


Abb. 3-3: Exsikkator mit Vakuumpumpe aus [129]

⁹ Merchoquant-Test, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

3.2 Tierversuch

3.2.1 Prämedikation, Narkose und Analgesie

Zur Sedierung wurde den nüchternen Schafen 20 mg/kg Thiopental-Natrium¹⁰ i.v. in die V. jugularis externa (gelöst in Aqua dest.) infundiert. Danach wurden sie mit einem Laryngoskop mit langem geradem Spatel nach Foregger und einem Endotrachealtubus¹¹ Größe 8.0 intubiert. Die Narkose wurde mit Hilfe eines Inhalators¹² und eines Gasgemisches aus Isofluran^{®13}-(1,5%)-O₂(1/3)-N₂(2/3) durchgeführt. Die Tiere wurden je nach Größe bei einer Frequenz von 16-18 Zügen mit 6-8 l/min beatmet. Intraoperativ erfolgte eine Analgesie mit 0,5 mg Fentanyl^{®14}, eine Antibioseprophylaxe mit Amoxicillin und Clavulansäure¹⁵ als Einmalgabe sowie eine Infusion mit 0,9% NaCl-Lösung¹⁶. Zur Narkoseüberwachung dienten ein Pulsoximeter, die expiratorische CO₂-Messung und das EKG. Der linke Hinterlauf, ein Teil des Beckens und des Bauches wurden geschoren, gewaschen und desinfiziert¹⁷. Anschließend wurden die Tiere in rechter Seitenlage auf dem OP-Tisch fixiert.

3.2.2 Operation

Die Operation erfolgte unter standardisierten sterilen Bedingungen. Dazu wurde der linke Hinterlauf mit einer Polyvidonjod-Lösung¹⁸ abgewaschen und steril abgedeckt. Die Blutstillung erfolgte durch monopolare Elektrokoagulation, als Spülung wurde 0,9% NaCl-Lösung¹⁹ verwendet.

Transplantatentnahme

Zur Transplantatentnahme wurde über einen ca. 10 cm langen longitudinalen Hautschnitt am linken Hinterlauf die Sehne des M. gastrocnemius, welche in der gleichen Sehnenscheide mit der Sehne des M. flexor digitalis superficialis verläuft, dargestellt. Nach Trennung der Sehnenscheide konnte die Flexorsehne mit Hilfe einer Overholtklemme mobilisiert werden. Anschließend wurde proximal des Tuber calcanei und distal des Muskelbauches ein 6 bis 8 cm langes und ca. 7 mm breites Transplantat scharf herausgetrennt. Die gespaltene Flexorsehne

¹⁰ Trapanal[®], Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

¹¹ Hi-Lo Lanz[™] Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland

¹² Ventilator 711, Siemens-Elema Ab, Solna, Schweden

¹³ Forene[®], Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland

¹⁴ Fentanyl[®], Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

¹⁵ Augmentan[®] i.v. 2,2g (Amoxicillin/Clavulansäure) SmithKline Beecham GmbH

¹⁶ Natriumchlorid-Infusionslösung 154, Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland

¹⁷ Desderman[®]N, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland

¹⁸ Braunoderm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

¹⁹ NaCl 0,9% Spüllösung, Delta select GmbH, Pfullingen, Deutschland

wurde mit resorbierbarem²⁰ und die Haut mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial²¹ verschlossen. Das Transplantat wurde mit 0,9% NaCl-Lösung²²-getränkten Mullkompressen steril und feucht gehalten und anschließend bis zum Versand ins Institut für Transfusionsmedizin bei -80°C tiefgefroren.

Präparation

Ein zuvor bei Raumtemperatur aufgetautes, PES-behandeltes Allograft wurde in Baseball-stitch Technik mit zwei nicht-resorbierbaren, polyesterbeschichteten Fäden²³ der Stärke 2 an beiden Enden präpariert (**Abb. 3-4**). Anschließend wurde das präparierte VKB-Allograft manuell vorgespannt und dessen Durchmesser für den späteren Bohrkanal gemessen.



Abb. 3-4: Präparation in Baseball-stitch Technik

Arthrotomie und Transplantatverankerung

Über einen 10-12 cm langen Hautschnitt medial des Lig. Patellae wurde nach Durchtrennung der Verschiebeschichten die Gelenkkapsel eröffnet. Nach Inzision des M. vastus medialis sowie des patellofemorales Bandes, konnte die Patella nach lateral luxiert und der Gelenkraum eröffnet werden. Zur besseren Darstellung wurde der Hoffa'sche Fettkörper unter Schonung des Lig. transversum genus mediallyseitig gelöst und nach lateral geschlagen. Dann wurde das native VKB herausgetrennt und die Insertionsstellen mit Hilfe eines scharfen Löffels und einer Luer-Zange debridiert.

Zur Transplantatverankerung wurden femoral und tibial, ausgehend von den ursprünglichen VKB-Fixationen nach inside-out-Technik, dem Transplantat entsprechende und 20 mm tiefe

²⁰ 1/0 Vicryl[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

²¹ 2/0 Prolene[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

²² NaCl 0,9 % Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

²³ 2 Ethibond-Excel[®], Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland

Knochentunnel aufgebohrt. Dabei erfolgte die Bohrung des femoralen Tunnels in maximaler Flexion des Kniegelenkes vom ehemaligen Ursprung des VKB in der Fossa intercondylaris (Notch) ausgehend in Richtung Epicondylus lateralis. Zur höheren Präzision diente ein vorher bis durch die Haut gebohrter Führungsdraht. Tibial verlief der Knochentunnel von der alten Insertionsstelle des VKB medial von der Eminentia intercondylaris bis durch die Gegenkortikalis medial der Tuberositas tibiae. Eine zu weit anteriore Platzierung des tibialen Bohrkanals galt es unbedingt zu vermeiden, da dies zu einem Notchimpingement des Transplantates und zur sekundären Transplantatelongation, ggf. auch zu einem Transplantatversagen führen kann [175]. Eine Knochenbrücke für die spätere distale Fixation des Transplantates wurde mit Hilfe eines weiteren Bohrloches bis in die Spongiosa im großzügigen Abstand medial des distalen Knochentunnels gebildet.

Das präparierte Allograft wurde über seine nicht-resorbierbaren Haltefäden mit Hilfe eines Führungsdrahtes von innen nach außen durch die Knochentunnel eingezogen. Nach femoraler Fixation über einen extrakortikalen Endobutton²⁴ wurde nach 8-10maligem Durchbewegen des Gelenkes das Transplantat unter maximaler Vorspannung in 30° Flexion über die tibiale Knochenbrücke befestigt (**Abb. 3-5**). Nach Reposition der Patella wurde die Beweglichkeit und Fixation des Transplantates durch erneutes Durchbewegen getestet. Anschließend wurde das patellofemorale Band zur Vermeidung von postoperativen Patellaluxationen mit resorbierbarem Nahtmaterial²⁵ refixiert. Es folgte der Kapselverschluss und der schichtweise primäre Wundverschluss mittels nicht-resorbierbaren Nahtmaterials²⁶.

²⁴ Acufex[®], Smith & Nephew Endoscopy Inc., Ma, USA

²⁵ 1/0 Vicryl[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

²⁶ 2/0 Prolene[®], Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

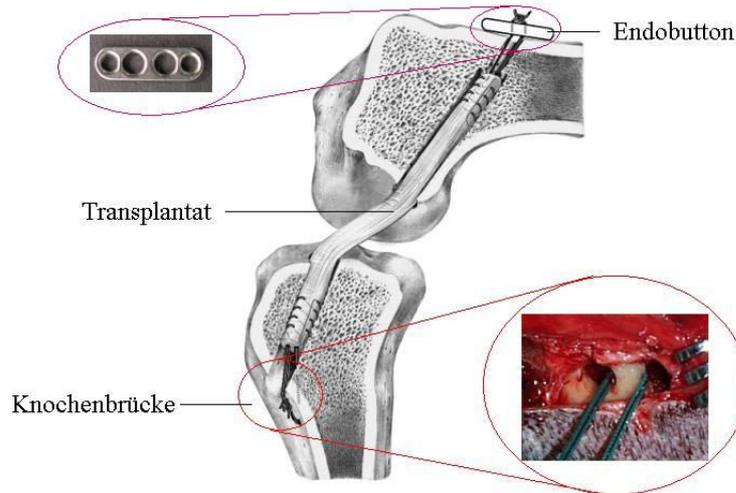


Abb. 3-5: indirekte Transplantatfixation mittels Knochenbrücke distal und über Endobutton proximal

3.2.3 Postoperativ

Die Wunden wurden mit Braunol^{®27} desinfiziert und verbunden. Nach der Extubation wurde von den operierten linken Knien mit einem mobilen Röntgengerät²⁸ und speziellen Röntgenfilmen²⁹ kraniokaudale und mediolaterale Röntgenbilder angefertigt. Um Wundinfektionen, übermäßige Bewegung und Beeinträchtigung durch die anderen Schafe vorzubeugen, kamen die operierten Tiere für einen Tag zur Überwachung in eine Einzelbox. Als Schmerzprophylaxe wurden bis zum 3. postoperativen Tag Analgetika³⁰ verabreicht. Die Schafe befanden sich in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité unter veterinärmedizinischer und tierpflegerischer Aufsicht und wurden täglich visitiert. Nach regelmäßigem Verbandswechsel, Beurteilung des Lahmheitsgrades und Inspektion der Wunde wurden zwischen dem 10.-14. postoperativen Tag die Fäden gezogen. Anschließend wurden die Tiere zum freien Weidegang zur Außenstelle des Institutes für Tierzucht der Freien Universität Berlin gebracht. Alle Schafe wurden regelmäßig auf Lahmheit und Klaueninfektionen untersucht und die Klauen auf Grund der fehlenden Abnutzung auf dem weichen Boden in 6-wöchigem Abstand geschnitten.

²⁷ Braunol[®]2000, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

²⁸ Mobilett Plus, Siemens-Elema AB, Solna, Schweden

²⁹ Cronex 5, 24x30 cm, AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien

³⁰ Finadyne[®] 25 mg Injektionslösung 1%, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland

3.2.4 Probenentnahme: Tötung der Tiere und Explantation

Nach 6 und 12 Wochen Standzeit wurden jeweils 9 Schafe getötet. Dazu wurden sie mit 20 mg/kg Thiopental-Natrium³¹ i.v. (gelöst in 40 ml Aqua ad iniectabilia) sediert. Anschließend trat nach Applikation mit 50 ml Kaliumchlorid³² i.v. unter Auskultationskontrolle der Herzstillstand ein.

Nach Entnahme der kontralateralen, nativen Sehne des M. flexor digitalis superficialis rechts als auch des nativen VKB rechts wurden die operierten linken Kniegelenke in toto explantiert. Dazu wurden mit Hilfe einer Fuchsschwanzsäge das Femur sowie die Tibia ca. 15 cm proximal und distal der Kniegelenke abgesetzt. Die Gelenke wurden in 0,9% NaCl-getränkte Binden eingelegt, um einem Austrocknen vorzubeugen. Anschließend erfolgte eine Röntgenaufnahme in zwei Ebenen (anteroposteriorer und seitlicher Strahlengang) und die Fixation der Kniegelenke an den Femur- und Tibiastümpfen in Beracryl³³-Kunststoff-Gussformen.

3.3 Biomechanische Testung

Anschließend erfolgte die biomechanische Testung mit einer Zwick Materialtestmaschine³⁴. Diese Materialtestmaschine erlaubt Testungen unter Zug, Kompression und Rotation. Im Rahmen dieser Studie führten wir Testungen ausschließlich unter uniaxialer Zugbelastung durch. Die Messgenauigkeit für uniaxiale (vertikale) Translation betrug 0,005 mm. Die Materialtestmaschine arbeitete mit einer Kraftzelle von 20 kN und einer Messgenauigkeit von $\pm 0,12\%$. Alle Messdaten wurden auf einen vernetzten Personal Computer übertragen und gespeichert.

3.3.1 Versuchsaufbau

Die operierten Kniegelenke wurden an den Beracryl[®]-präparierten Femur- und Tibiastümpfen in zwei Aluminiumklemmen fixiert. Dabei wurde das Femur in 60° Beugung relativ zur Längsachse der Tibia positioniert, um eine der Schafsanatomie entsprechende und möglichst homogene Kraftverteilung über den Kreuzbandquerschnitt zu gewährleisten (**Abb. 3-6**). Die erste Testung erfolgte mit dem Weichteilmantel. Die Tibia wurde auf dem beweglichen Tisch der Zwick fixiert, welcher in vertikaler Richtung bewegt werden konnte. Die biomechanische Testung fand unter Erhaltung eines Freiheitsgrades statt. Somit waren sowohl

³¹ Trapanal[®], Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

³² 1M-Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

³³ Beracryl[®] Pulver, Troller-Kunststoffe AG, Fulenbach, Schweiz

Beracryl[®] Monomer flüssig, troller-Kunststoffe AG, Fulenbach, Schweiz

³⁴ Materialprüfung Modell 1455, Zwick GmbH & Co.KG, Ulm, Deutschland

Translationsbewegungen nach medial-lateral und proximal-distal als auch sämtliche Rotationsbewegungen nicht möglich. Vor dem Festlegen der Ausgangs- bzw. Nullstellung von Femur und Tibia für den Schubladentest wurde kontrolliert, dass kein ossärer Kontakt zwischen den femoralen Kondylen und dem tibialen Plateau bestand. Die Nullstellung wurde durch eine Bewegung der Tibia bis zu einer Vorlast von +5 N nach anterior festgelegt. Zum Wiederfinden dieser Nullstellung nach jedem Belastungszyklus wurde ein Metallblock am Wegaufnehmer der Zwick platziert.

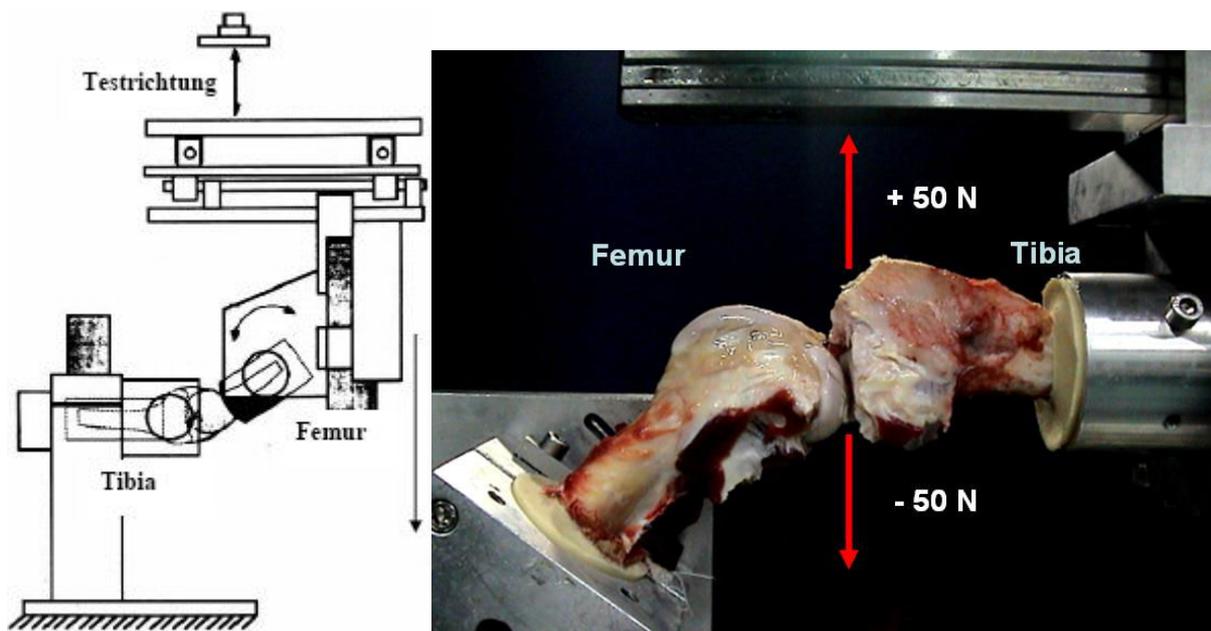


Abb. 3-6: Links) Skizze des Schubladentests beim Menschen in 30°-Flexion aus [197]. Rechts) modifizierter Schubladentest beim Schaf in 60°-Flexion

3.3.2 Test-Protokoll

Jedes operierte Kniegelenk wurde insgesamt vier biomechanischen Testungen unterzogen. Alle Testungen wurden schriftlich und photographisch dokumentiert.

Zuerst wurde das operierte Kniegelenk mit seinem Weichteilmantel (Muskelmantel, Kniegelenkscapsel, kompletter Bandapparat, Menisken) einer Simulation der vorderen und hinteren Schublade mit einer Relativbewegung der Tibia gegenüber dem Femur in 60° Beugung getestet. Die Geschwindigkeit der antero-posterioren Translationsbewegung betrug 120 mm/sec. Dabei wurde ein Belastungsmodus mit einem Maximum bis +50 N und -50 N gewählt. Bei einer nach anterior gerichteten Vorlast von +5 N wurde die initiale Nullstellung definiert. Diese wurde am Ende der ersten Testzyklen wieder eingenommen. Insgesamt wurden 11 Zyklen gefahren,

wobei die ersten 10 Zyklen zur Vordehnung dienten. Von allen Zyklen wurde ein Kraft-Strecke-Diagramm gespeichert, jedoch wurde nur der letzte Zyklus vom Computer als Übersicht ausgedruckt. Unsere späteren Berechnungen bezogen sich ebenfalls auf den 11. Testzyklus.

Daraufhin wurde der gesamte Streckapparat (Weichteilmantel, Kollateralbänder, Kapselstrukturen, Menisken) reseziert, so dass nur noch das Allograft und das native hintere Kreuzband (HKB) als physikalische Verbindung zwischen Femur und Tibia bestanden. Während der Eröffnung der Kniegelenke wurde mit einer sterilen Nadel Synovialflüssigkeit entnommen und Ausstriche angefertigt. Der Binnenraum wurde ebenfalls makroskopisch hinsichtlich Entzündungszeichen (Gefäßinjektionen der Synovialis, Gelenkergussbildung und Synovialhypertrophie) sowie der Ausbildung einer neuen synovialen Hüllschicht um das Allograft beurteilt und photographisch dokumentiert. Jetzt wurde entsprechend zum ersten Versuch mit den gleichen Testparametern (Belastungsmodus mit max. +50 N und min. -50 N bei 120 mm/sec) eine Simulation der vorderen und hinteren Schublade in 60° Beugung gefahren. Erneut wurden alle Daten der 11 Zyklen gespeichert und als Orientierung ein Kraft-Strecke-Diagramm des 11. Zyklus ausgedruckt. Die späteren Berechnungen bezogen sich ebenfalls auf diesen Zyklus.

Danach wurde das native HKB durchtrennt und das VKB-Transplantat auf seine biomechanischen Eigenschaften mit Hilfe einer Simulation ausschließlich der vorderen Schublade getestet. Bei einem Belastungsmodus mit einem Maximum von +50 N und einer Geschwindigkeit von 120 mm/sec aus einer initialen Nullstellung mit einer Vorlast von +1 N ausgehend, wurden 11 Zyklen mit einer relativen Translationsbewegung der Tibia gegenüber dem Femur durchgeführt. Alle Daten wurden gespeichert und ein Kraft-Strecke-Diagramm des 11. Testzyklus ausgedruckt.

Anschließend wurde dreimal die Querschnittsfläche des Allografts mit einem Mikrometer³⁵ nach einer von Ellis beschriebenen Technik [47] gemessen und der Mittelwert ermittelt. Hieraus konnte später die Streckspannung (stress) N/mm² des Transplantates im Versagenstest bestimmt werden.

Für den Versagenstest (load-to-failure) wurde das Kniegelenk in anatomischer Ausrichtung erneut in 2 Aluminiumklemmen in 90° Beugung fixiert (**Abb. 3-7**). Dann wurde das VKB-Transplantat mit einer parallel verlaufenden Kraft und einer Prüfgeschwindigkeit von 120 mm/sec bis zum Versagen belastet. Dabei wurde eine Kraft-Dehnungskurve aufgezeichnet sowie

³⁵ area micrometer, Mitutoyo, Osaka, Japan

die Versagenkraft und –modus (Versagen der Verbindungsmaterialien und intraligamentäre Ruptur) des Allografts dokumentiert.

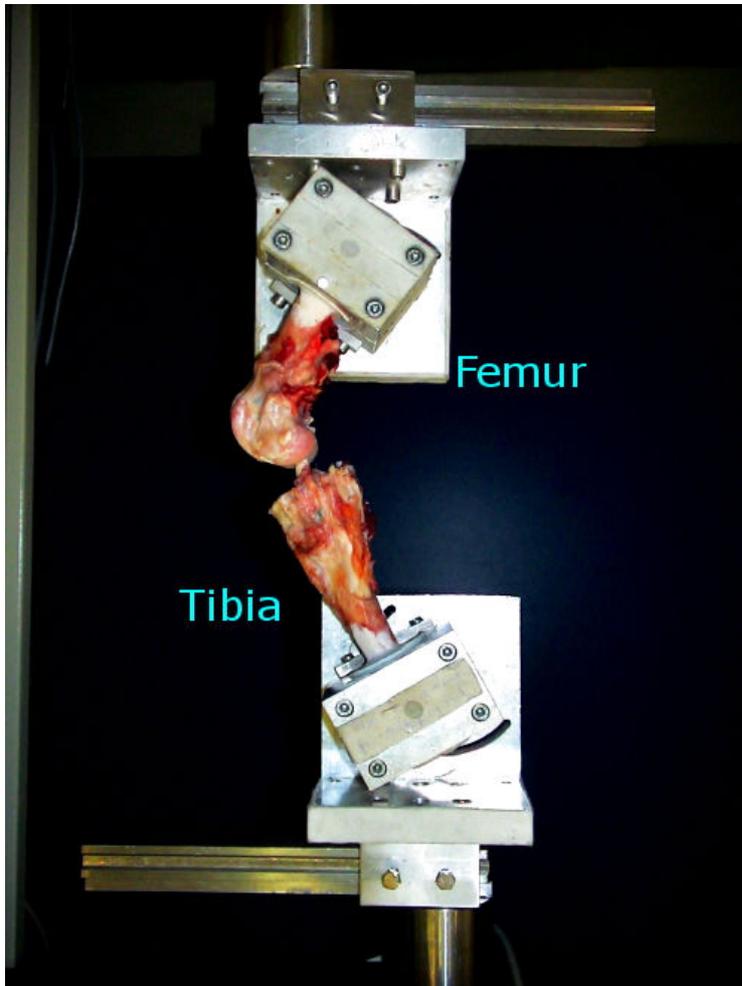


Abb. 3-7: Versagenstest

3.3.3 Messgrößen

Aus den Daten der Kraft-Strecke-Diagramme wurden die Steifigkeit und die Laxizität (Elongation) berechnet. Aus den ersten drei Testungen (1. Knie komplett, 2. VKB-Transplantat + HKB nativ, 3. VKB-Transplantat) wurden die Daten des 11. Messzyklus genutzt. Die Berechnung der Steifigkeit erfolgte bei 50 N- und 20 N-Belastung.

$$\text{Steifigkeit (N/mm): } \frac{y(50\text{N}) - y(20\text{N})}{x(50\text{N}) - x(20\text{N})} \quad y\text{- N, } x\text{- mm}$$

Zur Beurteilung der gesamten Laxizität wurde die Elongation bei +50 N und bei -50 N addiert. Bei der dritten Testung, bei der nur noch das Allograft getestet wurde, lag die maximale Elongation bei +50 N. Die Steifigkeit im Versagenstest wurde als die Steigung der Kraft-

Strecke-Hysteresekurve (**Abb. 3-8**) im Bereich zwischen 20% und 90% der endgültigen Versagenskraft definiert.

$$\text{Steifigkeit (N/mm): } \frac{N(90\%) - N(20\%)}{\text{mm}(90\%) - \text{mm}(20\%)}$$

N- Versagenskraft

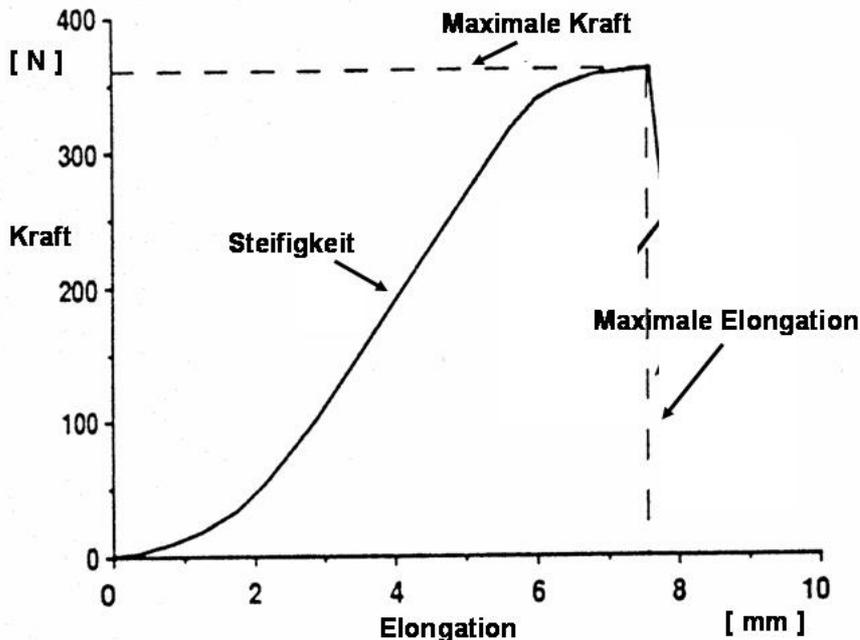


Abb. 3-8: Kraft-Strecke-Hysteresekurve beim Versagenstest

Zur Berechnung der Streckspannung (stress) im Versagenstest wurde die Versagenskraft durch die Transplantatquerschnittsfläche geteilt:

$$\text{Stress (MPa): } \frac{N}{\text{mm}^2}$$

3.3.4 Auswertung (EDV)

Zur Aufzeichnung und Speicherung des Kraft-Diagramms wurde die Zwick-PC Software (Version 7047.5b / 7047.17b / 7047.7b) verwendet. Datentabellen mit den Ergebnissen der Versuche wurden mit Microsoft® Excel 2002 erstellt.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit einem statistischen Softwarepaket SPSS Version 13.0 durchgeführt.

3.4 Histologische Untersuchungen

3.4.1 Probengewinnung und histologische Aufarbeitung

Nach der biomechanischen Testung wurden das Allograft scharf reseziert und aus einem intraartikulären Bereich schließlich Längs- und Querschnitte angefertigt.

Alle gewonnenen Proben wurden in ein nach Präparatart, Entnahmeseite, Schnittrichtung und Datum beschriftetes Fixiergitter³⁶ für 2-3 Tage in 4% Formaldehyd-Lösung³⁷ fixiert und anschließend für mindestens 15 min gewässert. Es folgte die automatische Entwässerung über 67 Stunden und die Einbettung in Paraffin³⁸. Paraffin hat als Fixierungsmittel gegenüber der Gefrierschnitttechnik den Vorteil der besseren Strukturhaltung, die insbesondere für die Immunhistochemie eine wichtige Rolle spielt. Von den fertigen Gewebelöcken wurden 4 µm dünne Serienschnitte mit einem Mikrotom³⁹ angefertigt, die anschließend auf silanisierte Adhäsions-Objektträger⁴⁰ aufgezogen wurden.

3.5 Konventionelle Färbungen

Als konventionelle Färbungen für die deskriptive Auswertung dienten die Hämatoxylin-Eosin Färbung⁴¹ (HE) und die Masson-Goldner Trichromfärbung⁴² (MG). Die HE-Färbung ermöglicht die deskriptive Analyse der Kernmorphologie und der Zellverteilung. Der azidophile Farbstoff Hämatoxylin stellt die Zellkerne blauviolett dar, der basophile Farbstoff Eosin färbt die Interzellularsubstanz und das Zytoplasma rosa. Die MG-Färbung eignet sich besonders für die Beurteilung der extrazellulären Matrix, der Kollagenanordnung und der Abgrenzung der Synovia vom Bandgewebe. Sie stellt Zellkerne bräunlich-schwarz, Zytoplasma orange-rot und Bindegewebe grün dar.

³⁶ Tissue Tek III, Miles Limited, Slough, England

³⁷ Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland

³⁸ Paraplast Plus[®], Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA

³⁹ Leica RM 2125, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

⁴⁰ HistoBond[®], Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

⁴¹ Hämatoxylin, Papanicolaou Lösung 1a Harris', Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Eosin Solution Aqueous, Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri, USA

⁴² 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

3.5.1 Deskriptive Auswertung

Die Analyse der Gewebequerschnitte erfolgte mit einem konventionellen Lichtmikroskop⁴³ sowie einer angeschlossenen Kamera⁴⁴. Die Dokumentation ermöglichte ein digitales Bildanalyzesystem.⁴⁵

Die HE gefärbten Schnitte wurden in 16-, 25-, 50-, 100-, 200-, 400-facher Vergrößerung hinsichtlich Schnittqualität, Zellverteilung bzw. Auftreten von azellulären Bezirken, Vorhandensein von Fremdkörperriesenzellen oder sonstigen Entzündungszellen als Indikator für Entzündungs- bzw. Abstoßungsreaktionen und der Zell- und Kernmorphologie untersucht.

Mit Hilfe der Masson-Goldner Färbung konnte die Kollagenanordnung, die Anzahl und Ausrichtung der bindegewebigen Septen sowie die Qualität und Dicke der synovialen Deckschicht analysiert werden.

3.6 Immunhistologie

3.6.1 Theorie der Immunhistologie

In der Immunhistologie werden Antigene von Zellen oder Gewebe durch spezifische Antikörper detektiert, in einer Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden und mit einem gekoppelten Detektionssystem visualisiert.

Seit der Einführung der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper durch Coons im Jahre 1941 [40] hat sich die Sensitivität und die Spezifität erheblich verbessert, und es wurden weitere Detektionssysteme wie Peroxidase [111], Alkaline Phosphatase [103], Goldpartikel [50] und Isotope etabliert.

Die Qualität des Ergebnisses wird von der Affinität bzw. Spezifität des Primärantiköpers sowie von der Stabilität der Antigen-Antikörper-Reaktion bestimmt. Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist abhängig von Temperatur, Konzentration, Inkubationszeit, Agitation und dem optimalen Reaktionsmilieu (pH-Wert, Salzkonzentrationen). Das Ergebnis ist auch beeinflussbar durch Fixierungsart, Fixierungsdauer, Einbettungsmethoden, Vorbehandlungsmethoden (Antigen-Retrieval) der Präparate, etc. Standardisierte Protokolle sind somit unverzichtbar.

Es gibt poly- und monoklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper stammen aus verschiedenen Plasmazellen und sind deswegen im Gegensatz zu den monoklonalen, aus einer Plasmazelle stammenden, Antikörpern bezüglich ihres Antigen-Bindungsspektrums heterogen. Sie reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens gegen das sie gebildet wurden. Dies führt zu einer

⁴³ DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

⁴⁴ Sony Color Video Camera, Modell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

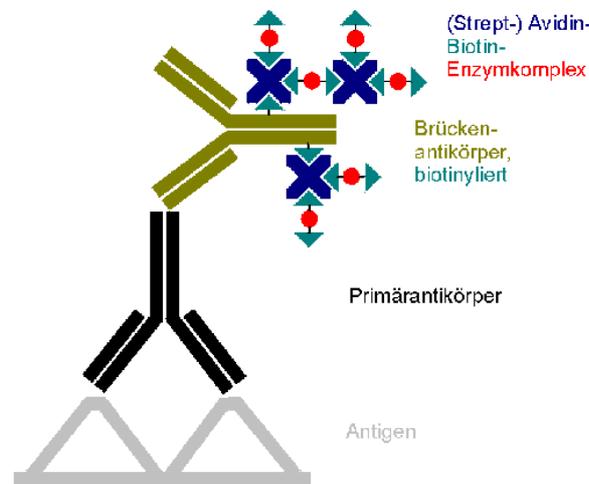
⁴⁵ KS 400 3.0, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland

größeren Sensitivität und Stabilität der Reaktion, da somit mehrere Bindungsstellen des Antigens besetzt werden. Sie besitzen allerdings gegenüber monoklonalen Antikörpern eine geringere Spezifität. Der Nachteil sind Kreuzreaktionen mit ähnlich antigenen Determinanten, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

Ferner unterscheidet man nach der Anzahl der eingesetzten Antikörpersysteme direkte und indirekte Methoden. Bei beiden Methoden wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. Im Gegensatz zu älteren direkten Methode mit einem konjugierten Primärantikörper wird bei der indirekten Methode ein zweiter Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. In unserer Studie war dies ein biotinylierter Sekundärantikörper, der mit dem Avidin-Biotin-Alkalische Phosphatase-Komplex reagiert und eine Farbentstehung mit einer Enzym-Substrat-Reaktion auslöst. Der alkalischen Phosphatase (AP) werden organische Phosphatverbindungen als Substrat angeboten. Die AP spaltet Phosphat ab, und die freigesetzte Verbindung reagiert zu einem farbigen Endprodukt.

Die Labelled (Strept)Avidin-Biotin-Methode (LSAB) beruht auf der hohen Affinität des Hühnereiweiß-Glycoproteins Avidin gegenüber dem sekundärantikörper-gebundenen Vitamin Biotin. Avidin besitzt vier Bindungsstellen und kann dadurch mehrere Markerenzyme anlagern (**Abb. 3-9**). Dieser Schritt dient der Signalverstärkung und ist sinnvoll, wenn eine geringe Menge an Epitop dargestellt werden soll. Allerdings kann sie auch durch endogene Substrate zur Hintergrundfärbung führen.

Schema: *Antigen* + *Unkonjugierter Primärantikörper* + *biotinmarkierter (=biotinylierter) Sekundärantikörper* + *Avidin-Biotin-Enzymkonjugat* + *Substrat/Chromogen* --> *Farbe*



(Strept-) Avidin-Biotin-Complex

ABC-Methode

Abb. 3-9: Darstellung der immunhistochemischen Färbemethode mit biotinyliertem Sekundärantikörper und Avidin-Biotin-Complex. Aus [70]

3.6.2 von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII-Färbung

Der von-Willebrand-Faktor ist ein Protein, das als Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII eine wichtige Rolle bei der Blutstillung spielt und nach Erik Adolf von Willebrand (1870-1949), einem finnischen Internisten, benannt wurde. Der von-Willebrand-Faktor wird von den Endothelzellen gebildet, welche die Innenwand eines Blutgefäßes (die Intima) bilden, und in den Weibel-Palade-Granula gespeichert. In unserer Studie diente der von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII zur Detektion von Endothelzellen neugebildeter Gefäßkapillaren. Zunächst wurden ausschließlich in Paraffin fixierte Querschnitte nach einem standardisierten Färbeprotokoll entparaffiniert und rehydriert. Dann wurden die Querschnitte zur Demaskierung der antigenen Epitope mit 0,1% Proteinase⁴⁶-Lösung für 10 min bei 37°C vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit Normalserum⁴⁷ bei Raumtemperatur. Das Normalserum stammt von der gleichen Tierspezies wie der später verwendete Sekundärantikörper und verhindert so unspezifische Hintergrundfärbungen durch Anlagerung von Proteinen an das Bindegewebe. Es

⁴⁶ Protease, Sigma, Nr.: P- 5147

⁴⁷ Normal Horse Serum, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

folgte die Inkubation mit einem polyklonalen von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII-Primärantikörper⁴⁸ in einer Verdünnung von 1:200 bei 4°C über Nacht.

Am Folgetag wurde nach Spülung im PBS-Puffer⁴⁹ ein biotinylierter Zweitantikörper⁵⁰ aufgebracht und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer wurde ein mit alkalischer Phosphatase als Markerenzym ausgestatteter ABC-Komplex⁵¹ (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex) für 50 min bei RT aufgetragen. Nach zweimaligem Spülen mit Chromogenpuffer⁵² wurde das Reagenz Vector[®] Red⁵³ (gelöst in 100 mM – 200 mM Tris-HCl, pH 8,2 - 8,5) aufgetragen, welches als Substrat Neofuchsin⁵⁴ enthält und von der alkalische Phosphatase zu einem roten Chromogen reduziert wird. Somit stellten sich die markierten Endothelzellen der Gefäßkapillaren rot dar. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün⁵⁵ gegengefärbt, die Präparate entwässert und abschließend mit Vitro-Clud⁵⁶ eingedeckelt.

Alle durchgeführten Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer. Als Negativkontrolle zur Bestimmung einer unspezifischen Hintergrundfärbung auf Grund unspezifischer Bindungsstellen wurde jeweils ein Präparat einer immunhistochemischen Färbereihe nur mit Pufferlösung statt mit dem Primärantikörper inkubiert. Als interne Positivkontrolle dienten Präparate gut vaskularisierter Schafhaut.

3.6.3 Quantitative Auswertung: von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII

Die Auswertung erfolgte an von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII-gefärbten 4 µm Querschnitten mit Hilfe eines konventionellen Lichtmikroskops⁵⁷ sowie einer angeschlossenen Kamera⁵⁸. Die Dokumentation wurde durch ein digitales Bildanalyzesystem⁵⁹ ermöglicht.

Zuerst wurde der Übergang zwischen der synovialen Oberfläche und dem eigentlichen kollagenen Bindegewebe in 50facher Vergrößerung in den konventionell gefärbten Schnitten bestimmt. Zur Bestimmung der genauen Gefäßdichte und -verteilung im Transplantat wurden die immunhistologisch angefärbten Querschnitte in eine subsynoviale, eine intermediäre und

⁴⁸ Anti-Human von Willebrand Factor Cat.#CP039C, Biocare Medical, Concord, CA, USA

⁴⁹ 3L 175 Phosphatpuffer Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

⁵⁰ Horse Anti- Mouse IgG secondary antibody, Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA

⁵¹ ABC kit, Alkaline Phosphatase Standard AK-5000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

⁵² Trizma[®] Base T-1503, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Trizma[®] Hydrochloride T-3253, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt

⁵³ Vector[®] Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

⁵⁴ Dako ChemMate, Dako A/S, Dänemark

⁵⁵ Certistain[®] Methylgrün, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

⁵⁶ Vitro-Clud[®], R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

⁵⁷ DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

⁵⁸ Sony Color Video Camera, Modell DXC-950P, Sony Corporation, Japan

⁵⁹ KS 400 3.0, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland

eine zentrale Schicht unterteilt (**Abb. 3-10**). Hierfür wurde der Mittelpunkt des Querschnitts definiert und die Fläche zwischen der Grenzschicht von synovialer Hüllschicht und Transplantatgewebe bis zum Mittelpunkt gedrittelt. In jedem Präparat wurden in 200facher Vergrößerung subsynovial (SUB) acht, intermediär (MID) sechs und zentral (CNT) drei repräsentative Gesichtsfelder ausgewählt, die Anzahl an angefärbten Gefäßquerschnitten pro Gesichtsfeld (je 0.06 mm²) ermittelt und die mittlere Anzahl der Gefäßquerschnitte/mm² errechnet.

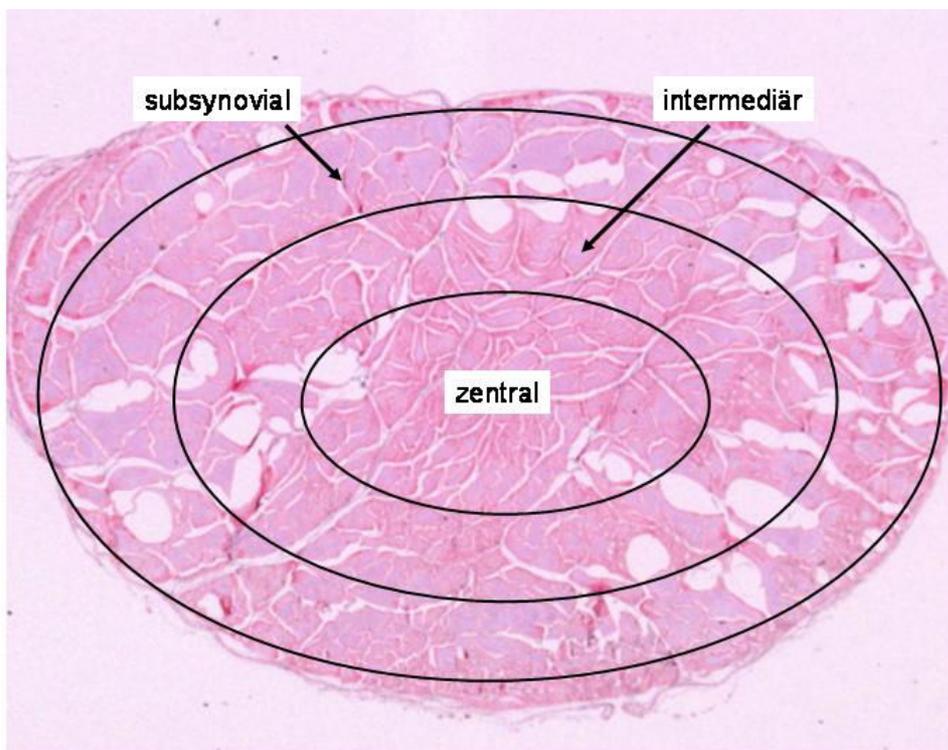


Abb. 3-10: Darstellung der Unterteilung der Faktor VIII-Querschnittspräparate in eine subsynoviale, intermediäre und zentrale Zone zur Quantifizierung der Gefäßdichte

3.7 Statistik

Zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde zunächst ein Shapiro-Wilk-W-Test durchgeführt. Da jedoch weder die Ergebnisse der Biomechanik noch die Resultate der Immunhistologie normalverteilt waren, diente der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Rangsummen-Test zur statistischen Analyse unserer Ergebnisse. Das Signifikanzniveau wurde für $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorbemerkung

Die operative sowie postoperative Phase der Tierversuche verlief komplikationslos. Sämtliche durch Arthrotomie und Transplantatentnahme verursachten Wunden verheilten regelrecht. Die Ganganalyse der Schafe ergab im Durchschnitt eine uneingeschränkte Belastung der operierten Gelenke nach ca. 3-4 Wochen. Kein Tier musste aus der Studie ausgeschlossen werden.

In den folgenden Abschnitten werden unsere Ergebnisse in Bezug zu der in Abschnitt 3.1 genannten Vorstudie gesetzt. Dabei dienten uns deren Resultate bei der Untersuchung von unsterilisierten Allografts und Autografts zum Vergleich.

4.2 Makroskopische Auswertungen

4.2.1 Standzeit 0 Wochen

Makroskopisch zeigte sich das native vordere Kreuzband von einer gut vaskularisierten, synovialen Hülle umgeben, während die PES-sterilisierte Flexorsehne zum Zeitpunkt Null von einem dünnen Peritendineum überzogen war.

4.2.2 Frühe Remodelingphase (Standzeit 6 Wochen)

Nach 6 Wochen zeigte das operierte Kniegelenk mit Ausnahme leichter Einschränkungen in der Flexion eine physiologische Beweglichkeit. Außerdem stellten sich Entzündungszeichen wie ein seröser Gelenkerguss und Gefäßinjektionen der Synovialis dar. Bei zwei Tieren war der Gelenkerguss leicht blutig im Rahmen eines Hämarthros. Das Transplantat war von einer reichlich vaskularisierten und hyperplastischen Synovialschicht umhüllt. (**Abb. 4-1**)

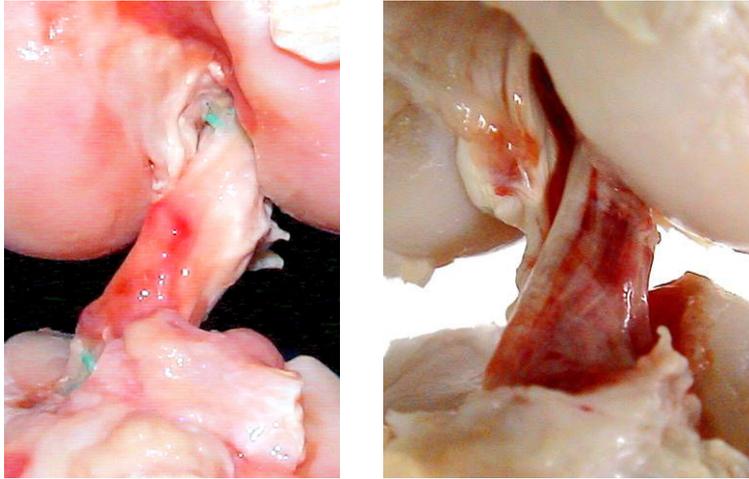


Abb. 4-1: Makroskopische Aufnahme des PES-Allografts nach 6 Wochen (**links**) und nach 12 Wochen (**rechts**)

4.2.3 Intermediäre Remodelingphase (Standzeit 12 Wochen)

Die makroskopische Untersuchung nach 12 Wochen zeigte eine weiterhin leicht eingeschränkte Flexion im Kniegelenk mit schwereren Entzündungszeichen. Bei 66,67% (6/9 Tiere) der operierten Kniegelenke zeigten sich am tibialen Knochentunnel-Eingang ausgeprägte, fibrotische Hypertrophien. Histologisch bestanden diese aus Knorpel, Fettgewebe und Kollagenfasern. Ferner fanden sich leichte Gelenkknorpelschäden femoral wie tibial. Andere Charakteristika waren ausgeprägte seröse sowie leicht blutige Gelenkergüsse und eine ausgeprägte Gefäßinjektion in die Synovia des Transplantates. Das Transplantat war teilweise aufgefasert und weiterhin von einer hyperplastischen Synovialschicht umhüllt (**Abb. 4-2**).

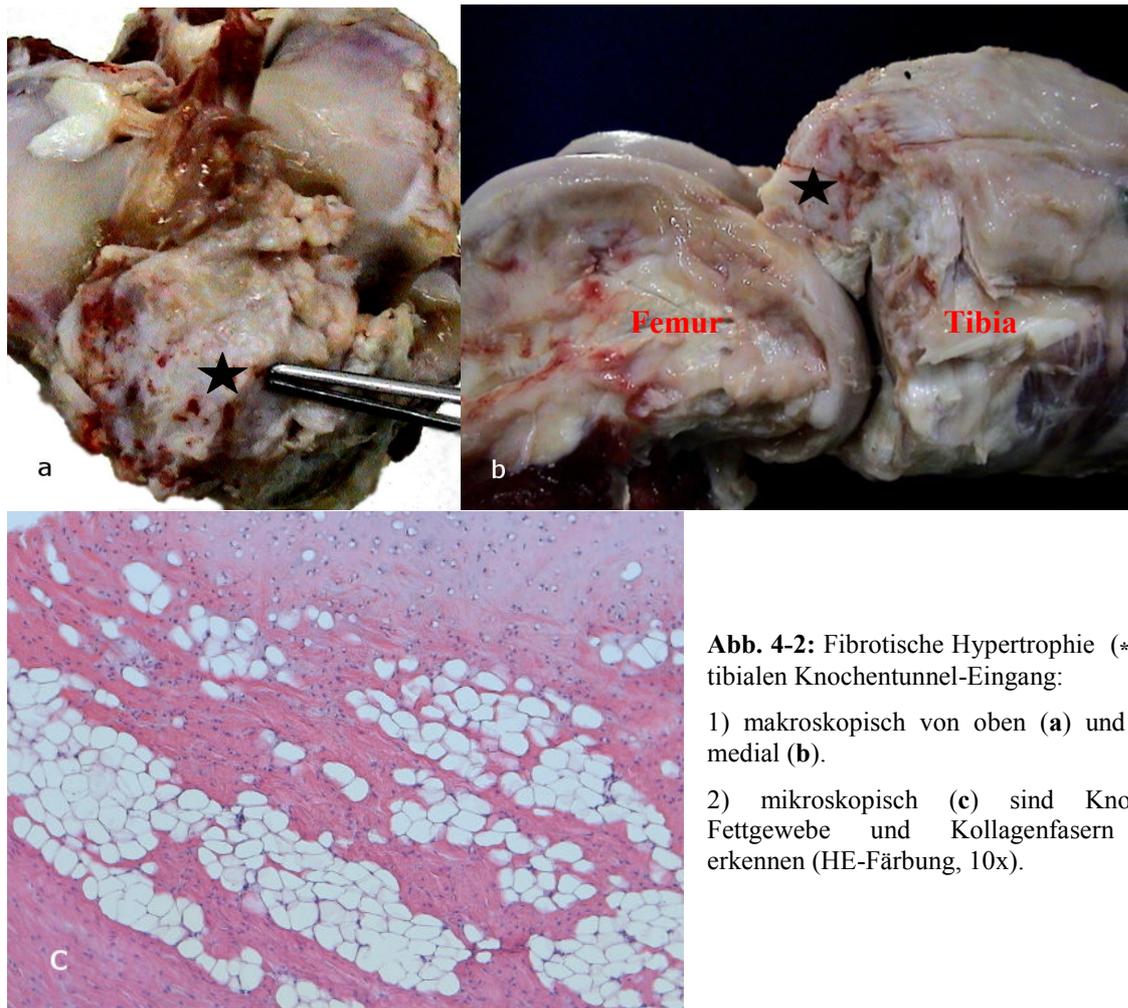


Abb. 4-2: Fibrotische Hypertrophie (*) am tibialen Knochentunnel-Eingang:

1) makroskopisch von oben (a) und von medial (b).

2) mikroskopisch (c) sind Knorpel, Fettgewebe und Kollagenfasern zu erkennen (HE-Färbung, 10x).

4.3 Mikroskopische Auswertungen

4.3.1 Konventionelle Färbungen: Deskriptive Auswertung

Native Strukturen

Im nativen vorderen Kreuzband und in der nativ unbehandelten Flexorsehne zeigte sich eine homogene zwischen den Kollagenfasern ausgerichtete Zellanordnung. Dabei waren die Zellkerne der Fibroblasten im nativen VKB überwiegend ovoid bis stabförmig. Deskriptiv fanden sich in der nativ unbehandelten Flexorsehne weniger Zellen, deren Morphologie zudem überwiegend spindelförmig war. Ein stabförmiges bzw. ovoides Erscheinungsbild ist dabei ein Hinweis auf die intensive Syntheseaktivität der Zelle (Fibroblasten), während spindelförmige Zellen sich im inaktiven Ruhezustand befinden (Fibrozyten)[82]. In der Masson-Goldner (MG) Färbung imponierte eine geordnete Kollagenstruktur, die von Bindegewebssepten mit Gefäßen durchzogen wurde. Insgesamt erschien jedoch der Anteil der Gefäße geringer und die Kollagenstruktur in der Flexorsehne weniger stark ausgeprägt. Die synoviale Deckschicht bzw.

das Peritendineum bestand bei beiden aus ca. 3-5 Zellschichten eines mehrschichtigen Epithels (**Abb. 4-3**).

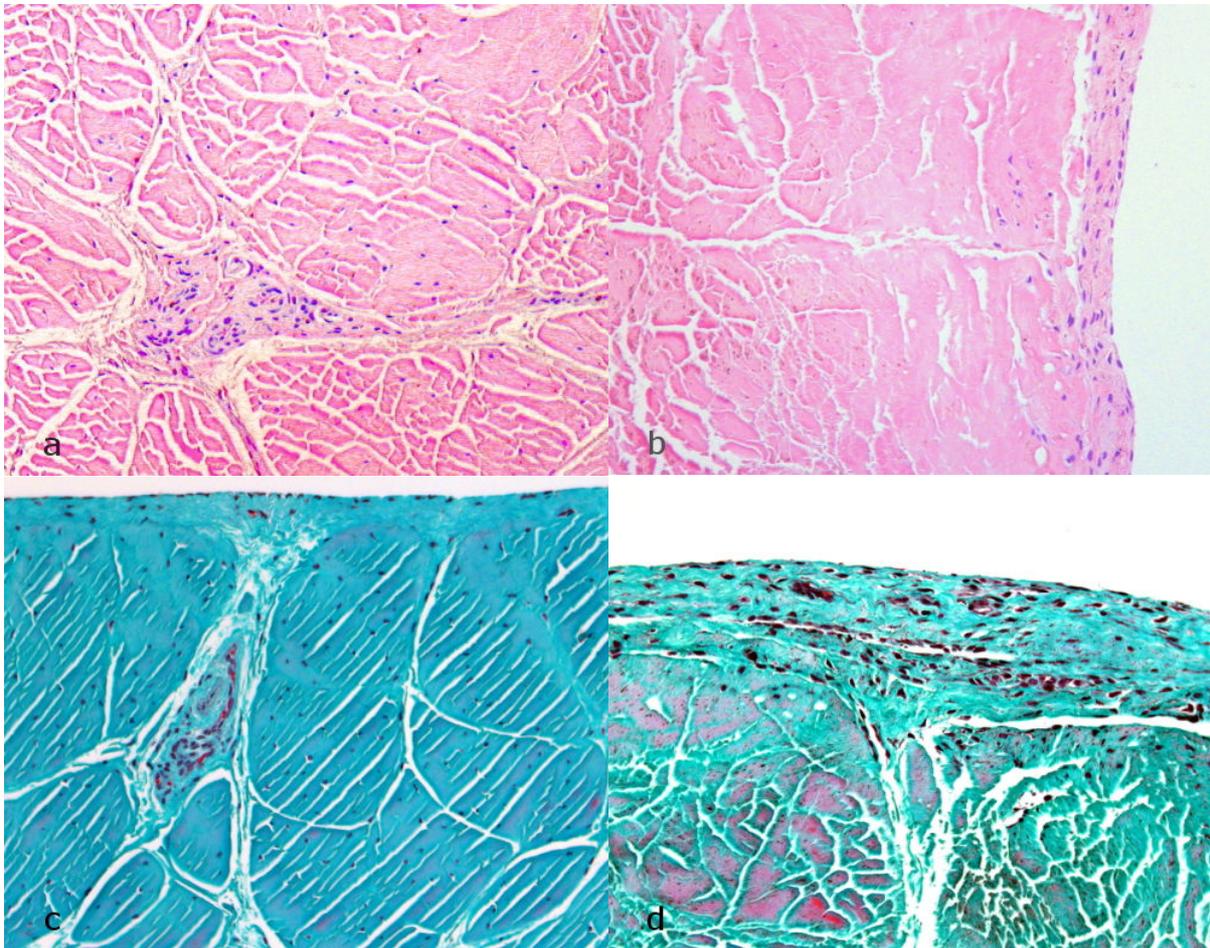


Abb. 4-3: VKB-nativ (a,c) und Flexorsehne nativ (b,d) (subsynovial, Querschnitt, HE-Färbung (oben), MG-Färbung (unten), 200x)

PES-sterilisiertes Allograft Zeitpunkt 0 Wochen

Die PES-behandelte Flexorsehne stellte sich histologisch zum Zeitpunkt Null vor Implantation als strukturell intaktes straffes Bindegewebe dar. Im Vergleich zur unbehandelten Flexorsehne war deskriptiv kein Unterschied in Bezug auf Zellen und Gefäße festzustellen. Allerdings schienen die Abstände zwischen den Kollagenfaserbündeln verbreitert, und es kam bei der Aufbereitung zu mehr Artefakten als bei der nativen Flexorsehne (**Abb. 4-4**).

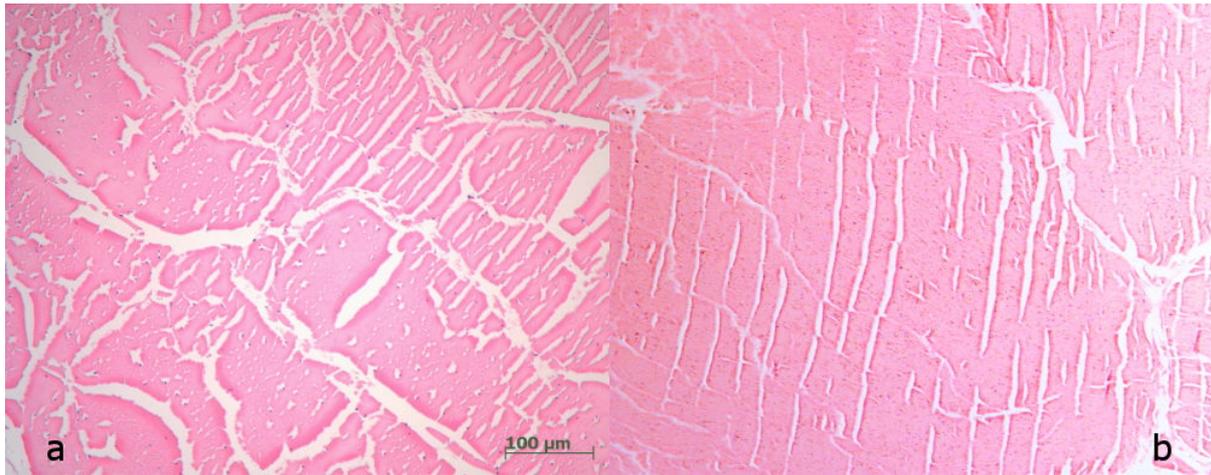


Abb. 4-4: PES-sterilisiertes Allograft nach 0 (a) und 6 (b) Wochen (zentral, Querschnitt, HE-Färbung, 200x)

PES-sterilisiertes Allograft Zeitpunkt 6 Wochen

In den konventionellen Färbungen zeigte sich ein weitgehend avitales Bandgewebe mit einer inhomogenen Zell- und Gefäßverteilung. Während sich das Transplantatzentrum azellulär präsentierte, lagen in der intermediären und peripheren Schicht zunehmend vereinzelt hyperzelluläre Bezirke neben dominierenden azellulären Bereichen. Von einer reichlich vaskularisierten synovialen Hüllschicht ausgehend, fanden sich subsynovial vereinzelt Bindegewebssepten mit Ansammlungen kleiner Gefäße. Zentral und intermediär dominierten avaskuläre Bereiche. In der Transplantatperipherie fanden sich fokale Areale einer chronisch granulierenden Entzündung mit Fibroblastenproliferation, Kapillareinsprossung und einer leichten Infiltration von Granulozyten und Lymphozyten. Die Kollagenstruktur wirkte überwiegend ungeordnet. Die synoviale Hüllschicht bestand aus ca. 6-8 Zellschichten mit lokalen Hyperplasien mit bis zu 20 Zellschichten (**Abb. 4-5**).

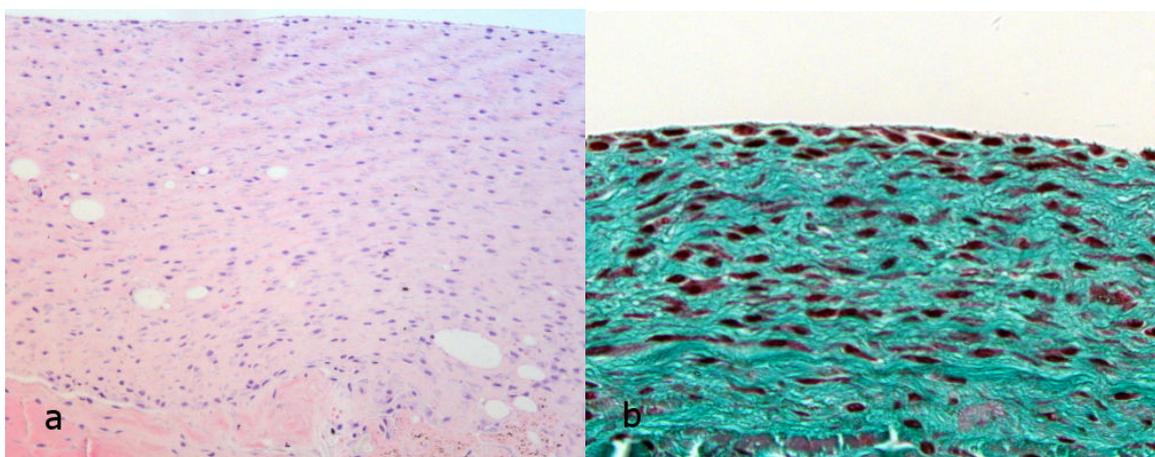


Abb. 4-5: PES-sterilisiertes Allograft nach 6 Wochen mit lokalen, synovialen Hyperplasien mit bis zu 20 Zellschichten (a: Querschnitt, HE-Färbung, 200x; b: Querschnitt, MG-Färbung, 400x)

PES-sterilisiertes Allograft Zeitpunkt 12 Wochen

Nach 3 Monaten erschien die Zell- und Gefäßdichte vor allem in den peripheren und intermediären Regionen gestiegen. Dennoch fand sich weiterhin eine relativ inhomogene Zell- und Gefäßverteilung mit einer großen Varianz zwischen den einzelnen Tieren. Während subsynovial hyperzelluläre und hypervaskularisierte Bereiche mit einsprossendem Granulationsgewebe dominierten, bestand intermediär ein Gleichgewicht bzw. fanden sich zum Teil mehr hypozelluläre und hypovaskularisierte Bereiche. Das Transplantatzentrum präsentierte sich immer noch weitgehend avital. Die Kollagenstruktur hatte an Ordnung gewonnen, wirkte jedoch deutlich ungeordneter als die native Flexorsehne. Die leichte chronisch granulierende Entzündung erschien nahezu unverändert. Ferner war auch die synoviale Hüllschicht weiterhin reaktiv verändert und bestand aus ca. 4-8 Zellschichten mit lokalen Hyperplasien mit bis zu 20 Zellschichten (**Abb.4-6**).

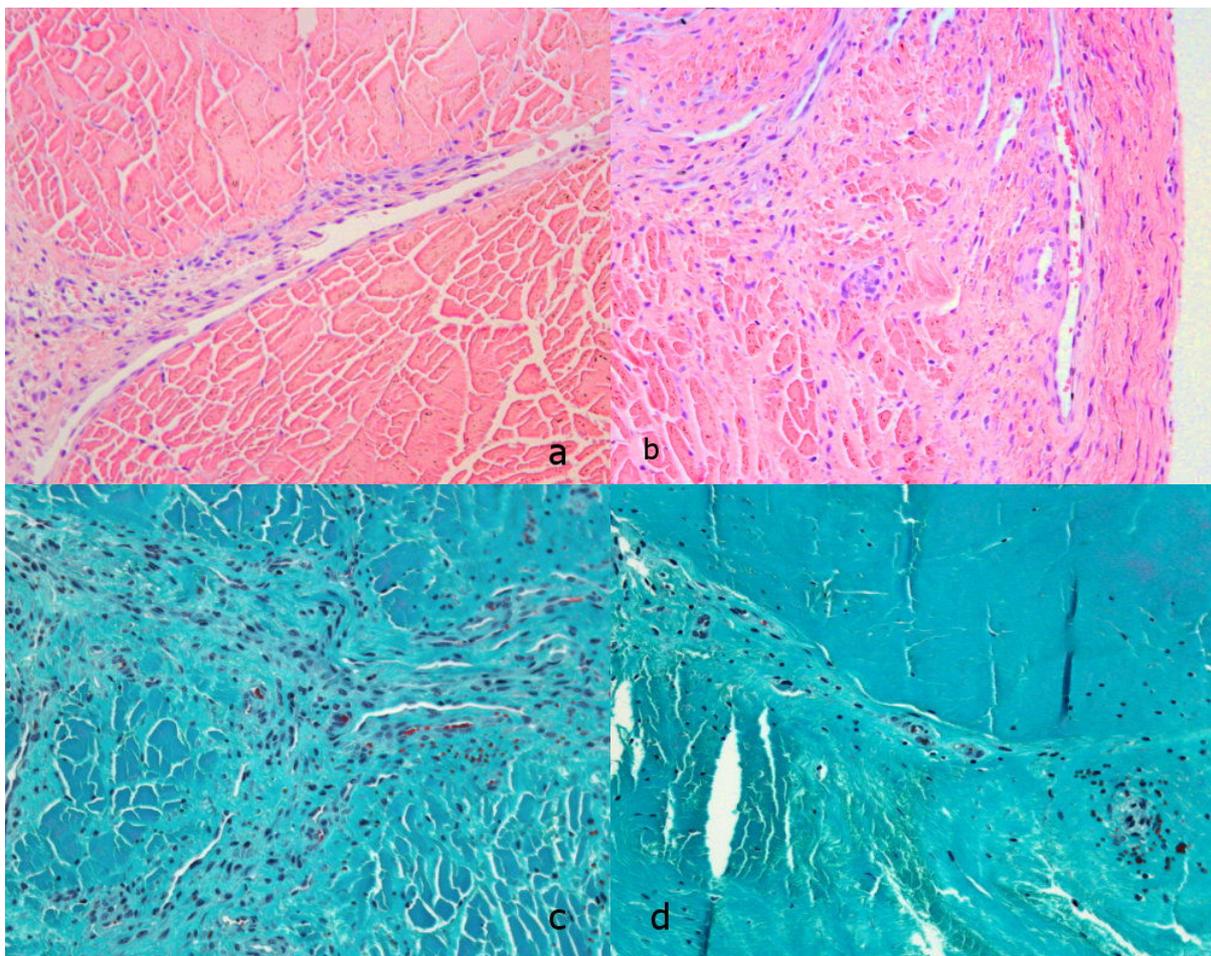


Abb. 4-6: PES-sterilisiertes Allograft nach 12 Wochen: Während von der, aus ca. 4-8 Zellschichten bestehenden, synovialen Hülle (**b**) bereits viele Zellen entlang der fingerförmig einwachsenden Bindegewebsstränge (**a**) in subsynoviale Regionen gewandert waren, präsentierten sich die zentralen und die intermediären (**c,d**) Bereiche noch inhomogen rezellularisiert. (**a,b**: subsynovial, Querschnitt, HE-Färbung, 200x. **c,d**: Querschnitt, MG-Färbung, 200x)

4.3.2 Immunhistologie: Auswertung von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII

PES-sterilisiertes Allograft Zeitpunkt 0 versus native Strukturen

In der immunhistologischen Färbung des von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII ließ sich in der PES-behandelten Flexorsehne (PES 0 Wochen) zum Zeitpunkt Null im Vergleich zum nativen vorderen Kreuzband (VKB nativ) über allen drei vorher definierten Zonen eine niedrigere Anzahl an Gefäßanschnitten nachweisen (**Abb. 4-8**). Während subsynovial (sub) und intermediär (mid) die Unterschiede signifikant ($p_{\text{sub}} = 0,0001$, $p_{\text{mid}} = 0,0001$) waren, bestand trotz stark differierender Mediane (14 vs. 22 Gefäßanschnitte/ mm^2) keine Signifikanz in der zentralen Region (cnt). Hingegen fand sich im Vergleich mit der unbehandelten Flexorsehne (FSN nativ) eine signifikant erniedrigte Gefäßdichte über allen drei Zonen ($p < 0,05$). Ferner zeigte die unbehandelte Flexorsehne gegenüber dem nativen vorderen VKB im intermediären Bereich eine signifikant erhöhte Gefäßdichte ($p = 0,001$). Der Unterschied in den anderen Bereichen erwies sich als nicht signifikant (**Abb. 4-7**).

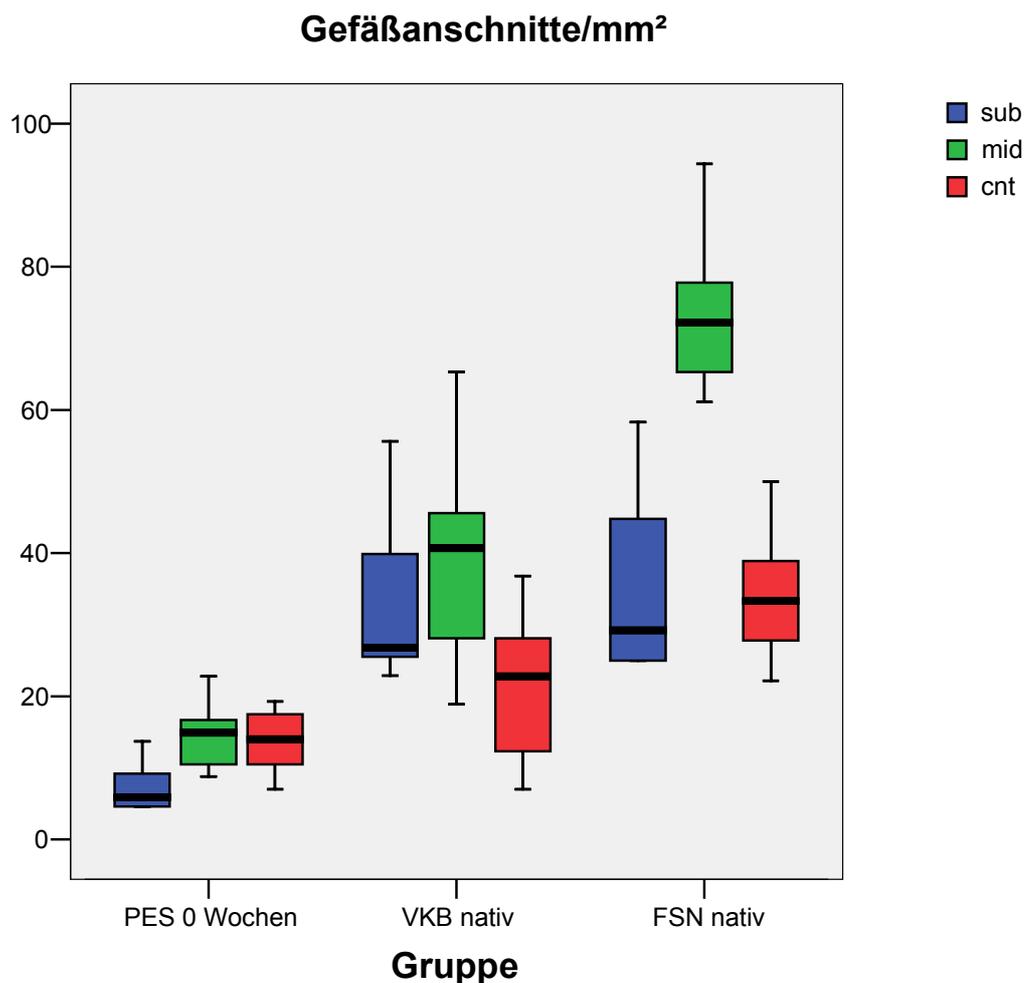


Abb. 4-7: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allografts zum Zeitpunkt 0 versus native Strukturen

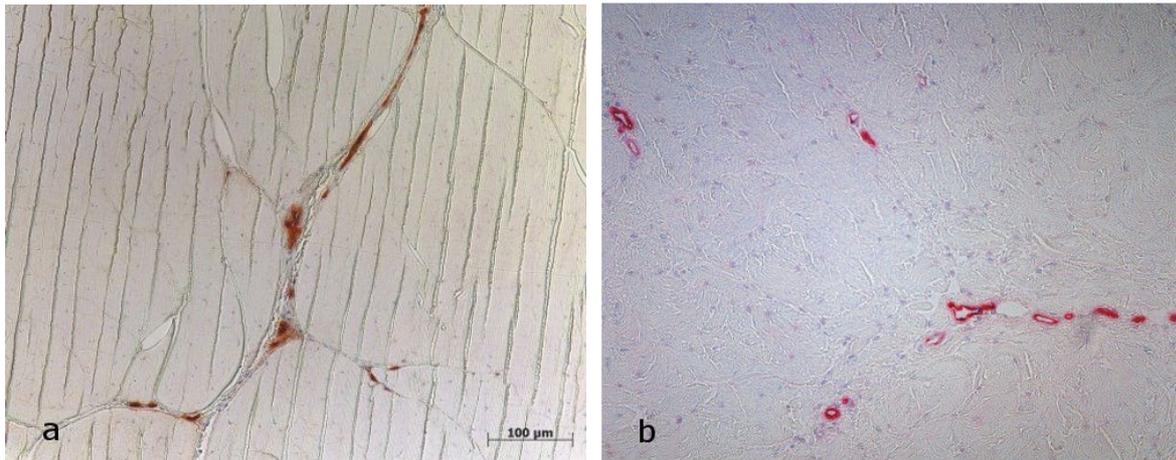


Abb. 4-8: Gefäßanschnitte der PES-sterilisierte Flexorsehne zum Zeitpunkt 0 (a) und des nativen VKB (b) im Vergleich (intermediär, Faktor VIII-Färbung, 200x)

PES-sterilisiertes Allograft im zeitlichen Verlauf des Remodelings

In der PES-behandelten Flexorsehne waren zum Zeitpunkt Null die meisten Gefäßanschnitte im intermediären Bereich (Median: 14,9/mm², Max: 22,8/mm², Min: 8,8/mm²) zu finden. Der Unterschied in der Gefäßdichte war allerdings nur im Vergleich zur subsynovialen Zone (Median: 5,9/mm², Max: 13,7/mm², Min: 4,6/mm²) signifikant (p= 0,02). Die Gefäßdichte in den zentralen Bereichen betrug im Median 14,0 Gefäßanschnitte/mm² (Max: 19,3/mm², Min: 7/mm²).

Nach 6 Wochen Standzeit kam es zu einem Abfall der Gefäßdichte in den intermediären (Median: 5,3/mm², Max: 32,6/mm², Min: 1,8/mm²) und zentralen (Median: 3,5/mm², Max: 17,5/mm², Min: 0,0/mm²) Regionen, welcher allerdings nur in der Transplantatmitte signifikant war (p= 0,003). In der subsynovialen Zone der PES-behandelten Allografts kam es innerhalb von 6 Wochen zu einem nicht signifikanten Anstieg der Kapillardichte im Median auf 7,8 Gefäßanschnitte/mm² (Max: 72,8/mm², Min: 2,2/mm²) (**Abb. 4-10**).

Bis zur 12. Woche des Remodelings kam es gegenüber der 6-Wochengruppe zu einem Anstieg der Gefäßdichte über allen Zonen (intermediär = Median: 17,5/mm², Max: 190,4/mm², Min: 0,9/mm²; zentral = Median: 5,3/mm², Max: 156,1/mm², Min: 0,0/mm²). Allerdings war nur der Anstieg in der subsynovialen Zone auf im Median 48,5 Gefäßanschnitte/mm² (Max: 189,0/mm², Min: 14,5/mm²) signifikant (p= 0,02) (**Abb. 4-9**).

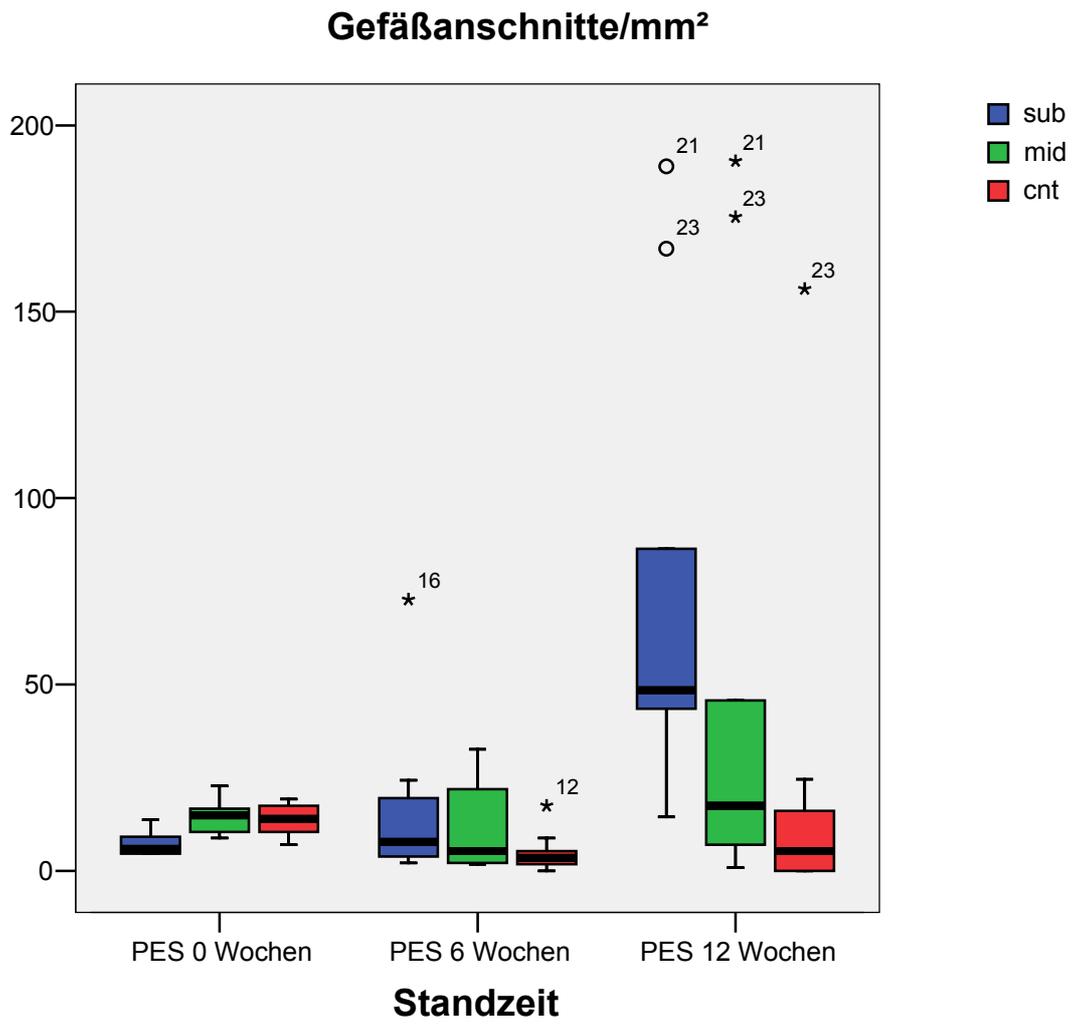


Abb. 4-9: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allograft im zeitlichen Verlauf des Remodelings

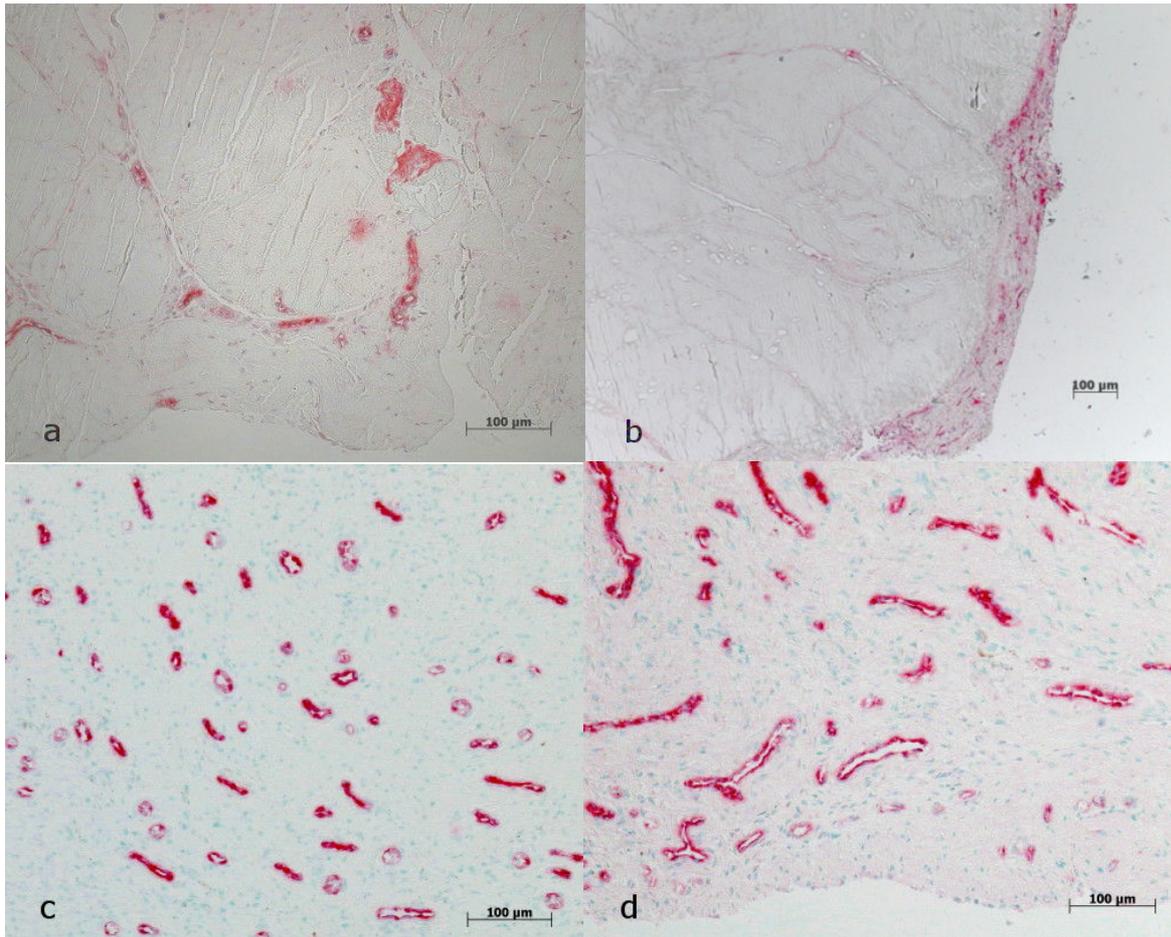


Abb. 4-10: subsynoviale Region der PES-sterilisierten Allografts nach 6 Wochen (**a:** Faktor VIII-Färbung, 200x; **b:** Faktor VIII-Färbung, 100x). Hypervaskularität nach 12 Wochen in den subsynovialen (**d**) und intermediären (**c**) Bezirken der PES-Allografts (Faktor VIII-Färbung, 200x)

PES-sterilisiertes Allograft versus Kontrollgruppen

In der 6. Woche des Transplantatremodelings fand sich bei den PES-behandelten Transplantaten im Vergleich zu den unsterilisierten Allografts (ALLO) sowie zu den Autografts (AUTO) der bereits erwähnten Vorgängerstudie in allen drei Zonen eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Anzahl an Gefäßanschnitten pro mm^2 . Dabei nahm die Gefäßdichte in der PES- und ALLO-Gruppe von subsynovial zur Transplantatmitte hin ab. In der AUTO-Gruppe fanden sich allerdings die meisten Gefäßanschnitte/ mm^2 im intermediären Bereich.

Im Vergleich zu der nativen Flexorsehne (FSN nativ) und dem nativen Kreuzband (VKB nativ) bestand bei den PES-sterilisierten Allografts über den gesamten Transplantatquerschnitt nach 6 Wochen eine signifikante ($p < 0,05$) Hypovaskularität (**Abb. 4-11**).

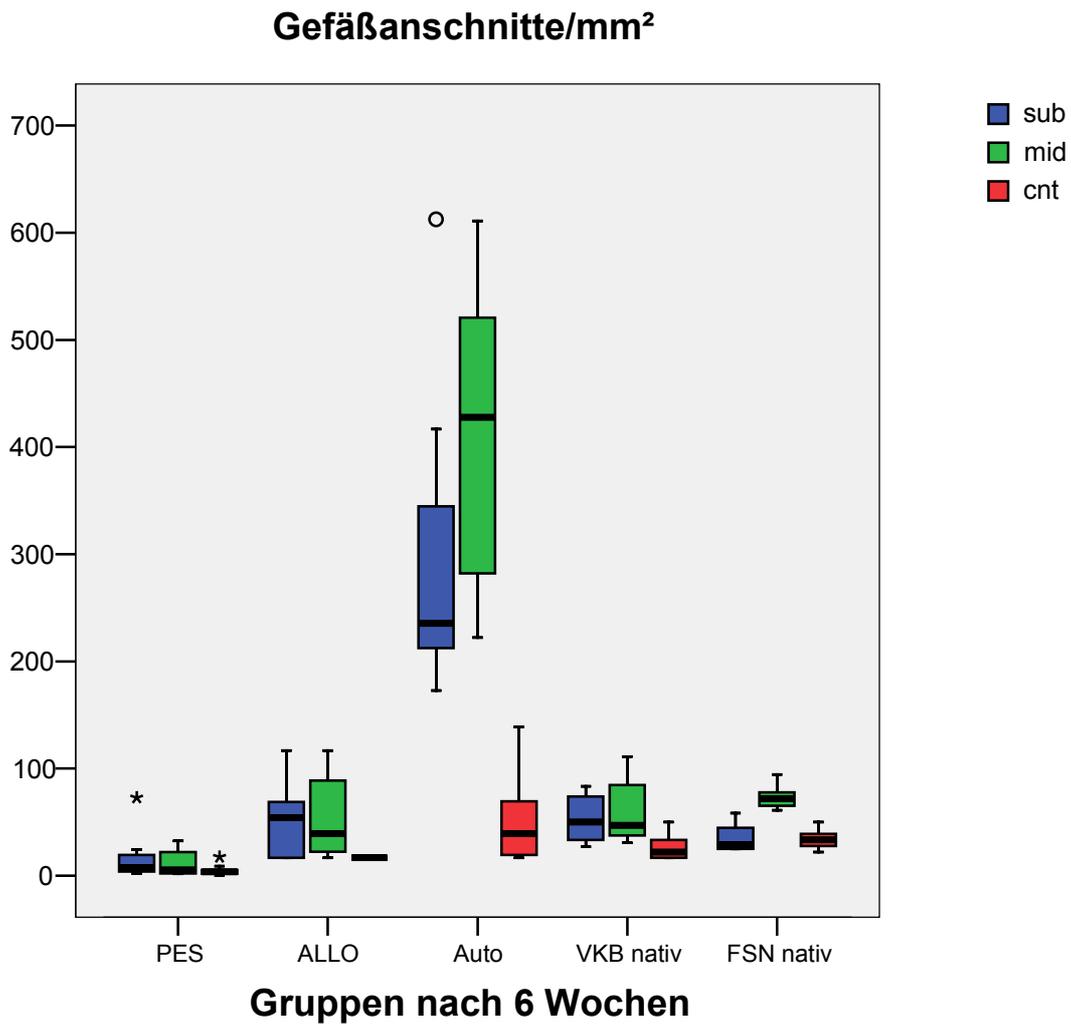


Abb. 4-11: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allografts versus Kontrollgruppen nach 6 Wochen

Auch noch nach 12 Wochen ergab sich bei den PES-Allografts eine in Bezug zu den AUTO- und ALLO-Gruppen signifikant geringere Gefäßdichte über fast alle Regionen. Einzig in der subsynovialen Zone zeigte sich im Verhältnis zu den unsterilisierten Allografts trotz stark abweichender Mediane (48,5 vs. 200 Gefäßanschnitte/mm²) eine nicht signifikant geringere Gefäßdichte (**Abb. 4-12**).

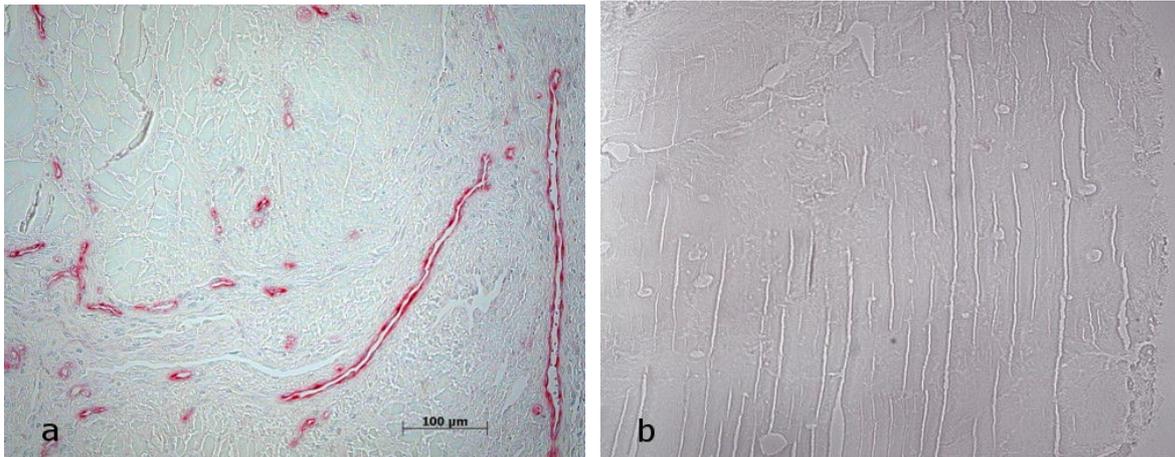


Abb. 4-12: Darstellung der großen Varianz im Gefäßstatus zwischen den einzelnen PES-Allografts nach 12 Wochen (**a,b:** subsynovial, Faktor VIII-Färbung, 200x)

Im Vergleich zum nativen VKB waren die subsynovialen Bereiche in der PES-Gruppe in der 12. Woche des Remodelings signifikant stärker vaskularisiert ($p= 0,019$). Die Transplantatmitte präsentierte sich hingegen weiterhin mit einer Gefäßdichte von 5,3 Gefäßanschnitte/ mm^2 gegenüber dem nativen VKB signifikant hypovaskularisiert ($p= 0,04$). In der Intermediärzone war der Unterschied der Gefäßdichte im Median von 40,7 Gefäßanschnitte/ mm^2 im nativen VKB gegenüber 17,5 Gefäßanschnitte/ mm^2 bei der PES-12-Wochengruppe nicht signifikant. Im Vergleich zur nativen Flexorsehne war die subsynoviale Zone der PES-12-Wochengruppe mit einer Gefäßdichte von 48,5 Gefäßanschnitte/ mm^2 hypervaskularisiert, jedoch nicht signifikant (**Abb. 4-13**). Die Intermediär- und Zentralzone zeigten sich gegenüber der nativen Flexorsehne deutlich weniger vaskularisiert. Allerdings war der Unterschied nur in den zentralen Bereichen signifikant ($p= 0,012$).

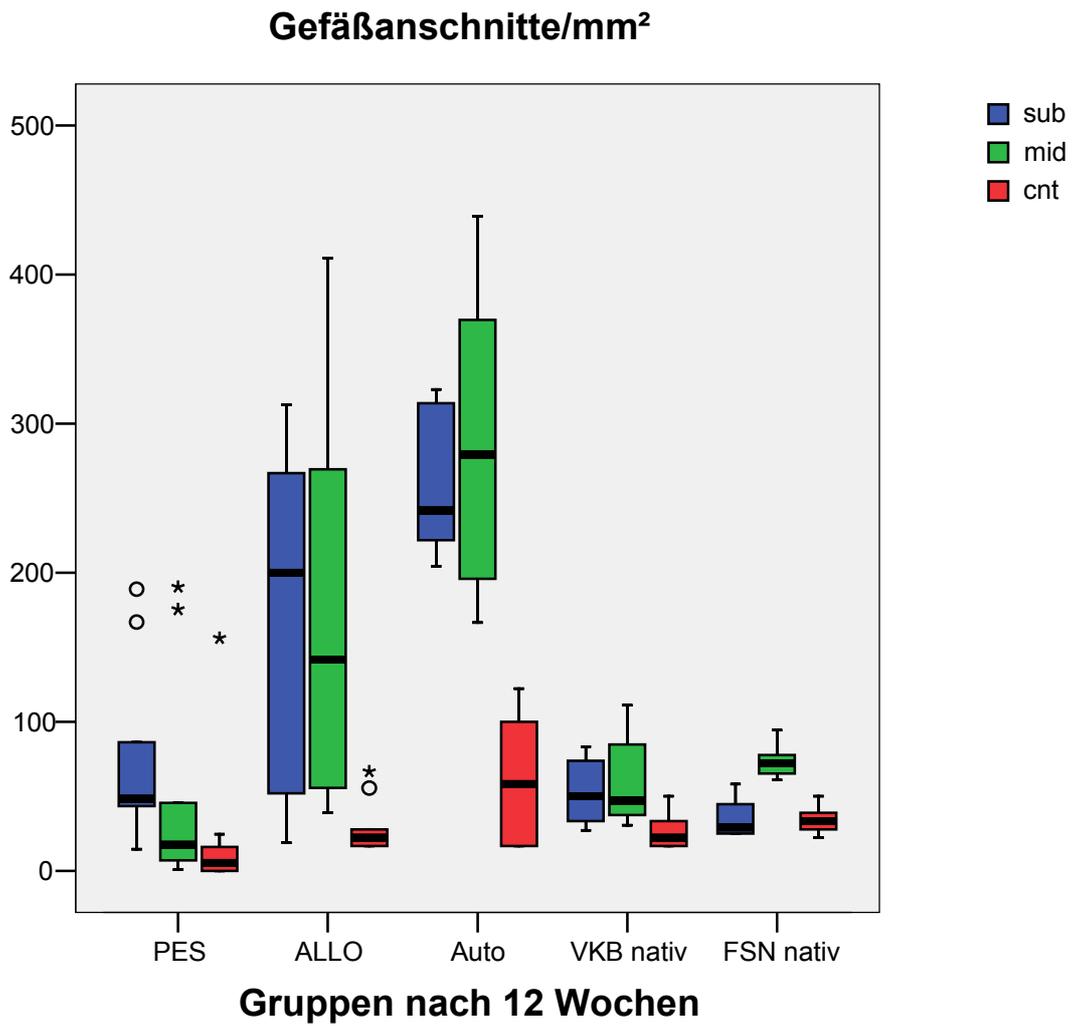


Abb. 4-13: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allografts versus Kontrollgruppen nach 12 Wochen

4.4 Biomechanik

4.4.1 PES-Allograft nach 6 Wochen

Vorderer und hinterer Schubladentest (Knie komplett)

Die mittlere Laxizität (Mittelwert: $5,1 \pm 3,1$ mm) und die Steifigkeit (Mittelwert: $38,1 \pm 29$ N/mm) des kompletten Kniegelenks samt Weichteilmantel und Streckapparat der PES-Allografts war im Schubladentest nach 6 Wochen gegenüber den Referenzgruppen (unsterilisierte Allografts und Autografts) nicht signifikant verändert ($p < 0,05$) (Abb. 4-14).

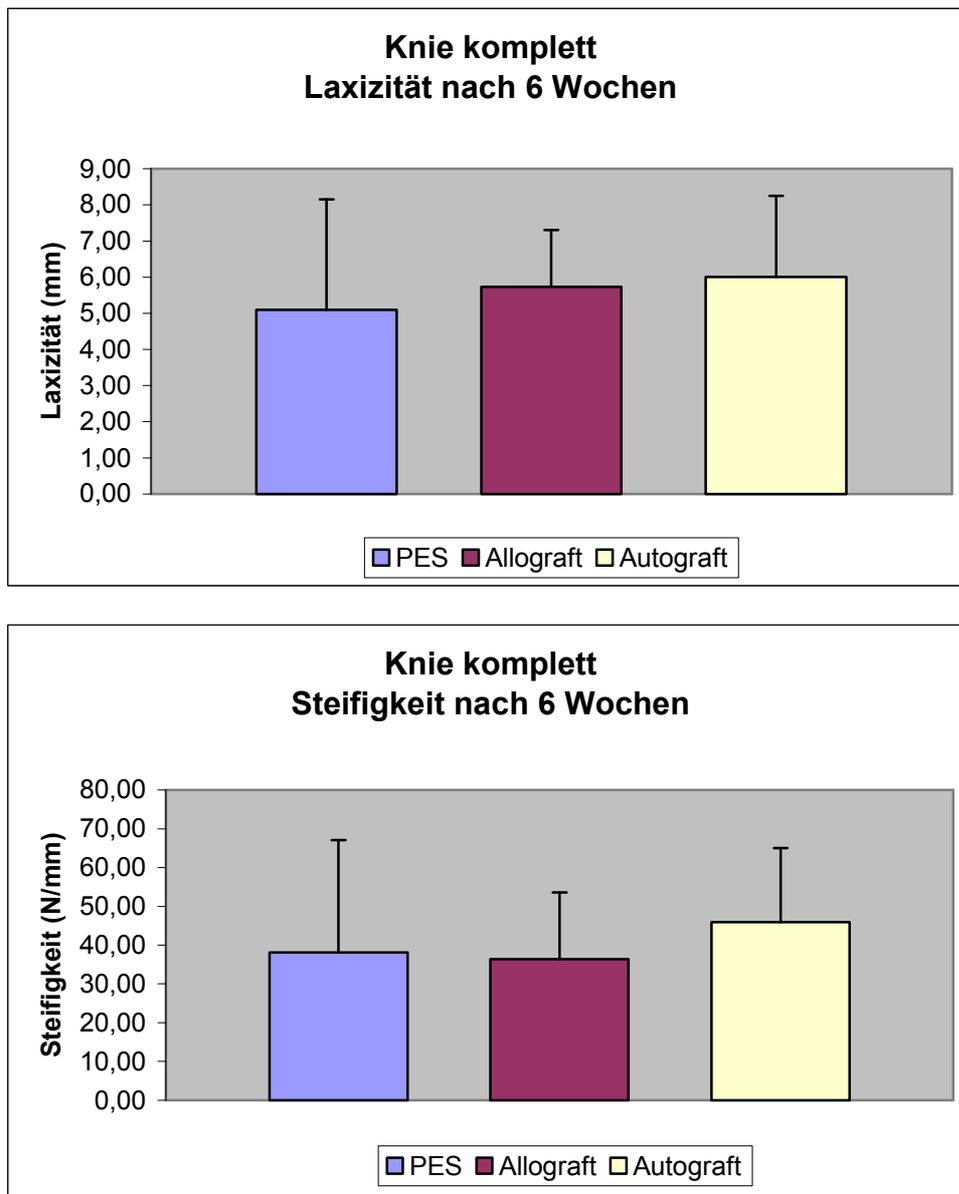


Abb. 4-14: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts (Knie komplett) nach 6 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest

Vorderer und hinterer Schubladentest (PES-Allograft/HKB nativ)

Nach 6 Wochen war auch die mittlere Laxizität (Mittelwert: $9,2 \pm 5,7$ mm) und die Steifigkeit (Mittelwert: $33,6 \pm 17,2$ N/mm) des PES-Allografts mit dem nativen HKB im Schubladentest im Vergleich zu den Referenzgruppen nicht signifikant verändert ($p < 0,05$) (Abb. 4-15).

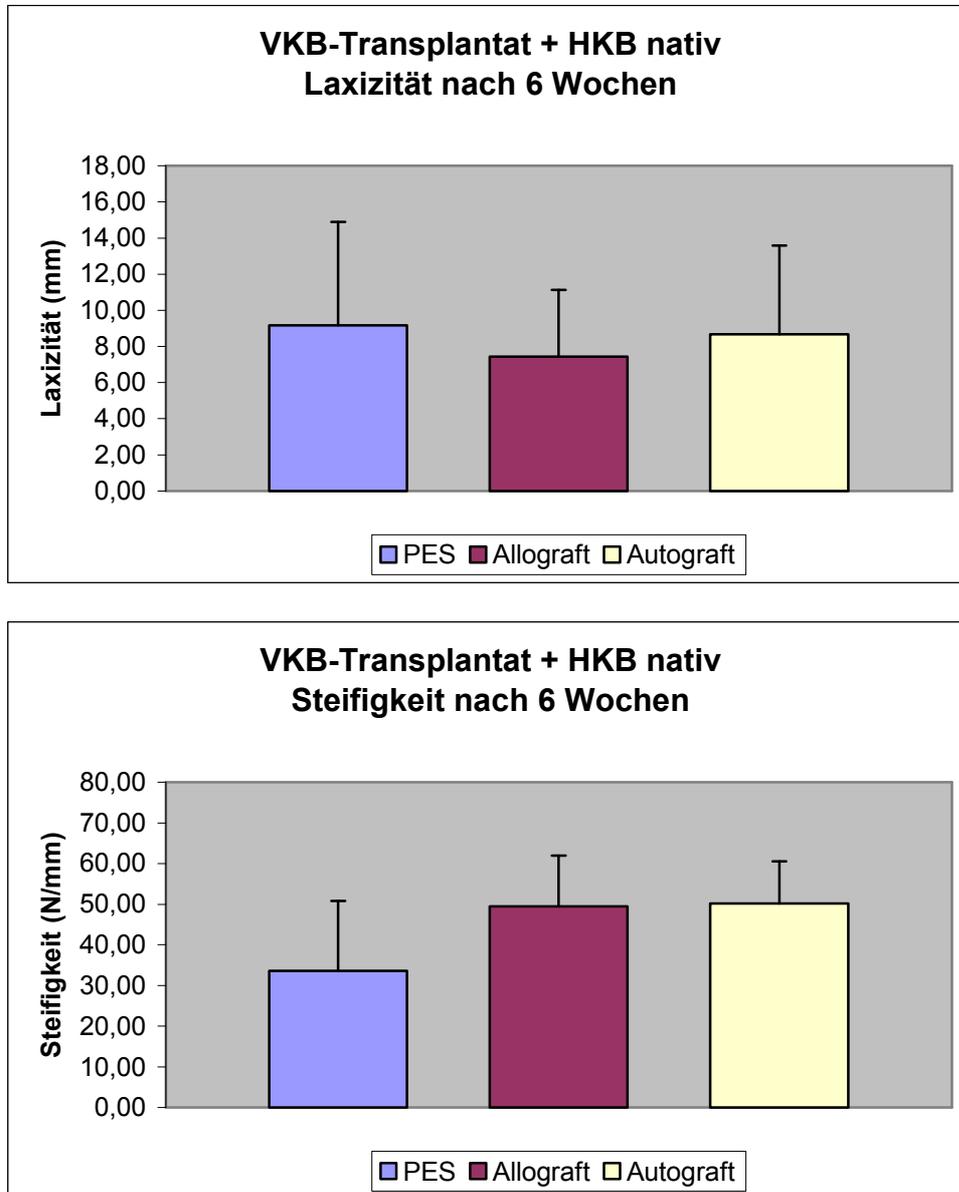
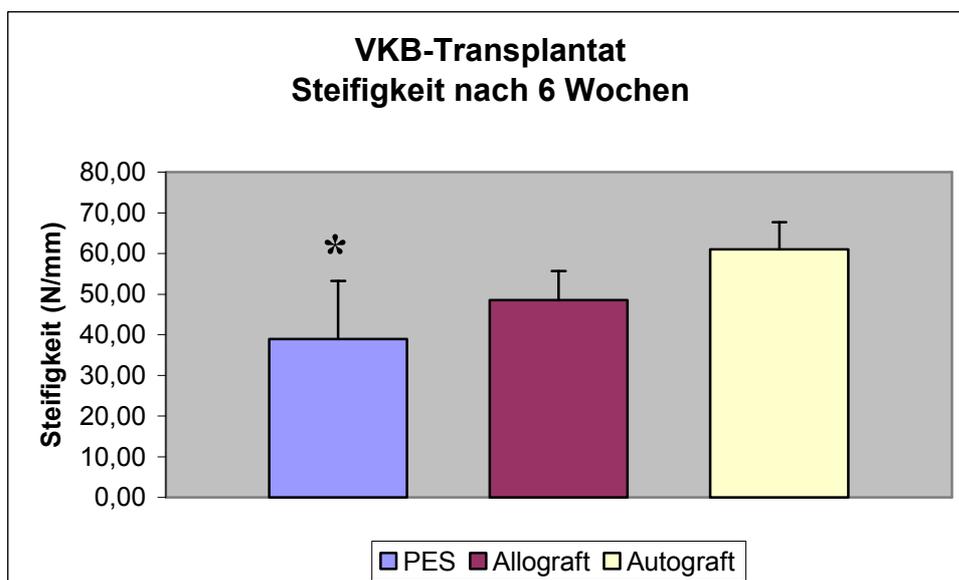
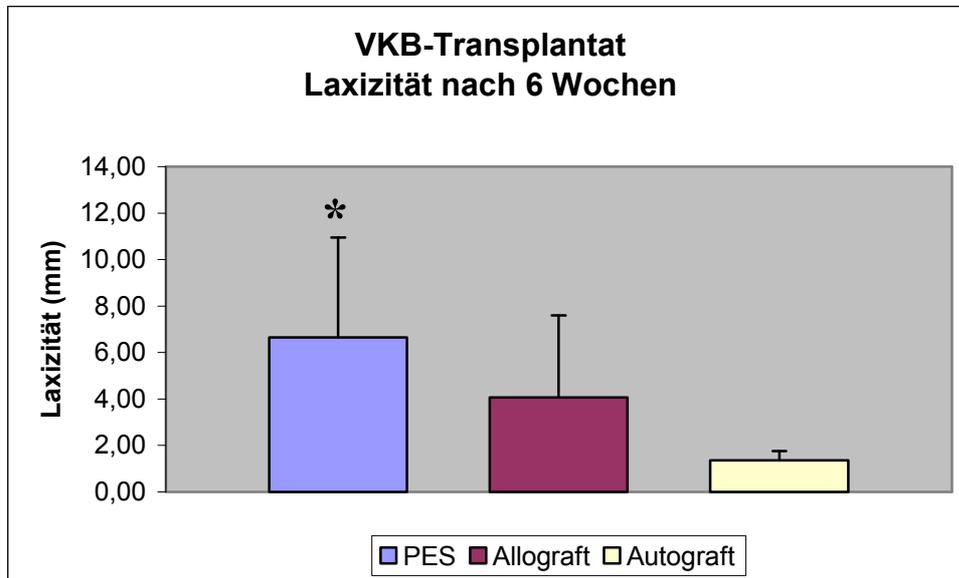


Abb. 4-15: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts/HKB nativ nach 6 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest

Vorderer Schubladentest

Im vorderen Schubladentest war erneut eine erhöhte mittlere Laxizität ($6,6 \pm 4,3$ mm) im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu verzeichnen, wobei der Unterschied zur Autograft-Gruppe (Laxizität: $1,4$ mm \pm $0,4$) signifikant war ($p = 0,005$).

Die mittlere Steifigkeit der PES-behandelten Allografts (Mittelwert: $38,9 \pm 14,4$ N/mm) zeigte sich nach 6 Wochen gegenüber den unsterilisierten Allografts (mittlere Steifigkeit: $48,6 \pm 7,2$ N/mm) erniedrigt ($p= 0,240$). Im Vergleich zu den Autografts (mittlere Steifigkeit: $61,0 \pm 6,6$ N/mm) war sie sogar signifikant geringer ($p= 0,012$)(**Abb. 4-16**).



* PES signifikant gegenüber Autograft, $p < 0,05$

Abb. 4-16: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts nach 6 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen Schubladentest

Versagenstest

Die maximale Versagenkraft (Mittelwert: $161,1 \pm 77,3$ N) und die maximale Steifigkeit (Mittelwert: $34,1 \pm 14$ N/mm) der PES-behandelten Flexorsehnen waren nach 6 Wochen

gegenüber den Kontrollgruppen geringer, jedoch nicht signifikant. Die maximale Elongation (Mittelwert: $5,7 \pm 2,8$ mm) sowie der Stress (Mittelwert: $9,8 \pm 7,5$ MPa) der PES-Allografts beim Versagen zeigte sich im Vergleich zur Allograft- und Autograft-Gruppe ebenfalls nicht signifikant verändert (**Tabelle 4-1**).

Tabelle 4-1: strukturelle Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 6 Wochen im Versagenstest

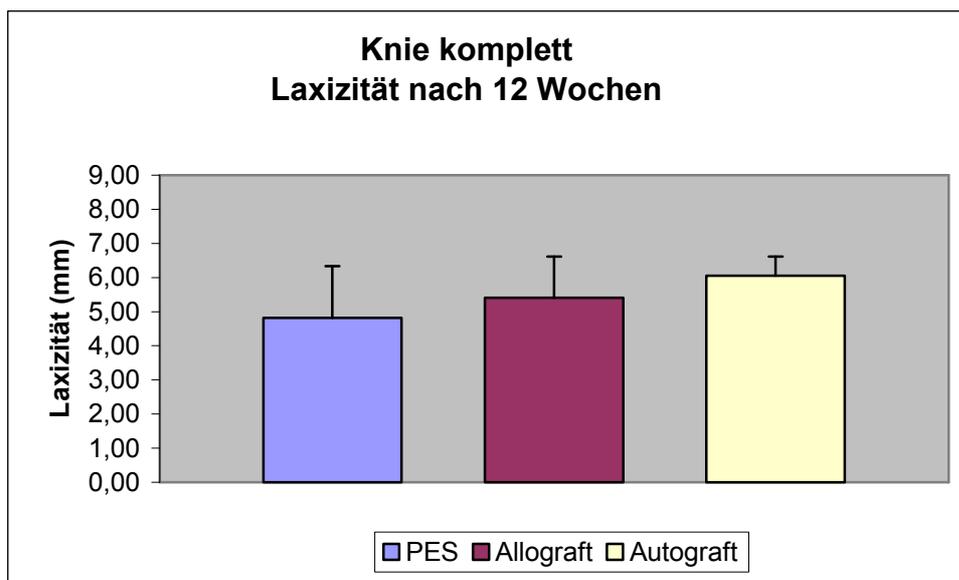
Variabel	PES-Allografts	Allografts	Autografts	VKB nativ
Steifigkeit (N/mm)	$34,1 \pm 14$	$58,1 \pm 34,7$	$61,2 \pm 27,5$	$173 \pm 19,6\ddagger$
Versagenskraft (N)	$161 \pm 77,3$	$199,4 \pm 129,7$	$232,4 \pm 82,5$	$1670,5 \pm 375,6\ddagger$
Elongation (mm)	$5,7 \pm 2,8$	$7,7 \pm 6,1$	$4,5 \pm 1,9$	$10,6 \pm 2,5\ddagger$
Stress (MPa)	$9,8 \pm 7,5$	$7,6 \pm 5,9$	$7,2 \pm 3,5$	$87,9 \pm 26,0\ddagger$

‡ VKB nativ signifikant gegenüber allen Gruppen, $p < 0,05$

4.4.2 PES-Allograft nach 12 Wochen

Vorderer und hinterer Schublidentest (Knie komplett)

Nach 12 Wochen hatte sich die mittlere Laxizität (Mittelwert: $4,8 \pm 1,5$ mm) und die Steifigkeit (Mittelwert: $31,9 \pm 14$ N/mm) des kompletten Kniegelenks samt Weichteilmantel und Streckapparat der PES-Allografts gegenüber der PES-6-Wochengruppe zwar verringert, jedoch nicht signifikant. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied (**Abb. 4-17**).



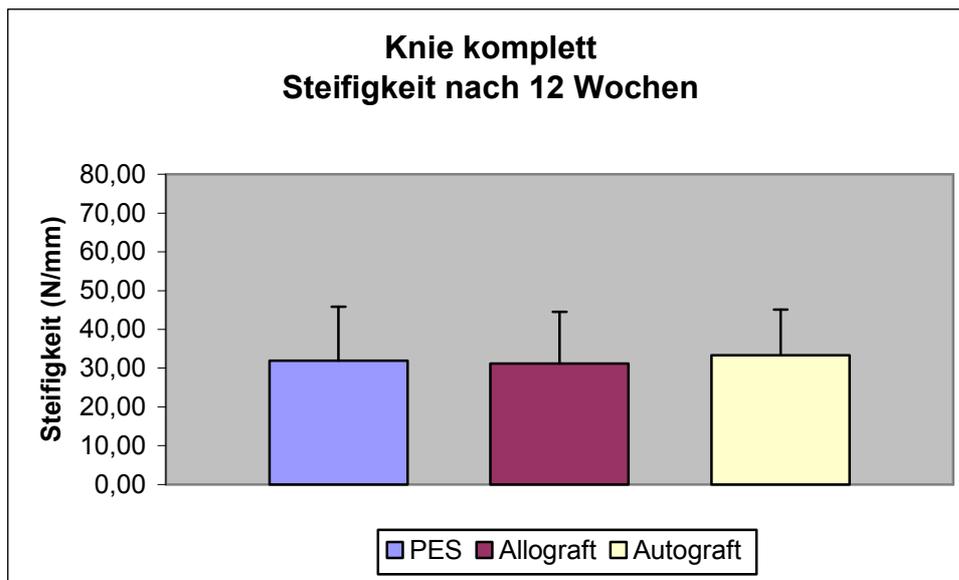
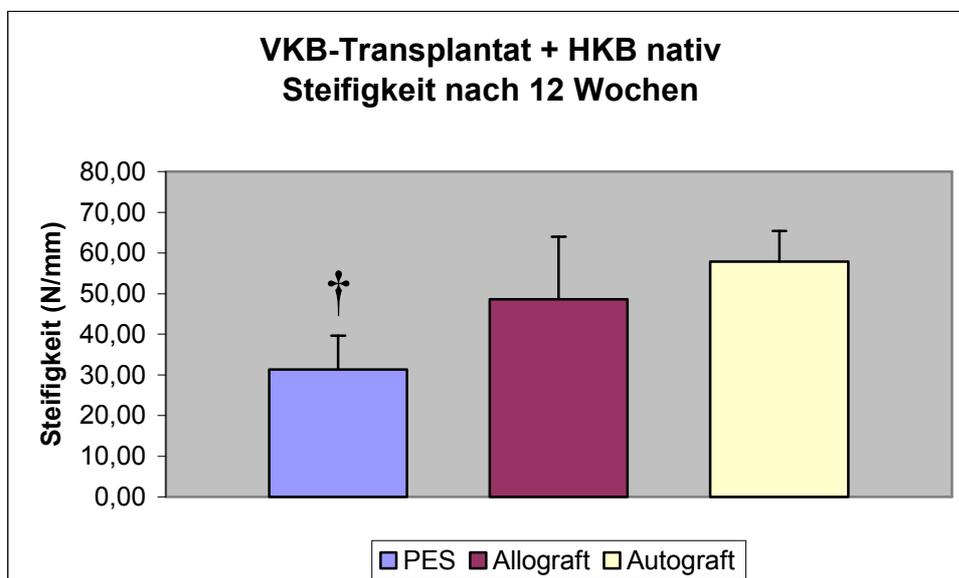
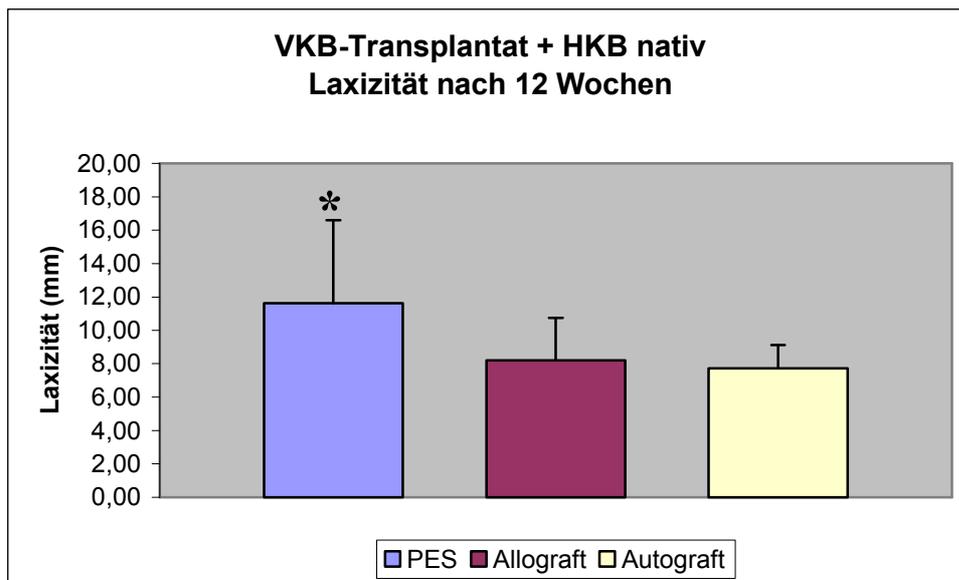


Abb. 4-17: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts (Knie komplett) nach 12 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest

Vorderer und hinterer Schubladentest (PES-Allograft/HKB nativ)

Nach 12 Wochen hatte die mittlere Laxizität der PES-Allografts mit dem nativen HKB nicht signifikant auf $11,6 \pm 5$ mm im Vergleich zur PES-6-Wochengruppe zugenommen. Gegenüber der mittleren Laxizität der 12-Wochengruppe der unsterilisierten Allografts (Mittelwert: $8,2 \pm 2,6$ mm) war sie ebenfalls nicht signifikant größer. Jedoch bestand eine signifikante Zunahme im Vergleich zur entsprechenden Autograft-Gruppe ($p= 0,023$).

Die mittlere Steifigkeit der PES-behandelten Flexorsehnen betrug $31,3 \pm 8,36$ N/mm und unterschied sich nicht signifikant von derer der PES-6-Wochengruppe. Ferner zeigte sich gegenüber den Kontrollgruppen ein signifikanter Unterschied ($p_{\text{Auto}}= 0,001$ bzw. $p_{\text{Allo}}= 0,023$)(Abb. 4-18).



* PES signifikant gegenüber Autograft, $p < 0,05$

† PES signifikant gegenüber Allograft (unsterilisiert) und Autograft, $p < 0,05$

Abb. 4-18: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts/HKB nativ nach 12 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest

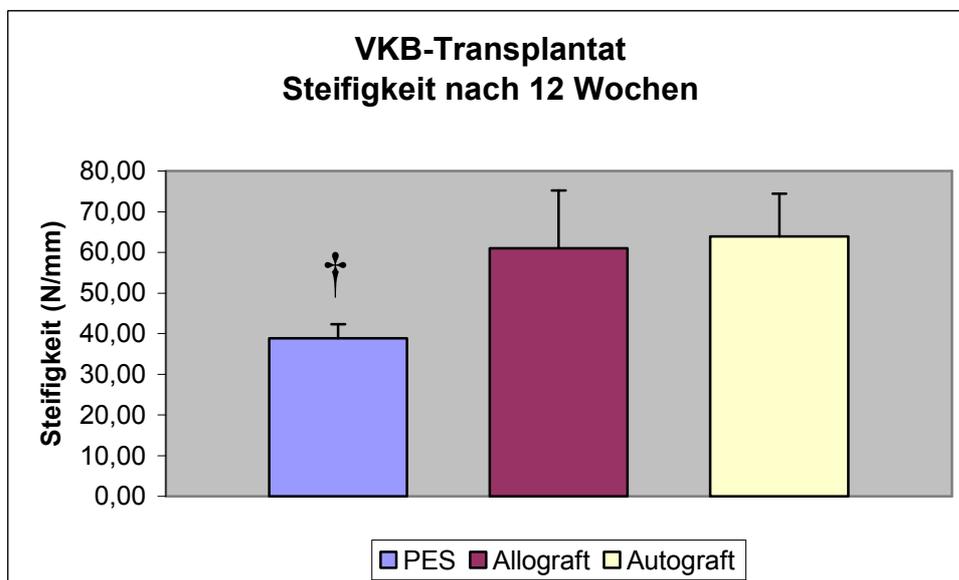
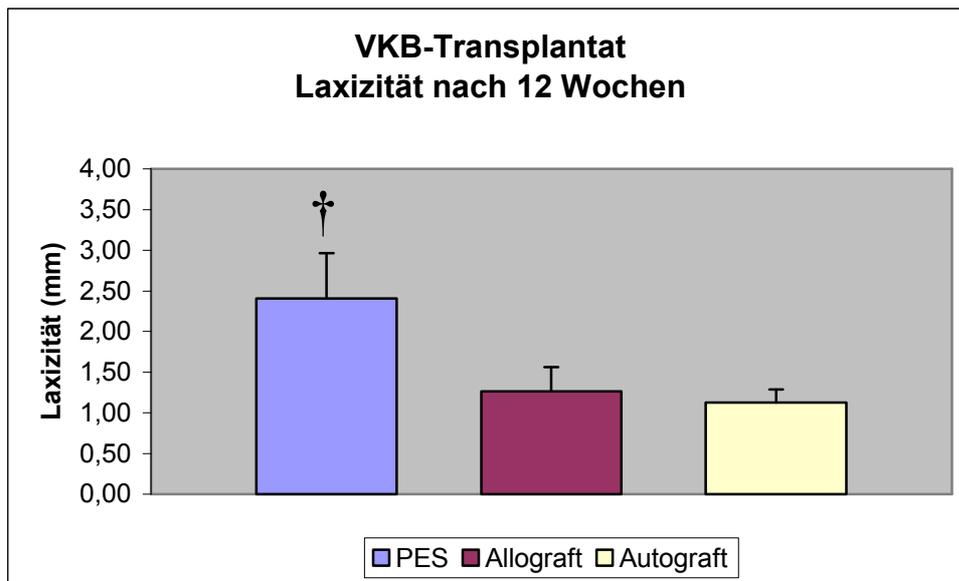
Vorderer Schubladentest

Bei der biomechanischen Testung der vorderen Schublade rupturierten bei Einhaltung der standardisierten Messprotokolle bereits vier von neun PES-Allografts (44,44%). Die folgenden Ergebnisse beziehen sich somit nur auf die intakten, nicht rupturierten PES-Transplantate.

Bis zur 12. Woche des Remodelings der nicht rupturierten PES-behandelten Allografts war eine signifikante Abnahme der mittleren Laxizität auf $2,4 \pm 0,6$ mm gegenüber der PES-6-

Wochengruppe festzustellen ($p = 0,019$). Im Vergleich mit den Kontrollgruppen war sie jedoch signifikant vergrößert ($p_{\text{Auto}} = 0,003$ bzw. $p_{\text{Allo}} = 0,003$).

Im Vergleich mit der PES-6-Wochengruppe war nach 12 Wochen kein signifikanter Unterschied in der Steifigkeit (mittlere Steifigkeit: $38,82 \pm 3,49$ N/mm) zu verzeichnen. Allerdings war sie signifikant kleiner gegenüber den Referenzgruppen ($p_{\text{Auto}} = 0,003$ bzw. $p_{\text{Allo}} = 0,005$)(**Abb. 4-19**).



† PES signifikant gegenüber Allograft (unsterilisiert) und Autograft, $p < 0,05$

Abb. 4-19: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts nach 12 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen Schubladentest

Versagenstest

Da bereits 44,44% der PES-Allografts bei der biomechanischen Testung versagten, konnten nur fünf VKB-Transplantate weiter getestet werden.

Obwohl sich die maximale Versagenskraft (Mittelwert: $107,9 \pm 40,8$ N) der PES-12-Wochengruppe deutlich gegenüber den 6-Wochentieren verringerte, nahm die maximale Steifigkeit (Mittelwert: $43,1 \pm 16,5$ N/mm) zu. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Im Vergleich mit den beiden Kontrollgruppen war jedoch sowohl die maximale Versagenskraft als auch die maximale Steifigkeit signifikant verringert ($p < 0,05$). Die maximale Elongation (Mittelwert: $2,8 \pm 0,4$ mm) und der Stress (Mittelwert: $5,0 \pm 1,5$ MPa) der PES-12-Wochengruppe beim Versagen war gegenüber der PES-6-Wochengruppe ($p = 0,004$) sowie gegenüber den unsterilisierten Allografts ($p = 0,018$) und den Autografts ($p = 0,003$) signifikant verändert (**Tabelle 4-2**).

Tabelle 4-2: strukturelle Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 12 Wochen im Versagenstest

Variabel	PES-Allografts	Allografts	Autografts	VKB nativ
Steifigkeit (N/mm)	$43.1 \pm 16.5^\dagger$	67.8 ± 15.6	72.6 ± 15.9	$173 \pm 19,6^\ddagger$
Versagenskraft (N)	$107.9 \pm 40.8^\dagger$	280.5 ± 116.3	391.5 ± 160.1	$1670.5 \pm 375.6^\ddagger$
Elongation (mm)	$2,8 \pm 0,4^\dagger$	$5,0 \pm 2,0$	$6,0 \pm 1,7$	$10,6 \pm 2,5^\ddagger$
Stress (MPa)	$5.0 \pm 1.5^\dagger$	11.5 ± 6.0	10 ± 3.4	$87.9 \pm 26.0^\ddagger$

† PES signifikant gegenüber Allograft (unsterilisiert) und Autograft, $p < 0,05$

‡ VKB nativ signifikant gegenüber allen Gruppen, $p < 0,05$

Versagensmodus

Die nicht-anatomischen Rekonstruktionstechniken versagten nach 6 Wochen zu 77,77% im Bereich der Verbindungsmaterialien (tibial n=3, femoral n=4). Lediglich zwei PES-behandelte Flexorsehnen rupturierten intraligamentär (zentral n=2). Ähnliche Versagensmodi fanden sich bei den unsterilisierten Allografts und den Autografts. Die Kontrollgruppen versagten nach 6 Wochen alle beim Versagenstest im Bereich der Verbindungsmaterialien (Knochentunnelaustriss).

Nach 12 Wochen rupturierten 100% der PES-Allografts intraligamentär. Davon versagten bereits 44,44% bei submaximalen Belastungen an der femoralen Insertionsfläche im Rahmen des vorderen Schubladentest bei 50 N (n=4). Im Versagenstest kam es bei zwei PES-Allografts zum intraligamentären Zerreißen im zentralen Drittel und bei drei Transplantaten an der femoralen Insertionsfläche. Dabei war bei den 12-Wochentieren ein gummiartiger Austriss zu beobachten

(Abb. 4-20). In den Kontrollgruppen rupturierten keine Transplantate vor dem Versagenstest. Bei den unsterilisierten Allografts kam es bei 85,7% (6/7 der Transplantate) der Transplantate zum intraligamentären Zerreißen und zu einem Ausriss aus dem Knochentunnel. In der Autograftgruppe versagten 71,4% (5/7 der Transplantate) intraligamentär. Zwei Autografts wurden aus dem Knochentunnel gerissen (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: Versagensmodus

Zeitpunkt/ Gruppe	PES-Allografts	Allografts (unsterilisiert)	Autografts
6 Wochen	n=7 Tunnelausriss	n=7 Tunnelausriss	n=7 Tunnelausriss
	n=2 intraligamentäre Ruptur		
12 Wochen	n=9 intraligamentäre Ruptur (n=4 bereits im vorderen Schublidentest)	n=6 intraligamentäre Ruptur	n=5 intraligamentäre Ruptur
		n=1 Tunnelausriss	n=2 Tunnelausriss

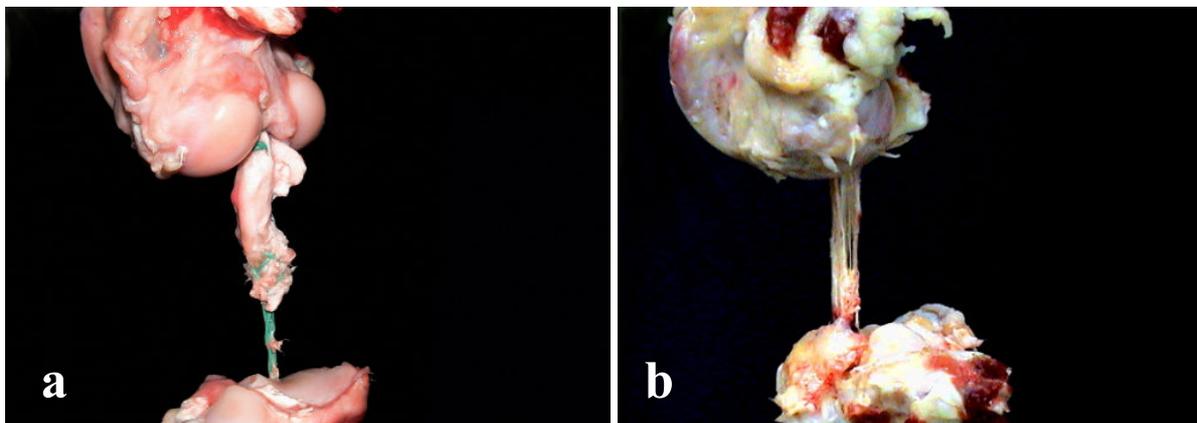


Abb. 4-20: Versagensmodus nach 6 Wochen (a) und nach 12 Wochen (b)

5 Diskussion

Allografts haben in den letzten 20 Jahren immer mehr an Bedeutung in der Kreuzbandchirurgie gewonnen. Die Indikation ist vor allem bei multiplen Bandverletzungen und Revisionseingriffen, aber mittlerweile auch beim primären VKB- und HKB-Ersatz gegeben. Den großen Vorteilen wie dem Entfall der Entnahmemorbidität und der beliebigen Transplantatdimensionierung steht allerdings die Gefahr der Infektionsübertragung gegenüber. Bestehende Sterilisationsverfahren mit γ -Stahlen können keinen kompletten Schutz vor Infektion und Kontamination ohne Beeinträchtigung der initialen biomechanischen und strukturellen Eigenschaften der allogenen Bandtransplantate gewährleisten [54, 55, 101, 135, 156]. Auf Grund dieser Nebenwirkungen wird heutzutage von vielen Autoren die Verwendung steril entnommener, engmaschig „gescreenter“, konservierter, aber eben nicht „sekundär-sterilisierter“ Allografts empfohlen.

Das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren ist ein etabliertes und kostengünstiges Sterilisationsverfahren bei allogenen Knochentransplantaten mit einem adäquaten antibakteriellen, antimykotischen und antiviralen Schutz [132, 133]. Dieser Schutz bestätigte sich ebenfalls bei der Sterilisation von Weichteiltransplantaten wie Achillessehne, Knorpel und Haut [152]. Im Sterilisationsprozess werden zuerst stark immunogene Substanzen wie Blut und Fett durch Auswaschen und Lyophilisation entfernt. Es folgt der eigentliche Sterilisationsprozess mit Peressigsäure bei einem Unterdruck von 16 kPa (=200mbar).

Scheffler et al. konnten in einer in-vitro Studie keine Beeinträchtigung biomechanischer und viskoelastischer Eigenschaften humaner BPTB-Allografts nach Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren nachweisen [153]. Ferner zeigte PES in einer weiteren in-vitro Studie weder einen zytotoxischen noch pro-inflammatorischen Effekt auf humane BPTB-Allografts [98].

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Einfluss des Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahrens auf die Revaskularisierung allogener Sehnen transplantate im Rahmen des Transplantatremodelings und die resultierenden biomechanischen Eigenschaften in einem in-vivo Modell untersucht. Auf Grund der identischen Wahl des Tiermodells und der Methoden wie in einer Vorstudie, die das Bandremodeling und die biomechanischen Eigenschaften von Autografts mit tiefgefrorenen, unsterilisierten Allografts verglichen hatte, konnten die in jener Studie [154] gewonnenen Daten als Referenzdaten für unsere Studie herangezogen werden. Somit ist unsere Studie besonders aussagekräftig, da die VKB-Rekonstruktionen vom selben Operateur

mit derselben Technik durchgeführt, das gleiche Transplantat verwandt und die Präparate nach Sterilisation auf dieselbe Art und Weise aufbereitet wurden.

Entgegen vielversprechender in-vitro Studien [98, 153] musste in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Sterilisation von allogenen Weichteiltransplantaten zu einer Inhibition bzw. zumindest zu einer erheblichen Verzögerung des Transplantatremodelings mit konsekutiv eingeschränkten biomechanischen Eigenschaften in der frühen Einheilungsphase im Schafsmodell führte.

5.1 Revaskularisierung

Bei der Darstellung und Quantifizierung der Revaskularisierung wurde eine durch Unterhauser et al. etablierte immunhistochemische von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII-Färbung von Endothelzellen der Gefäßwand verwendet [180]. Diese äußerst sensitive Methode identifiziert selbst kleinste Kapillaren ohne Gefäßmuskelzellen und ist deshalb besonders für die Beurteilung der Revaskularisierung in der frühen Einheilungsphase geeignet. Im Gegensatz zu anderen Methoden ist die hier angewandte Technik nicht durch die Perfusionskapazität oder Größe röntgendichter Partikel limitiert [180].

Die vorliegende Arbeit zeigte ein kontinuierliches Einwachsen neugebildeter Kapillaren in das initial avaskuläre PES-behandelte Transplantatgewebe. Deren Herkunft ist vermutlich die neue hyperplastische und reichlich vaskularisierte synoviale Hüllschicht, welche sich in den ersten Heilungswochen um das Transplantat gelegt hat. Der im Vergleich zu den subsynovialen und intermediären Zonen verspätete Anstieg der Gefäßdichte in der zentralen Zone des Allografts impliziert, dass die Revaskularisierung des Transplantates von peripher nach zentral ablaufen muss. Diese Beobachtungen korrelieren mit anderen Studien, welche den Ablauf der Revaskularisierung von peripher nach zentral ausgehend vom periligamentären Gewebe wie dem Hoffa'schen Fettkörper und der synovialen Hüllschicht beschrieben haben [7, 11, 12, 16, 157, 180]. Dieser Remodeling-Prozess spiegelte sich ebenfalls in unserer Vergleichsstudie wieder. Dabei zeigte sich sowohl bei den Autografts als auch bei den unsterilisierten Allografts 6 Wochen postoperativ eine im Vergleich zum intakten VKB deutliche Hypervaskularität und Hypozellularität mit einer von peripher in die Transplantatmitte ablaufenden Revaskularisierung und Zell-Repopulation [154]. Nach 12 Wochen war die Zellularität des nativen VKB in beiden Gruppen erreicht, während die Transplantate weiter hypervaskularisiert waren.

Im Vergleich zu den Autografts (AUTO) und den unsterilisierten Allografts (ALLO) der Vorstudie zeigte sich das Transplantatremodeling der PES-behandelten Allografts jedoch

deutlich verlangsamt bzw. gestört. In der deskriptiven Auswertung der konventionellen HE- und MG-Färbungen der PES-behandelten Allografts fand sich noch 6 Wochen postoperativ ein weitgehend avitales, avaskuläres und strukturloses Transplantat. Diese Aussage wurde durch die quantitative Erhebung der Gefäßdichte über drei vorher definierte Zonen (subsynovial, intermediär, zentral) im Querschnitt anhand der von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII-Färbung bestätigt. Zum Zeitpunkt von 6 Wochen war die Gefäßdichte im Vergleich zu den Kontrollgruppen (AUTO, ALLO) sowohl in der zentralen, intermediären als auch in der subsynovialen Zone signifikant geringer. Die signifikante Hypovaskularität gegenüber der nativen Flexorsehne und dem nativen Kreuzband über den gesamten Transplantatquerschnitt bekräftigt ebenfalls die Vermutung, dass sich das PES-Allograft nach 6 Wochen noch in der Degenerationsphase befand. Die Kontrollgruppen (AUTO, ALLO) waren zu diesem Zeitpunkt im Remodelingprozess schon weiter fortgeschritten.

Nach 12 Wochen präsentierte sich das PES-behandelte Allograft inhomogen vitaler als zuvor. Vor allem in der subsynovialen Zone gab es lokal vitale, hyperzelluläre und hypervaskularisierte Regionen neben avitalen Bereichen. Die Vaskularität und Zellularität nahm zur Transplantatmitte allerdings stetig ab. Das Bindegewebe wirkte noch weitgehend ungeordnet und strukturlos. Die quantitative Bestimmung der Gefäßdichte ergab einen Anstieg in allen 3 Zonen von 6 nach 12 Wochen. Im Vergleich zu der AUTO- und der ALLO-Gruppe war der Gefäßgehalt aber weiterhin in allen Regionen signifikant vermindert und wies lediglich in den peripheren Zonen gegenüber dem nativen VKB eine Hypervaskularität auf. Es zeigt sich also, dass beim PES-behandelten Allograft ebenfalls eine Revaskularisierung im Rahmen des Remodelings stattgefunden haben muss. Diese verläuft jedoch selbst noch 12 Wochen nach Implantation im Vergleich zum unsterilisierten Allograft und erst recht zum Autograft deutlich verlangsamt ab. Das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren scheint demnach die „Ligamentisierung“ von allogenen Sehmentransplantaten zu stören.

5.2 Biomechanik

Der zweite Teilaspekt dieser Studie beschäftigte sich mit der Auswirkung des Remodeling-Prozesses auf die biomechanischen Eigenschaften der PES-sterilisierten Allografts.

Zur Bestimmung der Biomechanik wurden jeweils 6 und 12 Wochen postoperativ standardisierte mechanische Testprotokolle angewandt. Vordere und hintere Schubladentests bei submaximaler Belastung simulierten dabei relativ realitätsnah die postoperative Belastungssituation und gaben Aufschluss über wichtige Parameter wie Laxizität und Steifigkeit am VKB-rekonstruierten Knie.

Ebenso von großer Bedeutung waren die biomechanischen Eigenschaften unter maximaler Belastung. Beim Versagenstest (load-to-failure) wurden die Parameter Steifigkeit, die maximale Elongation, der Stress und die maximale Versagenskraft untersucht.

Nach 6 Wochen beobachteten wir ähnliche biomechanische Eigenschaften in den Schubladentests bei den PES-sterilisierten Transplantaten im Vergleich zu den unsterilisierten Allografts und den Autografts. Einzig im vorderen Schubladentest zeigte sich schon nach 6 Wochen eine signifikant größere Laxizität und eine signifikant geringere Steifigkeit der PES-behandelten Flexorsehnen zu den Autografts. Im 3. Monat des Transplantatremodelings fand sich in der PES-Gruppe bereits eine signifikant größere Laxizität und signifikant geringere Steifigkeit im kombinierten vorderen und hinteren Schubladentest gegenüber dem Autograft. Im vorderen Schubladentest zeigte sich eine signifikant größere Laxizität und eine signifikant geringere Steifigkeit gegenüber beiden Kontrollgruppen.

Im Versagenstest war eine signifikant geringere maximale Versagenskraft und Steifigkeit sowie geringere strukturelle Eigenschaften erst in der 12. postoperativen Woche zu verzeichnen. Dabei konnte eine Reduktion um 62% der maximalen Versagenskraft und um 36% der Steifigkeit zu den unsterilisierten Allografts festgestellt werden. Ferner versagten bereits 44,4% (4/9) der PES-Transplantate beim vorderen Schubladentest unter submaximaler Belastung, so dass ein Versagenstest gar nicht erst möglich war. Während die Kontrollgruppen nach 12 Wochen einen Anstieg der Versagenskraft zeigten, nahm die maximale Versagenskraft bei den PES-Allografts im Vergleich zum Zeitpunkt von 6 Wochen noch weiter ab. Dabei änderte sich ebenfalls der Versagensmodus von einem primären Versagen der Verbindungsmaterialien (Knoten/Fäden) nach 6 Wochen zu einem intraligamentären Reißen des PES-Transplantates nach 12 Wochen. Nach 12 Wochen war somit das PES-Transplantat selbst die biomechanische Schwachstelle der Kreuzbandersatzplastik geworden.

Insgesamt schnitt das PES-behandelte Allograft in allen biomechanischen Testungen im Vergleich zum tiefgefrorenen, unsterilisierten Allograft und dem Autograft schlechter ab, wobei die Unterschiede im Verlauf nach 12 Wochen immer deutlicher wurden. Die Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Sterilisation von Weichteiltransplantaten resultiert somit schon nach 12 Wochen in erheblich eingeschränkten biomechanischen Eigenschaften.

Unsere Ergebnisse korrelieren mit ersten bisher unveröffentlichten, klinischen Studien, die eine erhöhte Inzidenz an Rerupturraten bei Kreuzbandrekonstruktionen mit PES-sterilisierten Allografts aufzeigen. So berichtete PD Dr. med. Jörg Richter (Orthopädische Klinik Markgröningen) von einem Versagen bei 8 von 9 PES-sterilisierten BPTB-Allografts innerhalb von 5 bis 9 Monaten nach VKB-Ersatz (persönliche Mitteilung). Ebenfalls musste PD Dr. med.

Jürgen Höher (Sportklinik Köln) eine Reruptur bei 3 von 3 PES-Allografts innerhalb von 3 bis 9 Monate nach VKB-Rekonstruktion verzeichnen (persönliche Mitteilung).

5.3 Entzündungszeichen

Lomas et al. hatten in einer in-vitro Studie [98] weder eine Zytotoxizität noch einen pro-inflammatorischen Effekt des Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren auf humane BPTB-Allografts nachweisen können. In unserer in-vivo Arbeit fanden sich zum Zeitpunkt von 6 und 12 Wochen noch leichte Entzündungszeichen im Rahmen einer chronisch granulierenden Entzündung. Hinweise auf eine überschießende Entzündungsreaktion wie das Auftreten von Fremdkörperriesenzellen waren in den konventionellen Färbungen nicht zu beobachten. Allerdings zeigte sich bei 66,6% (6/9) der Schafe eine klinisch asymptomatische, aber histologisch gesicherte fibrotische Hypertrophie am tibialen Knochentunneleingang, deren Genese ungeklärt bleibt. Eine mögliche Erklärung könnte der bei allogenen, PES-sterilisierten Knochentransplantaten angenommene osteoinduktive Effekt durch stimulierte Wachstumsfaktoren wie BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein-4) liefern [194].

Hierbei gilt aber auch anzumerken, dass Lomas seine Transplantate mit einer zu uns 10fach geringeren Konzentration an Peressigsäure (0,1% v/v) sterilisierte. Jedoch wurden alle Transplantate nach der Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren gründlich mit Wasser ausgewaschen und auf Spuren von Peressigsäure getestet. Dabei konnte keine Peressigsäure mehr nachgewiesen werden. Somit ist nicht anzunehmen, dass es auf Grund einer residuellen Peressigsäurekonzentration zu einer direkten Störung des Transplantatremodelings gekommen ist. Ferner ist Peressigsäure eine instabile Säure, die spontan unter Freigabe von Sauerstoff und Wärme in Essigsäure zerfällt. Lomas et al. vermuteten, dass die Sauerstoffblasen für die, von ihnen bei PES-sterilisierten BPTB-Transplantaten beobachteten, vergrößerten Abstände zwischen den Kollagenfasern verantwortlich seien [98]. Darüber hinaus fanden sie eine erhöhte Kollagenumbaurate, welche sich nach 24 h jedoch wieder normalisierte. Möglich wäre somit in unserer in-vivo Studie eine Veränderung der Ultrastruktur der Allografts und einer daraus resultierenden Beeinflussung des Remodeling-Prozesses.

5.4 Bezug zu anderen Ergebnissen der Arbeitsgruppe

Im Rahmen dieses Projekts wurden in autonomen Dissertationen weitere Teilaspekte des ligamentären Remodelings wie die Zell-Repopulation, die Myofibroblasten, der Kollagen-Crimp, der Kollagengehalt sowie die Knochen-Sehnen-Einheilung untersucht.

Bereits nach 6 Wochen ergab die quantitative Auswertung der Gesamtzellzahl bei den PES-sterilisierten Transplantaten im Vergleich mit den unsterilisierten Allografts und den Autografts einen niedrigeren Zellgehalt. Nach 12 Wochen wurde dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$). Von 6 zu 12 Wochen war innerhalb der PES-Gruppe lediglich ein minimaler Anstieg der Zellzahl zu sehen gewesen. Die Zellularität des nativen Kreuzbandes wurde nie erreicht. Dies korreliert mit der deskriptiven Beobachtung und den Ergebnissen der Revaskularisierung und erscheint logisch, da die Zellen über die Gefäße das Transplantatgewebe erreichen.

Zur Darstellung der Myofibroblasten diente die immunhistochemische Anfärbung einer Isoform des Aktins, dem α -smooth-muscle Aktin (ASMA). Auch die Betrachtung der Myofibroblasten zeigte wenig Dynamik im Remodeling. Nach 12 Wochen waren noch große Bereiche der PES-sterilisierten Transplantate avital und enthielten nur vereinzelt Myofibroblasten. Allerdings veränderten die Zellen ihre Morphologie. Sie waren nun ovoid bis stabförmig, was eine Annäherung an die Gestalt der Zellen im nativen VKB darstellte. Es waren zu beiden Zeitpunkten deutlich weniger Myofibroblasten als in den Kontrollgruppen zu sehen.

Bei der Betrachtung des Kollagens konnte keine signifikante Änderung in der Verteilung von Kollagen Typ I und Typ III über den beobachteten Zeitraum der „Ligamentisierung“ festgestellt werden. Normalerweise hätte in der frühen Einheilungsphase der Gehalt an Kollagen Typ III zunehmen sollen, während der Gehalt an Kollagen Typ I abnimmt. Zudem konnten durch die Polarisationsmikroskopie Aussagen über die Kollagentertiärstruktur getroffen werden, d.h. über die Anordnung und Ausrichtung des Kollagens im Gewebe. Kollagen besteht aus langen parallel verlaufenden Fasermolekülen die daher im Polarisationsmikroskop anisotrop erscheinen. Die Kollagenfaserbündel verlaufen in Wellenform. Die Frequenz der Kollagenfibrillen nennt man „Kollagen-Crimp“. Bei der Crimplänge der PES-behandelten Allografts ergaben sich nach 6 und 12 Wochen signifikante Unterschiede zu der ALLO- und AUTO-Gruppe. In den Vergleichsgruppen war deutlich geworden, dass sich die Wellenlänge des Crimp in autologen und in unsterilisierten, allogenen Transplantaten im Laufe der Zeit wieder der Länge des VKB langsam annäherte, nachdem sie initial deutlich gestiegen war. Beim PES-sterilisierten Allograft war diese Entwicklung in der frühen Phase des Remodeling nicht zu erkennen. Die Wellenlänge

nahm von 6 zu 12 Wochen sogar noch zu und war gegenüber den Kontrollgruppen zu beiden Zeitpunkten signifikant ($p < 0,05$) erhöht.

Die Untersuchung der Sehnen-Knochen-Einheilung wies hingegen keinen negativen Effekt des Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahrens auf die ossäre Integration des Transplantates auf. Im Gegenteil zu den unsterilisierten Allografts und den Autografts zeigte sich nach 6 Wochen bereits bei 55,5% der PES-behandelten Transplantate eine direkte Sehnen-Knochen-Einheilung. Auch nach 12 Wochen war die ossäre Integration der PES-Allografts gegenüber den Kontrollgruppen bereits weiter fortgeschritten.

Zusammenfassend konnte demnach bei der Sterilisation von allogenen Sehnentransplantaten nach dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren eine schnelle, direkte Sehnen-Knochen-Einheilung bei einem verlangsamten bzw. gestörten Bandremodeling-Prozess in der frühen Einheilungsphase nachgewiesen werden. Daraus resultierten gegenüber unsterilisierten Allografts und Autografts nach 12 Wochen bereits signifikant verringerte biomechanische Eigenschaften.

5.5 Limitierungen der Studie

Das Schaf ist auf Grund seiner anatomischen und funktionellen Ähnlichkeiten zum Menschen ein mehrfach bewährtes Tiermodell in der Kreuzbandforschung [2, 25, 63, 73, 134, 180, 189]. So konnten Seitz et al. 1997 mittels Injektionstechnik zeigen, dass sowohl die makro- als auch mikrovaskuläre Versorgung des nativen ovinen vorderen Kreuzbandes der Blutversorgung des Menschen sehr ähnelt [161]. In einer vergleichenden, deskriptiven Studie des Remodelingprozesses von Scranton et al. wurde ebenfalls dargestellt, dass die auf zellulärer Ebene ablaufenden Vorgänge bei Mensch und Schaf durchaus vergleichbar und in ähnlichen Zeitdimensionen abzulaufen scheinen [158].

Dennoch ist eine Übertragbarkeit auf den Menschen insbesondere im Hinblick auf die biomechanischen Verhältnisse sicherlich nur eingeschränkt möglich. Ein weiteres Grundproblem stellt die Kontrolle der postoperativen Belastung dar. Wir haben auf eine Immobilisation der Tiere verzichtet. Jedoch kann von einer gezielten Rehabilitation durch standardisierte Protokolle wie beim Menschen nicht ausgegangen werden. Die frühe uneingeschränkte und unkontrollierbare Belastung der operierten Gliedmaße hätte den Heilungsprozess beeinflussen und dadurch die erhöhte Anzahl von Transplantatversagern erklären können. Dennoch waren in der Vorstudie unter identischen Versuchsbedingungen keine Transplantatversager unter submaximalen Belastungen beobachtet worden. Vielleicht hätten sich die biologischen und

biomechanischen Eigenschaften zu einem späteren Zeitpunkt des Remodelings wieder regeneriert. Allerdings geht die Tendenz beim primären VKB-Ersatz mittels Allografts in der Klinik gerade auf Grund des großen Vorteils des Wegfalls der Entnahmemorbidität zu immer früheren und aggressiveren Rehabilitationsprotokollen über.

Die Verwendung knochenblockfreier Allografts mit einer extrakortikalen, nicht-anatomischen Verankerungstechnik ist eine weitere nicht zu vernachlässigende Einflussgröße, da der Remodelingprozess nicht über eine schnelle, direkte Knochen-Knocheneinheilung eines BPTB-Allografts mittels Interferenzschrauben, sondern über eine Sehnen-Knochen-Einheilung abläuft. Dadurch ist der Kontakt zum Knochen nicht so fest wie es bei der Verwendung von Verankerungsschrauben wäre. Auf der anderen Seite verhindern diese Schrauben in einem Bereich von ca. 30% des Transplantatumfangs den Kontakt zum Knochen und verändern das natürliche Transplantatremodeling. So hätten wir die beobachtete direkte Sehnen-Knochen-Einheilung dann womöglich auf die Verwendung von Interferenzschrauben und nicht als osteoinduktive Eigenschaft des Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren interpretiert.

Die immunhistologische von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII-Färbung war trotz penibler Einhaltung der Färbeprotokolle störanfällig. Der in der Vorstudie verwendete polyklonale Antikörper musste auf Grund verringerter Spezifität durch einen neuen, spezifischeren polyklonalen Antikörper ausgetauscht werden. Dennoch blieb gelegentlich eine Farbreaktion aus oder es kam zu überschießenden Hintergrundfärbungen. So mussten einige Querschnitte verworfen und durch neue ersetzt werden. Diese Versager sind aber bei immunhistochemischen Färbungen durchaus bekannt und führten zu keinerlei Einschränkung bei der Datenauswertung [184].

Die biomechanischen uniaxialen Testungen mit einem Freiheitsgrad spiegeln natürlich keine physiologischen Bewegungsmöglichkeiten im Kniegelenk wieder. Dennoch stellen sie immer noch den aktuellen Standard dar und geben einen guten Überblick über die biomechanischen Eigenschaften des verwendeten Transplantats.

Da die genannten Einflussgrößen aber sowohl für unsere Studie als auch für die angesprochene Vorstudie der unsterilisierten Allografts und Autografts in gleicher Weise galten, war dennoch ein Vergleich zwischen den Gruppen und eine Schlussfolgerung möglich. Somit lassen sich die im folgenden Abschnitt dargestellten Aussagen treffen.

5.6 Schlussfolgerung und klinische Bedeutung

In der vorliegenden in-vivo Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren das Transplantatremodeling allogener knochenblockfreier Flexorsehnen zum vorderen Kreuzbandersatz inhibiert bzw. stört. Das PES-behandelte Allograft war in allen biomechanischen Testungen dem unsterilisierten Allograft und dem Autograft unterlegen, wobei die Unterschiede im Verlauf nach 12 Wochen immer deutlicher wurden. So ergaben sich nach 12 Wochen signifikante Unterschiede in der Versagenskraft, im Stress, in der Laxizität und in der Steifigkeit. Dabei rissen bereits 44,4% der PES-Allografts beim vorderen Schubladentest unter submaximalen Belastungen. Zudem fand sich bei 66,67% (6/9 Tiere) der operierten Kniegelenke eine zum Teil schwer ausgeprägte sekundäre Arthrofibrose am tibialen Knochentunnel-Eingang.

In den konventionellen histologischen Färbungen waren deskriptiv nach 6 und 12 Wochen weniger Zellen und Gefäße nach zentral vorgedrungen und auch das Transplantatgewebe erschien ungeordneter als bei der ALLO- und AUTO-Gruppe. Die quantitative Auswertung der Revaskularisierung bestätigte dies. Sie war bei den PES-Allografts erheblich verlangsamt und erreichte auch nach 3 Monaten in keiner der definierten 3 Zonen (subsynovial, intermediär, zentral) die Gefäßdichte der beiden Kontrollgruppen. Nach 12 Wochen fanden sich ebenfalls eine signifikant geringere Zellularität sowie ein signifikant erhöhter Kollagen-Crimp im Vergleich zu den unsterilisierten Allografts und Autografts. Auch die Betrachtung der Myofibroblasten zeigte keine Dynamik im Remodeling.

In Anbetracht unserer Ergebnisse raten wir daher zu Vorsicht bei der Verwendung von PES-sterilisierten Allografts zum VKB-Ersatz. Der längere Ligamentisierungs-Prozess bedarf einer vorsichtigen, angepassten Nachbehandlung. Weitere klinische Studien bei Patienten, die bereits eine VKB-Plastik mit PES-sterilisierten Allografts erhalten haben, müssen abgewartet werden, ob unsere Resultate sich eins zu eins auf den Menschen übertragen lassen. Erst dann können definitive Aussagen getroffen werden, ob das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren eine sichere, adäquate und alternative Technik zur Sterilisation humaner, allogener Sehnen transplantate ist.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Allogene Sehnen transplantate haben in den letzten 20 Jahren auf Grund ihrer großen Vorteile wie dem Entfall der Entnahmemorbidität und der beliebigen Transplantatdimensionierung immer mehr an Bedeutung in der Kreuzbandchirurgie gewonnen. Jedoch existieren bis dato keine Sterilisationsverfahren, die einen kompletten Schutz vor Infektion und Kontamination ohne Beeinträchtigung der initialen biomechanischen und strukturellen Eigenschaften der Allografts gewährleisten können. Das Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren ist ein etabliertes und kostengünstiges Sterilisationsverfahren bei allogenen Knochentransplantaten und bietet auch bei allogenen Weichteiltransplantaten einen adäquaten antibakteriellen, antimykotischen und antiviralen Schutz. Nach hoffnungsvollen in-vitro Studien ist dies die erste in-vivo Studie am Schafsmodell zur Untersuchung biomechanischer Eigenschaften und der Revaskularisierung in der frühen Einheilungsphase des Remodelings von allogenen Sehnen transplantaten nach Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren zum vorderen Kreuzbandersatz.

Methoden: 18 ausgewachsene weibliche Merino-Schafe erhielten einen Ersatz des vorderen Kreuzbandes mittels PES-sterilisierten allogenen Flexorsehnen transplantaten. Nach 6 und 12 Wochen erfolgte die Tötung sowie die biomechanische Testung mittels standardisierter Schubladen- und Versagenstests von jeweils 9 Tieren. Nach histologischer Aufarbeitung erfolgte neben konventionellen (HE, Masson Goldner) Färbungen zur deskriptiven Auswertung der zellulären und strukturellen Umbauvorgänge eine immunhistochemische (von-Willebrand-Faktor/Faktor VIII) Färbung von Endothelzellen der Gefäßwand mit anschließender Auszählung der Gefäßanschnitte in Querschnittspräparaten in je drei Zonen (subsynovial, intermediär und zentral) zur quantitativen Bestimmung der Revaskularisierung des Allografts. Eine Vorstudie lieferte Kontrollgruppen, die zu gleichen Standzeiten mit dem selben Operateur am Schafsmodell identische histologische und biomechanische Untersuchungen zum Vergleich tiefgefrorener, unsterilisierten Allografts und Autografts nutzten.

Ergebnis: Das PES-sterilisierte Allograft war in allen biomechanischen Testungen dem tiefgefrorenen, unsterilisierten Allograft und dem Autograft unterlegen, wobei die Unterschiede im Verlauf nach 12 Wochen immer deutlicher wurden. In Korrelation zeigte sich eine verlangsamte Revaskularisierung. Die Gefäßdichte war nach 6 und 12 Wochen in allen Regionen im Vergleich zu den Kontrollgruppen verringert. Auch deskriptiv war die Revaskularisierung und zelluläre Repopulation der PES-behandelten Allografts weniger weit nach zentral fortgeschritten als in den Kontrollgruppen. Die Gewebestruktur erschien in den PES-Allografts

im Vergleich stets ungeordneter. Bei 66,6% der 12-Wochentiere bildete sich zudem eine klinisch asymptomatische, aber histologisch gesicherte fibrotische Hypertrophie am Eingang zum tibialen Knochentunnel aus. Intraligamentär zeigte sich jedoch nur eine leicht chronisch granulierende Entzündung zum Zeitpunkt von 6 und 12 Wochen.

Diskussion/Fazit: Entgegen hoffnungsvoller in-vitro Studien sind die verlangsamte bzw. gestörte Revaskularisierung sowie die im Vergleich zu Autografts und tiefgefrorenen, unsterilisierten Allografts signifikant schlechteren biomechanischen Eigenschaften ein Indiz für den negativen Einfluss des Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahrens auf den Remodelingprozess knochenblockfreier Flexorsehnentransplantate im Schafsmodell. Auf diesen Ergebnissen basierend können wir die Sterilisation knochenblockfreier Sehnentransplantate mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren zum vorderen Kreuzbandersatz vorerst nicht weiterempfehlen.

7 Literaturverzeichnis

1. **Aglietti P, Buzzi R, D'Andria S, et al.** Patellofemoral problems after intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res.* 1993(288):195-204.
2. **Allen MJ, Houlton JE, Adams SB, et al.** The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg.* 1998;27(6):596-605.
3. **Alm A, Stromberg B.** Vascular anatomy of the patellar and cruciate ligaments. A microangiographic and histologic investigation in the dog. *Acta Chir Scand Suppl.* 1974;445:25-35.
4. **Almqvist KF, Jan H, Vercruyse C, et al.** The tibialis tendon as a valuable anterior cruciate ligament allograft substitute: biomechanical properties. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15(11):1326-30.
5. **Amiel D, Akeson WH, Renzoni S, et al.** Nutrition of cruciate ligament reconstruction by diffusion. Collagen synthesis studied in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 1986;57(3):201-3.
6. **Amiel D, Frank C, Harwood F, et al.** Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res.* 1984;1(3):257-65.
7. **Amiel D, Kleiner JB, Akeson WH.** The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin. *Am J Sports Med.* 1986;14(6):449-62.
8. **Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, et al.** The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res.* 1986;4:162-172.
9. **Andersson C, Odensten M, Gillquist J.** Knee function after surgical or nonsurgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament: a randomized study with a long-term follow-up period. *Clin Orthop Relat Res.* 1991(264):255-63.
10. **Arnoczky SP.** Biology of ACL reconstructions: what happens to the graft? *Instr Course Lect.* 1996;45:229-233.
11. **Arnoczky SP, Rubin RM, Marshall JL.** Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1979;61(8):1221-9.
12. **Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL.** Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64(2):217-24.
13. **Arnoczky SP, Warren RF, Ashlock MA.** Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft. An experimental study. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68(3):376-85.
14. **Bach BR Jr, Aadalen KJ, Dennis MG, et al.** Primary anterior cruciate ligament reconstruction using fresh-frozen, nonirradiated patellar tendon allograft: minimum 2-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2005;33(2):284-92.
15. **Beard DJ, Murray DW, Gill HS, et al.** Reconstruction does not reduce tibial translation in the cruciate-deficient knee an in vivo study. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83(8):1098-103.
16. **Benedetto KP, Klima G.** Effect of the Hoffa fat pad on revascularization of the ruptured anterior cruciate ligament. A histologic study of the rabbit model. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1986;124(3):262-5.
17. **Beynon B, Howe JG, Pope MH, et al.** The measurement of anterior cruciate ligament strain in vivo. *Int Orthop.* 1992;16:1-12.
18. **Beynon BD, Flemming BC, Labovich R, et al.** Chronic Anterior Cruciate Ligament Deficiency Is Associated With Increased Anterior Translation of the Tibia During the Transition From Non-Weightbearing to Weightbearing. *J Orthop Res.* 2002;20:332-337.

19. **Blickenstaff KR, Grana WA, Egle D.** Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model. *Am J Sports Med.* 1997;25:554-559.
20. **Bonamo JJ, Fay C, Firestone T.** The conservative treatment of the anterior cruciate deficient knee. *Am J Sports Med.* 1990;18(6):618-23.
21. **Bonatus T, Alexander A.** Patellar Fracture and avulsion of the patellar ligament complicating arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction *Orthopedics.* 1991;20:770-774.
22. **Borden PS, Kantaras AT, Caborn DN.** Medial collateral ligament reconstruction with allograft using a double-bundle technique *Arthroscopy.* 2002;18(4):E19.
23. **Borden PS, Nyland JA, Caborn DN.** Posterior cruciate ligament reconstruction (double bundle) using anterior tibialis tendon allograft *Arthroscopy.* 2001;17(4):E14.
24. **Bosch U, Decker B, Kasperczyk W, et al.** Biological aspects of long-term failure of autografts after cruciate ligament replacement. *Archives of Orthopaedic & Trauma Surgery.* 1989;108(6):368-72.
25. **Bosch U, Kasperczyk W, Oestern HJ, et al.** Die Einheilungsphasen beim autogenen hinteren Kreuzbandersatz. *Unfallchirurg.* 1990;93:187-196.
26. **Bosch U, Kasperczyk WJ.** Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction--a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model. *Am J Sports Med.* 1992;20(5):558-66.
27. **Bosch U, Kasperczyk WJ.** [The healing process after cruciate ligament repair in the sheep model]. *Orthopäde.* 1993;22(6):366-71.
28. **Brückner H.** Eine neue Methode der Kreuzbandplastik. *Chirurg.* 1966;37:413-414.
29. **Buck BE, Malinin TI, Brown MD.** Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop Relat Res.* 1989;240:129-36.
30. **Bundestag.** Gesetz über Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben und Zellen (Gewebe-gesetz). *Bundesgesetzblatt I Jahrgang 2007 Nr. 35.* 2007:1574–1594.
31. **Campbell W** Reconstruction of the knee. *Am J Surg.* 1939;43:473-480.
32. **Cannon WD Jr, Vittori JM.** The incidence of healing in arthroscopic meniscal repairs in anterior cruciate ligament-reconstructed knees versus stable knees. *Am J Sports Med.* 1992;20(2):176-81.
33. **Casteleyn PP.** Management of anterior cruciate ligament lesions: surgical fashion, personal whim or scientific evidence? Study of medium- and long-term results. *Acta Orthop Belg.* 1999;65(3):327-39.
34. **Chang SK, Egami DK, Shaieb MD, et al.** Anterior cruciate ligament reconstruction: allograft versus autograft. *Arthroscopy.* 2003;19(5):453-62.
35. **Chen CH, Chen WJ, Shih CH.** Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon-patellar bone autograft. *J Trauma.* 1999;46:678-682.
36. **Chen CH, Chuang TY, Wang KC, et al.** Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon autograft: clinical outcome in 4-7 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;14(11):1077-85.
37. **Cho KO.** Reconstruction of the anterior cruciate ligament by semitendinosus tenodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1975;57(5):608-612.
38. **Christen B, Jakob RP.** Fractures associated with patellar ligament grafts in cruciate ligament surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 1992;74:617-619.
39. **Clark R, Olsen RE, Larson BJ, et al.** Cross-pin femoral fixation: a new technique for hamstring anterior cruciate ligament reconstruction of the knee. *Arthroscopy.* 1998;14(3):258-67.
40. **Coons AH, Creech HJ, Jones RN.** Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1941:200-202.

41. **Cooper DE, Deng XH, Burstein AL, et al.** The strength of the central third patellar tendon graft. A biomechanical study. *Am J Sports Med.* 1993;21(6):818-24.
42. **Cross MJ, Roger G, Kujawa P, et al.** Regeneration of the semitendinosus and gracilis tendons following their transection for repair of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med.* 1992;20(2):221-3.
43. **DeLay BS, Smolinski RJ, Nicoletta RJ, et al.** Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction: results of a survey. 68th Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. San Francisco; 2001.
44. **Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie + BV der Ärzte für Orthopädie.** Leitlinien der Orthopädie. *Frische und alte vordere Kreuzbandruptur.* 2002.
45. **DiStefano V.** Anterior Cruciate Ligament reconstruction. Autograft oder Allograft? *Clin Sports Med.* 1993;12(1):1-11.
46. **Dustmann M, Schmidt T, Gangey I, et al.** The extracellular remodeling of free-soft-tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: a comparison study in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008;16(4):360-9.
47. **Ellis DG.** Cross-sectional area measurements for tendon specimens: a comparison of several methods. *J Biomech.* 1969;2(2):175-86.
48. **Engebretsen L, Benum P, Fasting O, et al.** A prospective, randomized study of three surgical techniques for treatment of acute ruptures of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med.* 1990;18(6):585-90.
49. **Falconiero RP, DiStefano VJ, Cook TM.** Revascularization and ligamentization of autogenous anterior cruciate ligament grafts in humans. *Arthroscopy.* 1998;14(2):197-205.
50. **Faulk WP, Taylor GM.** An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry.* 1971;8(11):1081-3.
51. **Feagin J, Curl W.** Isolated tear of the anterior cruciate ligament. 5-year follow-up study. *Am J Sports Med.* 1976;4:95-100.
52. **Ferretti A, Conteduca F, De Carli A, et al.** Osteoarthritis of the knee after ACL reconstruction. *Int Orthop.* 1991;15(4):367-371.
53. **Ferretti M, Levicoff EA, Macpherson TA, et al.** The fetal anterior cruciate ligament: an anatomic and histologic study. *Arthroscopy.* 2007;23:278-83.
54. **Fideler BM, Vangness CT Jr., Lu B, et al.** Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human. *Am J Sports Med.* 1995;23(5):643-6.
55. **Fideler BM, Vangness CT Jr., Moore T, et al.** Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(7):1032-5.
56. **Fink C, Hoser C, Benedetto KP.** [Sports capacity after rupture of the anterior cruciate ligament-- surgical versus non-surgical therapy]. *Aktuelle Traumatol.* 1993;23(8):371-375.
57. **Fink C, Hoser C, Hackl W, et al.** Long-term outcome of operative or nonoperative treatment of anterior cruciate ligament rupture--is sports activity a determining variable? *Int J Sports Med.* 2001;22(4):304-9.
58. **Fox JA, Pierce M, Bojchuk J, et al.** Revision anterior cruciate ligament reconstruction with nonirradiated fresh-frozen patellar tendon allograft. *Arthroscopy* 2004;20(8):787-94.
59. **Frank CB, Jackson DW.** The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament—current concepts review. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79(10):1556–1576.
60. **Fulkerson JP, Langeland RH.** The central quadriceps tendon graft for cruciate ligament reconstruction. *Operative Techniques in Orthopaedics.* 1996;6(3):135-137.

61. **Fung YCB.** Stress-strain-history relations of soft tissues in simple elongation. *In Fung YCB ed. Biomechanics: Its Foundations and Objectives.* 1972.
62. **Gillquist J, Messner K.** Anterior cruciate ligament reconstruction and the long-term incidence of gonarthrosis. *Sports Med.* 1999;27(3):143-56.
63. **Goradia VK, Rochat MC, Grana WA, et al.** Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model. *Am J Knee Surg.* 2000;13(3):143-51.
64. **Goradia VK, Rochat MC, Kida M, et al.** Natural history of a hamstring tendon autograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model. *Am J Sports Med* 2000;28(1):40-6.
65. **Gorschewsky O, Klakow A, Pütz A, et al.** Clinical comparison of the Autologous Quadriceps Tendon (BQT) and the Autologous Patella Tendon (BPTB) for the reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;35(12):2118-25.
66. **Gorschewsky O, Klakow A, Riechert K, et al.** Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results. *Am J Sports Med* 2005;33(8):1202-9.
67. **Grana WA, Egle DM, Mahnken R, et al.** An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med.* 1994;22(3):344-51.
68. **Grüber J, Wolter D, Lierse W.** Der vordere Kreuzbandreflex. *Unfallchirurg.* 1986;89:551-554.
69. **Hammer DL, Brown CH Jr, Steiner ME, et al.** Hamstring tendon grafts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: biomechanical evaluation of the use of multiple strands and tensioning techniques. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(4):549-57.
70. **Henne C.** www.pathologie.de.
71. **Hinterwimmer S, Engelschalk M, Sauerland S, et al.** Operative vs. konservative Therapie der vorderen Kreuzbandruptur: eine systematische Literaturübersicht. *Der Unfallchirurg.* 2003;106(5):374-379.
72. **Hoffmann MW, Wening JV, Apel R, et al.** Repair and reconstruction of the anterior cruciate ligament by the "Sandwich technique". A comparative microangiographic and histological study in the rabbit. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1993;112(3):113-20.
73. **Hunt P, Scheffler SU, Unterhauser FN, et al.** A model of soft-tissue graft anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005;32(4):881-91.
74. **Inoue M, McGurk-Burleson E, Hollis JM, et al.** Treatment of the medial collateral ligament injury. I: The importance of anterior cruciate ligament on the varus-valgus knee laxity. *Am J Sports Med.* 1987;15(1):15-21.
75. **Jackson DW, Grood ES, Goldstein JD, et al.** A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med.* 1993;21(2):176-85.
76. **Jackson DW, Windler GE, Simon TM.** Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patella tendon-bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med.* 1990;18(1):1-10.
77. **Jackson DW, Corsetti J, Simon TM.** Biologic incorporation of allograft anterior cruciate ligament replacements. *Clin Orthop Relat Res.* 1996(324):126-33.
78. **Jackson DW, Grood ES, Cohn BT, et al.** The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(2):201-13.

79. **Jarvela T, Paakkala T, Kannus P, et al.** 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.* 2001;29(1):18-24.
80. **Johnson D.** AAOS 2004: All About Allografts -- Select Highlights of the 71st Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (San Francisco, California). *MedGenMed.* . 2004;6(4): 23.
81. **Jomha NM, Borton DC, Clingeffer AJ, et al.** Long-term osteoarthritic changes in anterior cruciate ligament reconstructed knees. *Clin Orthop Relat Res.* 1999(358):188-93.
82. **Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH.** *Histologie.* Vol. 4 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 1996.
83. **Kainer MA, Linden JV, Whaley DN, et al.** Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med.* 2004;350(19):2564-2571.
84. **Kannus P, Järvinen M.** Conservatively treated tears of the anterior cruciate ligament. Long-term results. *J Bone Joint Surg.* 1987;69(7):1007-1012.
85. **Kartus J, Stener S, Lindahl S, et al.** Factors affecting donor-site morbidity after anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone autografts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1997;5:222-228.
86. **Keene GC, Bickerstaff D, Rae PJ, et al.** The natural history of meniscal tears in anterior cruciate ligament insufficiency. *Am J Sports Med.* 1993;21(5):672-9.
87. **Kennedy JC, Weinberg HW, Wilson AS.** The anatomy and function of the anterior cruciate ligament. As determined by clinical and morphological studies. *J Bone Joint Surg Am.* 1974;56(2):223-35.
88. **Kirkpatrick JS, Seaber AV, Glisson RR, et al.** Cryopreserved anterior cruciate ligament allografts in a canine model. *J South Orthop Assoc.* 1996;5(1):20-9.
89. **Kohn D.** Arthroscopy in acute injuries of anterior cruciate-deficient knees: fresh and old intraarticular lesions. *Arthroscopy.* 1986;2(2):98-102.
90. **Kohn D, Schneider G, Dienst M, et al.** Diagnostik der Ruptur des vorderen Kreuzbandes. *Der Orthopäde.* 2002;31:719-730.
91. **Kramer A, Koch S** Teratogene Potenz von Wofasteril bei der ICR-Maus. *Hyg. Med.* 1990;15:371–372.
92. **Kuhn MA , Ross G.** Allografts in the treatment of anterior cruciate ligament injuries. *Sports Med Arthrosc.* 2007;15(3):133-8.
93. **Kustos T, Balint L, Than P, et al.** Comparative study of autograft or allograft in primary anterior cruciate ligament reconstruction. *Int Orthop.* 2004.
94. **Lee S , Seong SC , Jo H , et al.** Outcome of anterior cruciate ligament reconstruction using quadriceps tendon autograft. *Arthroscopy.* 2004;20(8):795-802.
95. **Lindemann K.** Über den plastischen Ersatz der Kreuzbänder durch gestielte Sehnenverpflanzung. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1950;79:316-334.
96. **Lipscomb AB, Johnston RK, Snyder RB, et al.** Evaluation of hamstring strength following use of semitendinosus and gracilis tendons to reconstruct the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med.* 1982;10(6):340-2.
97. **Lobenhoffer P.** Kniebandverletzungen: I. Anatomie, Biomechanik, Diagnostik, Indikationsstellungen. *Der Chirurg.* 1999;70:219-230.
98. **Lomas RJ , Jennings LM , Fisher J , et al.** Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts. *Cell Tissue Bank.* 2004;5(3):149-60.
99. **Macey HB.** A new operative procedure for repair of ruptured cruciate ligaments of the knee joint. *Surg Gynecol Obstet.* 1939;69:108-109.

100. **Markolf KL, Gorek JF, Kabo JM, et al.** Direct measurement of resultant forces in the anterior cruciate ligament. An in vitro study performed with a new experimental technique. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72:557-567.
101. **Marralle J, Morrissey MC, Haddad FS.** A literature review of autograft and allograft anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15(6):690-704.
102. **Marti C, Imhoff AB, Bahrs C, et al.** Metallic versus bioabsorbable interference screw for fixation of bone-patellar tendon-bone autograft in arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1997;5(4):217-21.
103. **Mason DY, Sammons R.** Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol.* 1978;31(5):454-60.
104. **Matsumoto A, Yoshiya S, Muratsu H, et al.** A comparison of bone-patellar tendon-bone and bone-hamstring tendon-bone autografts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2006;34(2):213-9.
105. **Mayr et al.** 24. Jahreskongress der Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA). Köln; 2007.
106. **Menke W, Schneider T, Schmitz B, et al.** Nachuntersuchungsergebnisse bei unbehandelter vorderer Kreuzbandruptur. *Sportverl. Sportschad.* 1990;4:169-74.
107. **Menschik A.** Mechanik des Kniegelenkes. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1974;112(3):481-95.
108. **Miyasaka KC, Daniel DM, Stone ML, et al.** The incidence of knee ligament injuries in the general population. *Am J Knee Surg.* 1991;4(1):43-8.
109. **Mücke H.** Zur Bestimmung und zum Spurennachweis von Peressigsäure in Gegenwart von Wasserstoffperoxid für die Praxis der Kaltsterilisation und Desinfektion. *Z. med. Labortechnik.* 1973;14:319-323.
110. **Muellner T, Kaltbrunner W, Nikolic A, et al.** Shortening of the patella tendon after anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 1998;14:444-454.
111. **Nakane PK, Pierce GB Jr.** Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem.* 1966;14(12):929-31.
112. **Newton PO, Woo SL, MacKenna DA, et al.** Immobilization of the knee joint alters the mechanical and ultrastructural properties of the rabbit anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 1995;13:191-200.
113. **Noyes FR, Barber-Westin SD.** Reconstruction of the lateral collateral ligament of the knee with patellar tendon allograft. Report of a new technique in combined ligament injuries. *Am J Sports Med.* 1999;27(2):269-70.
114. **Noyes FR, Butler DL, Grood ES, et al.** Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66(3):344-52.
115. **O'Donoghue D.** Surgical treatment of fresh injuries to the major ligaments of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 1950;32:721-38.
116. **Odensten M, Gillquist J.** Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 1985;67(2):257-62.
117. **Odensten M, Lysholm J, Gillquist J.** Suture of fresh ruptures of anterior cruciate ligament. A 5-year follow-up. *Acta Orthop Scand.* 1984;55:270-272.
118. **Ouweleen KM, McElroy JJ.** A unique complication following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 1995;11(2):225-8.
119. **Paulos LE, Butler DL, Noyes FR, et al.** Intra-articular cruciate reconstruction. II: Replacement with vascularized patellar tendon. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;172:78-84.
120. **Paulos LE, Wnorowski DC, Greenwald AE.** Infrapatellar contracture syndrome: Diagnosis, treatment and longterm follow-up. *Am J Sports Med.* 1994;22(440-449).

121. **Petersen W, Pufe T, Unterhauser F, et al.** The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2003;123(4):168-74.
122. **Petersen W, Laprell H.** Insertion of autologous tendon grafts to the bone: a histological and immunohistochemical study of hamstring and patellar tendon grafts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2000;8(1):26-31.
123. **Petersen W, Tillmann B.** Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl).* 1999;200(3):325-34.
124. **Petersen W, Zantop T.** Anatomy of the anterior cruciate ligament with regard to its two bundles. *Clin Orthop Relat Res.* . 2007;454:35-47.
125. **Peterson RK, Shelton WR, Bomboy AL.** Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction: A 5-year follow-up. *Arthroscopy.* 2001;17(1):9-13.
126. **Pinczewski LA , Lyman J , Salmon LJ , et al.** A 10-year comparison of anterior cruciate ligament reconstructions with hamstring tendon and patellar tendon autograft: a controlled, prospective trial. *Am J Sports Med.* 2007;35(4):564-74.
127. **Poolman RW , Abouali JA , Conter HJ , et al.** Overlapping systematic reviews of anterior cruciate ligament reconstruction comparing hamstring autograft with bone-patellar tendon-bone autograft: why are they different? *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(7):1542-52.
128. **Prodromos C , Joyce B , Shi K.** A meta-analysis of stability of autografts compared to allografts after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15(7):851-6.
129. **Pruss A, Hansen A, Kao M, et al.** Comparison of the efficacy of virus inactivation methods in allogeneic avital bone tissue transplants. *Cell Tissue Bank.* 2001;2(4):201-15.
130. **Pruss A, Kao M.** Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals.* 2002;30(2):125-133.
131. **Pruss A, Perka C, Degenhardt P, et al.** Clinical efficacy and compatibility of allogeneic avital tissue transplants sterilized with a peracetic acid/ethanol mixture. *Cell Tissue Bank.* 2002;3(4):235-43.
132. **Pruss A , Baumann B , Seibold M , et al.** Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals.* 2001;29(2):59-66.
133. **Pruss A , Göbel UB , Pauli G , et al.** Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue transplants--a reliable sterilization method. *Ann Transplant.* 2003;8(2):34-42.
134. **Radford WJ, Amis AA, Stead AC.** The ovine stifle as a model for human cruciate ligament surgery. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1996;9:134-139.
135. **Rappé M , Horodyski M, Meister K , et al.** Nonirradiated versus irradiated Achilles allograft: in vivo failure comparison. *Am J Sports Med.* 2007;35(10):1653-8.
136. **Rihn JA , Harner CD.** The use of musculoskeletal allograft tissue in knee surgery. *Arthroscopy.* 2003;19:51-66.
137. **Rispoli D.M., Sanders T.G., Miller M.D., et al.** Magnetic resonance imaging at different time periods following hamstring harvest for anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 2001;17(1):2-8.
138. **Ritchie JR , Parker RD.** Graft selection in anterior cruciate ligament revision surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 1996(325):65-77.

139. **Roberts TS, Drez D Jr, McCarthy W, et al.** Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med.* 1991;19(1):35-41.
140. **Robson AW Mayo.** Ruptured crucial ligaments and their repair by operation. *Ann Surg.* 1903;37:716-718.
141. **Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, et al.** Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(12):1795-803.
142. **Roe J, Pinczewski LA, Russell VJ, et al.** A 7-year follow-up of patellar tendon and hamstring tendon grafts for arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: differences and similarities. *Am J Sports Med.* 2005;33(9):1337-45.
143. **Rosenberg TD, Franklin JL, Baldwin GN, et al.** Extensor mechanism function after patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 1992;20(5):519-25; discussion 525-6.
144. **Rougraff B, Shelbourne KD, Gerth PK, et al.** Arthroscopic and histologic analysis of human patellar tendon autografts used for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 1993;21(2):277-84.
145. **Roux W.** *Die Entwicklungsmechanik: ein neuer Zweig der biologischen Wissenschaft* Leipzig: Wilhelm Engelmann; 1905.
146. **Rubinstein RA Jr, Shelbourne KD, VanMeter CD, et al.** Isolated autogenous bone-patellar tendon-bone graft site morbidity. *Am J Sports Med.* 1994;22(3):324-7.
147. **Rupp S, Hopf T, Hess T, et al.** Resulting tensile forces in the human bonepatellar tendon-bone graft: direct force measurement in vitro. *Arthroscopy.* 1999;15:179-184.
148. **Rupp S, Kohn D.** Vorderes Kreuzband im Mittelpunkt des Interesses. *Der Orthopäde.* 2002;31(8):701.
149. **Sajovic M, Vengust V, Komadina R, et al.** A prospective, randomized comparison of semitendinosus and gracilis tendon versus patellar tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction: five-year follow-up. *Am J Sports Med* 2006;34(12):1933-40.
150. **Sakane M, Fox RJ, Woo SL, et al.** In situ forces in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads. *J Orthop Res.* 1997;15(2):285-93.
151. **Scheffler S.** Der Einfluss des Verankerungsniveaus und der Verankerungsmethodik von Rekonstruktionstechniken des Vorderen Kreuzbandes mit "Hamstring-Sehnen". *Dissertationsschrift;* 2002.
152. **Scheffler S, Trautmann S, Smith M, et al.** No influence of collagenous proteins of Achilles tendon, skin and cartilage on the virus-inactivating efficacy of peracetic acid-ethanol. *Biologicals.* 2007;35(4):355-9.
153. **Scheffler SU, Scherler J, Pruss A, et al.** Biomechanical comparison of human bone-patellar tendon-bone grafts after sterilization with peracetic acid ethanol. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(2):109-15.
154. **Scheffler SU, Schmidt T, Gangéy I, et al.** Fresh-Frozen Free-Tendon Allografts Versus Autografts in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Delayed Remodeling and Inferior Mechanical Function During Long-term Healing in Sheep. *Arthroscopy.* 2008;24(4):448-458.
155. **Scheffler SU, Sudkamp NP, Gockenjan A, et al.** Biomechanical comparison of hamstring and patellar tendon graft anterior cruciate ligament reconstruction techniques: The impact of fixation level and fixation method under cyclic loading. *Arthroscopy.* 2002;18(3):304-15.
156. **Schwartz HE, Matava MJ, Proch FS, et al.** The effect of gamma irradiation on anterior cruciate ligament allograft biomechanical and biochemical properties in the

- caprine model at time zero and at 6 months after surgery. *Am J Sports Med.* 2006;34(11):1747-55.
157. **Sckell A , Leunig M , Fraitzl CR , et al.** The connective-tissue envelope in revascularisation of patellar tendon grafts. *J Bone Joint Surg.* 1999;81(5):915-20.
 158. **Scranton PE Jr, Lanzer WL, Ferguson MS, et al.** Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. *Arthroscopy.* 1998;14(7):702-16.
 159. **Seifried E , Findhammer S, Roth WK.** Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV - Experiences of the German Red Cross Blood Donation Services. *Dev Biol 108 (Basel).* 2002:23-7.
 160. **Seitz H , Marlovits S, Kolonja A, et al.** Meniskusläsionen nach konservativer Therapie vorderer Kreuzbandrupturen. *Arthroskopie.* 1998;11:177-182.
 161. **Seitz H, Hausner T, Schlenz I, et al.** Vascular anatomy of the ovine anterior cruciate ligament. A macroscopic, histological and radiographic study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1997;116(1-2):19-21.
 162. **Shelbourne KD, Nitz P.** Accelerated rehabilitation after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 1990;18:292-299.
 163. **Shelton WR, Papendick L, Dukes AD.** Autograft versus allograft anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 1997;13(4):446-9.
 164. **Shino K, Inoue M, Horibe S, et al.** Surface blood flow and histology of human anterior cruciate ligament allografts. *Arthroscopy.* 1991;7(2):171-6.
 165. **Shino K, Kawasaki T, Hirose H, et al.** Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br.* 1984;66(5):672-81.
 166. **Shino K, Kimura T, Hirose H, et al.** Reconstruction of the anterior cruciate ligament by allogeneic tendon graft. An operation for chronic ligamentous insufficiency. *J Bone Joint Surg Br.* 1986;68(5):739-46.
 167. **Shino K, Nakata K, Horibe S, et al.** Quantitative evaluation after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. Allograft versus autograft. *Am J Sports Med.* 1993;21(4):609-16.
 168. **Siebold R, Buelow JU, Boes L, et al.** Allogene Transplantate zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes bei Primär - und Revisionseingriffen. *Zentralbl Chir.* 2002;127:850-854.
 169. **Silvaggio VJ, Fu FH, Georgescu HI, et al.** The induction of IL-1 by freeze-dried ethylene oxide-treated bone-patellar tendon-bone allograft wear particles: an in vitro study. *Arthroscopy.* 1993;9(1):82-6.
 170. **Sommerlath K, Lysholm J, Gillquist J.** The long-term course after treatment of acute anterior cruciate ligament ruptures. A 9 to 16 year followup. *Am J Sports Med.* 1991;19(2):156-62.
 171. **Starke R , Hackensellner HA, von Versen R.** Experimentelle Untersuchungen zur Entkeimung von Transplantationsmaterial mit Peressigsäure. *Z Exp Chir Transplant Künstliche Organe.* 1984;17(5):254-8.
 172. **Stäubli HU, Schatzmann L, Brunner P, et al.** Quadriceps tendon and patellar ligament: cryosectional anatomy and structural properties in young adults. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1996;4(2):100-10.
 173. **Stäubli HU, Schatzmann L, Brunner P, et al.** Mechanical tensile properties of the quadriceps tendon and patellar ligament in young adults. *American Journal of Sports Medicine.* 1999;27(1):27-34.
 174. **Strehl A, Eggli S.** The Value of Conservative Treatment in Ruptures of the Anterior Cruciate Ligament (ACL). *J Trauma.* 2007;62(5):1159-62.

175. **Strobel MJ.** *Arthroskopische Chirurgie* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokio; 1998.
176. **Strohm PC, Mauch J, Südkamp N.** Ergebnisse nach vorderer Kreuzbandplastik in Abhängigkeit von der Verletzungsschwere. *Z Orthop Unfall.* 2006;144:444-445.
177. **Suarez LS , Richmond JC.** Overview of procurement, processing, and sterilization of soft tissue allografts for sports medicine. *Sports Med Arthrosc.* 2007;15(3):106-13.
178. **The American Orthopaedic Society for Sports Medicine Conference on Allografts in Orthopaedic Sports Medicine.** Keystone (CO); 2005.
179. **Tomita F, Yasuda K, Mikami S, et al.** Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-Patellar tendon-Bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 2001;17(5):461-76.
180. **Unterhauser FN, Bail HJ, Höher J, et al.** Endoligamentous revascularization of an anterior cruciate ligament graft. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;(414):276-88.
181. **Viola RW, Sterett WI, Newfield D, et al.** Internal and external tibial rotation strength after anterior cruciate ligament reconstruction using ipsilateral semitendinosus and gracilis tendon autografts. *Am J Sports Med.* 2000;28(4):552-555.
182. **von Versen R , Starke R.** The peracetic acid/low pressure cold sterilization--a new method to sterilize corticocancellous bone and soft tissue. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.* 1989;22(1):18-21.
183. **Vorlat P, Verdonk R, Arnauw G.** 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.* 1999;7(5):322.
184. **Vosse BA, Seelentag W, Bachmann A, et al.** Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15(1):103-7.
185. **Wagner M , Käüb MJ , Schallock J , et al.** Hamstring tendon versus patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction using biodegradable interference fit fixation: a prospective matched-group analysis. *Am J Sports Med.* . 2005;33(9):1327-36.
186. **Warren RF.** Meniscectomy and repair in the anterior cruciate ligament-deficient patient. *Clin Orthop Relat Res.* 1990(252):55-63.
187. **Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ, et al.** Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy.* 2002;18(2):124-35.
188. **Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A, et al.** Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy.* 2002;18(2):113-23.
189. **Weiler A, Peters G, Maurer J, et al.** Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep. *Am J Sports Med.* 2001;29(6):751-61.
190. **Weiler A, Richter M, Schmidmaier G, et al.** The endopearl device increases fixation strength and eliminates construct slippage of hamstring tendon grafts with interference screw fixation. *Arthroscopy.* 2001;17(4):353-359.
191. **Weiler A, Scheffler S, Höher J.** Transplantauswahl für den primären Ersatz des vorderen Kreuzbandes. *Der Orthopäde.* 2002;8:731-740.
192. **Weiler A, Unterhauser FN, Bail H-J, et al.** alpha-Smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *J Orthop Res.* 2002;20(2):310-17.
193. **Weiler A, Windhagen HJ, Raschke MJ, et al.** Biodegradable interference screw fixation exhibits pull-out force and stiffness similar to titanium screws. *Am J Sports Med.* 1998;26(1):119-26.

194. **Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, et al.** Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(2):107-14.
195. **Wilson TW, Zafuta MP, Zobitz M.** A biomechanical analysis of matched bone-patellar tendon-bone and double-looped semitendinosus and gracilis tendon grafts. *Am J Sports Med.* 1999;27(2):202-7.
196. **Woo SL, Chan SS, Yamaji T.** Biomechanics of knee ligament healing, repair, and reconstruction. *J Biomech.* 1997;30:431-439.
197. **Woo SL, Hollis JM, Adams DJ, et al.** Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex. The effects of specimen age and orientation. *Am J Sports Med.* 1991;19(3):217-25.
198. **Yasuda K, Tsujino J, Ohkoshi Y, et al.** Graft site morbidity with autogenous semitendinosus and gracilis tendons. *Am J Sports Med.* 1995;23(6):706-14.
199. **Zantop T, Petersen W, Sekiya JK, et al.** Anterior cruciate ligament anatomy and function relating to anatomical reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;14:982-92.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1: Merino-Schafe auf dem Freigelände des Institutes für Tierzucht der Freien Universität Berlin	23
Abb. 3-2: a) Übersicht über die rechte, hintere Extremität des Schafes b) Nach Aufklappen des M. gracilis ist die flächige und kurze Sehne des M. semitendinosus zu erkennen.	24
Abb. 3-3: Exsikkator mit Vakuum-Pumpe aus [129].....	25
Abb. 3-4: Präparation in Baseball-stitch Technik	27
Abb. 3-5: indirekte Transplantatfixation mittels Knochenbrücke distal und über Endobutton proximal	29
Abb. 3-6: Links) Skizze des Schubladentests beim Menschen in 30°-Flexion aus [197]. Rechts) modifizierter Schubladentest beim Schaf in 60°-Flexion	31
Abb. 3-7: Versagenstest	33
Abb. 3-8: Kraft-Strecke-Hystereseurve beim Versagenstest	34
Abb. 3-9: Darstellung der immunhistochemischen Färbemethode mit biotinyliertem Sekundäntikörper und Avidin-Biotin-Complex. Aus [70].....	38
Abb. 3-10: Darstellung der Unterteilung der Faktor VIII-Querschnittspräparate in eine subsynoviale, intermediäre und zentrale Zone zur Quantifizierung der Gefäßdichte	40
Abb. 4-1: Makroskopische Aufnahme des PES-Allografts nach 6 Wochen (links) und nach 12 Wochen (rechts)	42
Abb. 4-2: Fibrotische Hypertrophie (*) am tibialen Knochentunnel-Eingang:	43
1) makroskopisch von oben (a) und von medial (b).....	43
2) mikroskopisch (c) sind Knorpel, Fettgewebe und Kollagenfasern zu erkennen (HE-Färbung, 10x).	43
Abb. 4-3: VKB-nativ (a,c) und Flexorsehne nativ (b,d) (subsynovial, Querschnitt, HE-Färbung (oben), MG-Färbung (unten), 200x)	44
Abb. 4-4: PES-sterilisiertes Allograft nach 0 (a) und 6 (b) Wochen (zentral, Querschnitt, HE-Färbung, 200x)	45
Abb. 4-5: PES-sterilisiertes Allograft nach 6 Wochen mit lokalen, synovialen Hyperplasien mit bis zu 20 Zelllagen (a: Querschnitt, HE-Färbung, 200x; b: Querschnitt, MG-Färbung, 400x)	45
Abb. 4-6: PES-sterilisiertes Allograft nach 12 Wochen: Während von der, aus ca. 4-8 Zelllagen bestehenden, synovialen Hülle (b) bereits viele Zellen entlang der fingerförmig einwachsenden Bindegewebsstränge (a) in subsynoviale Regionen gewandert waren,	

präsentierten sich die zentralen und die intermediären (c,d) Bereiche noch inhomogen rezellularisiert. (a,b: subsynovial, Querschnitt, HE-Färbung, 200x. c,d: Querschnitt, MG-Färbung, 200x)	46
Abb. 4-7: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allografts zum Zeitpunkt 0 versus native Strukturen	47
Abb. 4-8: Gefäßanschnitte der PES-sterilisierte Flexorsehne zum Zeitpunkt 0 (a) und des nativen VKB (b) im Vergleich (intermediär, Faktor VIII-Färbung, 200x).....	48
Abb. 4-9: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allograft im zeitlichen Verlauf des Remodelings .	49
Abb. 4-10: subsynoviale Region der PES-sterilisierten Allografts nach 6 Wochen (a: Faktor VIII-Färbung, 200x; b: Faktor VIII-Färbung, 100x). Hypervaskularität nach 12 Wochen in den subsynovialen (d) und intermediären (c) Bezirken der PES-Allografts (Faktor VIII-Färbung, 200x).....	50
Abb. 4-11: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allografts versus Kontrollgruppen nach 6 Wochen	51
Abb. 4-12: Darstellung der großen Varianz im Gefäßstatus zwischen den einzelnen PES-Allografts nach 12 Wochen (a,b: subsynovial, Faktor VIII-Färbung, 200x)	52
Abb. 4-13: Gefäßstatus des PES-sterilisierten Allografts versus Kontrollgruppen nach 12 Wochen.....	53
Abb. 4-14: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts (Knie komplett) nach 6 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest	54
Abb. 4-15: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts/HKB nativ nach 6 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest.....	55
Abb. 4-16: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts nach 6 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen Schubladentest.....	56
Abb. 4-17: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts (Knie komplett) nach 12 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest	58
Abb. 4-18: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts/HKB nativ nach 12 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen und hinteren Schubladentest.....	59
Abb. 4-19: Laxizität und Steifigkeit der PES-Allografts nach 12 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen im vorderen Schubladentest.....	60
Abb. 4-20: Versagensmodus nach 6 Wochen (a) und nach 12 Wochen (b)	62
Tabelle 3-1: postoperative Standzeiten der PES-Allografts.....	22
Tabelle 3-2: postoperative Standzeiten der Kontrollgruppen aus (138)	22

Tabelle 4-1: strukturelle Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 6 Wochen im Versagenstest	57
Tabelle 4-2: strukturelle Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 12 Wochen im Versagenstest.....	61
Tabelle 4-3: Versagensmodus	62

9 Glossar

Abb.	Abbildung
ALLO	Allograft
AMB	anteromediale Bündel
AUTO	Autograft
ASMA	α - smooth muscle actin
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein-4
BPTB	bone patellar tendon bone
dest.	destillatum
EKG	Elektrokardiogramm
EO	Ethylenoxid
F.VIII	Faktor VIII
FSN	Flexorsehne
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBC	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HKB	Hintere Kreuzband
Lig.	Ligamentum
M.	Musculus
MG	Masson-Goldner Trichromfärbung
NaCl	Natrium Chlorid
PES	Peressigsäure
PLB	posterolaterale Bündel
VEGF	vascular endothelial growth factor
VKB	Vordere Kreuzband

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Norbert P. Haas, dem Direktor des Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin, und Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg Duda, dem Direktor des Julius Wolff Institut, in deren Abteilung ich diese Dissertationsarbeit erstellen durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Sven Scheffler, der als direkter Betreuer dieser Arbeit mir jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand. Ohne ihn und seine unermüdliche Unterstützung während der Durchführung der Arbeit wäre diese Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen.

Die Durchführung dieses Projekts, die Operationen an den Versuchstieren und die Tierversorgung wurde erst gemeinsam mit Frau Dr. vet. Karin Schlichting und meinen Kommilitonen Frau Julia Kamp, Tassilo Böhm und Sebastian Metzlauff möglich. Ihnen möchte ich hiermit nochmals ganz herzlich für die jederzeit freundliche, hilfreiche und konstruktive Zusammenarbeit danken. Außerdem möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. med. Frank Unterhauser für die Hilfe und Anregungen bei histologischen Fragen bedanken.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Forschungseinrichtung, insbesondere Dipl.-Ing. Jan Hoffmann, sowie den medizinisch-technischen Assistenten Frau Gabriele Hardung, Camilla Bergmann, Martin Wolnyk und besonders Marzena Princ.

Meinen Eltern, meiner Familie, ma copine und meinen Freunden gilt an dieser Stelle ganz großer Dank, da sich mich immer wieder mit Unterstützung und Hilfestellungen begleitet haben.

11 Publikationen

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

Scheffler SU, Gonnermann J, Kamp J, Schlichting K, Pruss A: Die Sterilisation mit dem Peressigsäure-Ethanol-Unterdruck-Verfahren inhibiert das Transplantatremodeling von Allografts als Ersatz des vorderen Kreuzbandes im Schafsmodell

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 24.-27.10.2007, Berlin

Scheffler SU, Kamp J, Gonnermann J, Schlichting K, Unterhauser F, Pruss A, Weiler A: Peracetic Acid-ethanol Sterilization Inhibits the Remodeling of Soft-tissue Allografts for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: An Experimental Study in the Sheep Model

6th Biennial ISAKOS (International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine) Congress, Florence, May 26 – 31, 2007

12 Curriculum vitae

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

13 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Johannes Gonnermann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Ein neuer Ansatz bei der Sterilisation von allogenen Sehnentransplantaten zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes“ 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