

Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative  
Medizin der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Heike Walles

Biokompatibilitätsmessungen, Anwendung und histologische  
Untersuchung eines Kreuzbandtransplantats aus Kollagen-I  
basiertem Biomaterial am Tiermodell

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Franziska Stöckhert

aus Regensburg

Würzburg, September 2018

**Referentin** : Prof. Dr. Heike Walles

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Holzapfel

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung** : 13.11.2019

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DAS VORDERE KREUZBAND.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	KLINISCHER HINTERGRUND .....	1
1.1.2	ANATOMISCHE, FUNKTIONELLE UND HISTOLOGISCHE GRUNDLAGEN .....	2
1.1.3	AKTUELLER STAND DER KREUZBANDCHIRURGIE.....	5
<b>1.2</b>	<b>TISSUE ENGINEERING.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>BIOKOMPATIBILITÄT .....</b>	<b>8</b>
1.3.1	DEFINITION.....	8
1.3.2	BEDEUTUNG DER BIOKOMPATIBILITÄT FÜR DEN KREUZBANDERSATZ .....	10
<b>1.4</b>	<b>FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....</b>	<b>12</b>
2.1.1	VERWENDETE LÖSUNGEN UND ANSÄTZE .....	12
2.1.2	CHEMIKALIEN UND MEDIKAMENTE .....	13
2.1.3	MATERIALIEN.....	15
<b>2.2</b>	<b>HERSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN DES KONSTRUKTES .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>TESTMETHODEN DER BIOKOMPATIBILITÄT .....</b>	<b>20</b>
2.3.1	HERSTELLUNG DES ELUATS.....	21
2.3.2	AUSLEGEN DER ZELLEN UND INKUBATION MIT ELUAT .....	21
2.3.3	PROLIFERATIONSMESSUNG NACH 48 UND 72 H .....	23
2.3.4	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....	23
2.3.5	ZELLZÄHLUNG UND ZELLMORPHOLOGIE .....	25
2.3.6	LANGZEITVERSUCH ZUM VERGLEICH DER LAGERUNGSBEDINGUNGEN .....	26
2.3.7	AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE .....	26
2.3.8	STERILITÄT DER GELAGERTEN KOLLAGENFASEN.....	26
<b>2.4</b>	<b>STUDIENDESIGN.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>DER TIERVERSUCH .....</b>	<b>29</b>
2.5.1	OPERATIVES VORGEHEN .....	30
2.5.2	POSTMORTALE ENTNAHME UND PRÄPARATION DES KREUZBANDES .....	32
<b>2.6</b>	<b>HISTOLOGIE .....</b>	<b>33</b>

2.6.1	FIXIERUNG, EINBETTUNG UND FÄRBUNG DER PROBEN.....	33
2.6.2	DESKRIPTIVE HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG .....	35
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE.....</u></b>	<b>37</b>
3.1	PROLIFERATIONSMESSUNG.....	37
3.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD .....	38
3.3	ZELLZÄHLUNG UND ZELLMORPHOLOGIE .....	39
3.4	LANGZEITVERSUCH ZUM VERGLEICH DER LAGERUNGSBEDINGUNGEN .....	40
3.5	STERILITÄT DER GELAGERTEN KOLLAGENFASERN .....	44
3.6	ANWENDUNG DES IMPLANTATS IM TIERVERSUCH .....	45
3.7	HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG .....	46
3.7.1	ERGEBNISSE DER 6-WOCHENGRUPPE .....	46
3.7.2	ERGEBNISSE DER 6-MONATSGRUPPE.....	50
3.7.3	KONTROLLPRÄPARATE .....	54
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b>56</b>
4.1	TESTMETHODEN DER BIOKOMPATIBILITÄT .....	56
4.2	MATERIALWAHL UND -EIGENSCHAFTEN .....	58
4.3	ERGEBNISSE DER BIOKOMPATIBILITÄTSTESTUNGEN.....	62
4.4	WAHL DES VERSUCHSTIERES .....	64
4.5	ERGEBNISSE DER TIERSTUDIE .....	65
4.6	ERGEBNISSE DER HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	67
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b><u>ANHANG.....</u></b>	<b>90</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das vordere Kreuzband

### 1.1.1 Klinischer Hintergrund

Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes (VKB) gehört zu den häufigsten Sportverletzungen - mit steigender Tendenz. Dafür ist auf der einen Seite die vermehrte Bedeutung von Freizeit- und Leistungssport verantwortlich. Auf der anderen Seite werden heutzutage viele Kreuzbandrupturen - auch schon länger bestehende - durch MR-Tomographie diagnostiziert, die früher aufgrund geringer klinischer Anzeichen unerkannt geblieben wären. In den Industrieländern geht man von einer Inzidenz von bis zu einer Verletzung pro 1.000 Einwohner und Jahr aus, abhängig von der Altersstufe, wobei hier die 15-25-Jährigen am häufigsten betroffen sind [1, 2]. Unter Frauen liegt die Inzidenz etwa 2,4 bis 9,5 mal höher als unter Männern, wie verschiedene Studien zeigen. Als Gründe für die höhere Rupturrate bei Frauen gelten eine kleinere Interkondylarnotch, schmalere Kreuzbänder, neuromuskuläre Defizite und Hormoneinflüsse [3, 4]. Der klassische Verletzungsmechanismus ist das Valgus-Flexions-Außenrotationstrauma oder Hyperextensionstrauma, wie es besonders häufig beim Fußball oder Skifahren vorkommt. Allerdings werden auch Rupturen nach Bagateltraumen beschrieben. In der Mehrzahl der Fälle kommt es zu weiteren Verletzungen, wie Meniskusrisse und Innenbandverletzungen. Die Kombination aus Innenbandriss, Innenmeniskusrisse und vorderer Kreuzbandruptur bezeichnet man hierbei als „Unhappy Triad“ [5].

Der Ausfall der Bandstrukturen führt zu einer pathologischen Bewegungsfreiheit im Kniegelenk, die in einen übersteigerten Tibiavorschub mündet. In der Folge werden die anderen stabilisierenden Komponenten des Kniegelenks überlastet, was zu Folgeschäden an Menisken und Knorpel und im schlimmsten Fall zur Kniegelenksarthrose führt [6].

Diagnostisch sind sowohl Anamnese, als auch klinische Untersuchung und Bildgebung, vor allem mittels MRT, wegweisend. In der Anamnese zu Unfallhergang und Verletzung kann häufig ein Krachen zum Zeitpunkt des Traumas, ein Wegknicken („giving-way“) und Schmerzen sowie Schwellung des Kniegelenks erfragt werden. Zur Überprüfung der Stabilität eignen sich verschiedene Tests wie der Lachman-, Pivot-shift- und vorderer Schubladentest, die jedoch in der Akutphase

auch unauffällig sein können oder aufgrund einer Schmerzsymptomatik nicht durchführbar. Zur Diagnose führt dann meist eine MRT-Bildgebung, in dem eine inhomogene Bandstruktur mit erhöhter Signalintensität auf eine Ruptur hinweist [5]. Fast immer hat die Verletzung weitreichende Konsequenzen für den Patienten, ganz besonders für den sportlich Ambitionierten. Unmittelbar führt die Verletzung zu einer Funktionsverminderung im Sinne von Sportverbot bis hin zur Arbeitsunfähigkeit, aber auch langfristig ist häufig ein Rückgang der körperlichen Aktivität zu verzeichnen, wenn auch die berufliche Tätigkeit im Normalfall wieder ausgeübt werden kann [7]. Hierbei kann durch die Rekonstruktion des Kreuzbandes eine Besserung des „giving-way“-Syndroms, eine verminderte Laxizität, sowie eine größere Stabilität des Gelenks erzielt werden. Dies hat allerdings keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Osteoarthritis, da diese in weiten Teilen vom Zustand der Menisci abhängt. Die ursprüngliche Gelenkfunktion und Leistungsfähigkeit wird jedoch auch durch eine Rekonstruktion fast nie erreicht [8].

### **1.1.2 Anatomische, funktionelle und histologische Grundlagen**

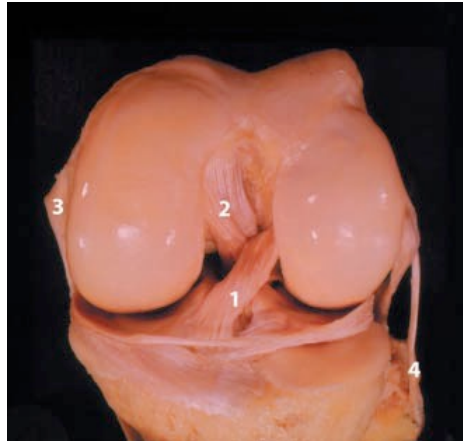
Das Kniegelenk ist funktionell ein Drehscharniergelenk, das Rotations- und Translationsbewegungen erlaubt. Es handelt sich um ein zusammengesetztes Gelenk, in dem die Femurkondylen mit den Tibiakondylen und die anteriore Fläche des Femurs mit der Patellarrückseite artikulieren. Beide Teilgelenke werden von einer gemeinsamen Kapsel umgeben [9].

Die knöchernen Führung ist sehr gering, so dass zur weiteren Stabilisierung passive Strukturen wie die Menisken, Kapsel und Bänder und aktive Strukturen wie die Muskulatur notwendig sind [10].

Die C-förmigen Menisken, die aus Faserknorpel bestehen und einen keilförmigen Querschnitt besitzen, sorgen für eine Anpassung der Gelenkflächen von Tibia und Femur sowie eine Vergrößerung der Kraft aufnehmenden Fläche [11]. Der mediale Meniskus ist über die Ligamenta meniscotibiale anterius und posterius mit dem Tibiaplateau verbunden, sowie mit dem medialen Kollateralband verwachsen, im Gegensatz zum lateralen Meniskus, der nur über die Ligamenta meniscofemorale anterius und posterius über die Kreuzbänder mit dem Femur verbunden ist. Zudem sind beide Menisken vorne durch ein Querband, dem Ligamentum transversum genus miteinander verbunden [9, 12].

Die Kreuzbänder, Ligamenta cruciatum anterius und posterius, sind nur von der membrana fibrosa umgeben Sie liegen demnach intrakapsulär, aber extrasynovial.

Das vordere Kreuzband verläuft vom lateralen Femurkondylus zur Area intercondylaris anterior der Tibia, also von oben hinten lateral nach vorne unten medial. Das hintere Kreuzband zieht vom medialen Femurkondylus zur Area intercondylaris posterior der Tibia [9]. Dies ist auf Abbildung 1 zu sehen.



**Abbildung 1:** Ansicht eines gebeugten linken Kniegelenks von vorn. Darstellung der Kreuzbänder, der Kollateralbänder und der Menisken. Zur Demonstration der Faserbündel der Kreuzbänder wurde die Synovialmembran abpräpariert (1 Lig. cruciatum anterius, 2 Lig. cruciatum posterius, 3 Lig. collaterale tibiale, 4 Lig. collaterale fibulare) (aus Petersen et. al. 2002)

Die Funktion der Kreuzbänder liegt in der Beschränkung der Roll-Gleitbewegung des Femurs gegen die Tibia, das vordere Kreuzband wirkt hier hauptsächlich gegen die Ventralverschiebung der Tibia, was in leichter Beugstellung am wirkungsvollsten geschieht.

Gleichzeitig stabilisieren die Kreuzbänder das Kniegelenk bei Rotationsbewegungen, wobei sie sich umeinander wickeln [13].

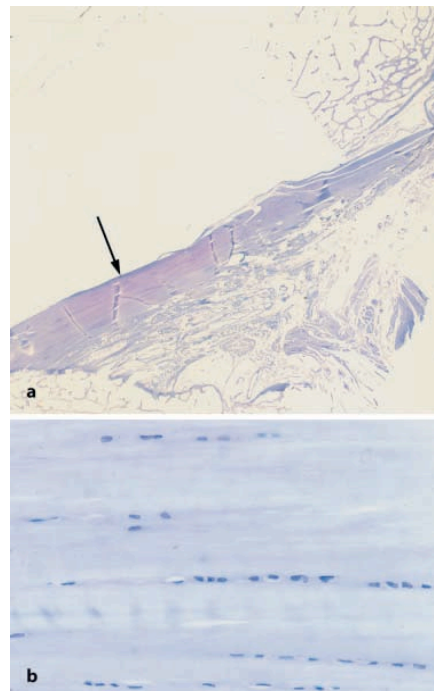
Bei genauerer Betrachtung zeigt sich für das vordere Kreuzband (VKB) eine Unterteilung in anteromediales und posterolaterales Bündel, wobei das vordere Bündel eher die Translationsbewegung und das hintere Bündel eher die Rotationsbewegung beschränkt [14].

Histologisch betrachtet besteht das Kreuzband, wie andere Bänder auch, aus dicht gepackten, longitudinal orientierten Kollagenbündeln, zwischen denen hauptsächlich Fibroblasten liegen. Aufgaben der Fibroblasten sind der Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix, womit sie entscheidend am Remodeling nach Verletzung oder Bandersatz beteiligt sind. Das Band besteht zu 65-70% aus Wasser. Weitere Bestandteile der Grundsubstanz sind Proteoglycane und Glykoproteine. Betrachtet man das Trockengewicht, so sind 70-80% Kollagen Typ I, angeordnet zu Kollagenfibrillenbündeln, was die Zugfestigkeit bedingt, gefolgt von Typ V und

Typ III Kollagen mit 12% bzw. 8%, wobei die viskoelastischen Eigenschaften des Kollagens Typ III die Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Zugbeanspruchungen in verschiedenen Gelenkstellungen möglich machen [15, 16]. Im Vergleich zu anderen Bändern zeichnet sich das vordere Kreuzband durch einen besonders hohen Anteil an Glykosaminoglycanen, ein spezifisches Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III und eine spezielle Ultrastruktur aus [17].

Die Kollagensynthese erfolgt durch die Fibroblasten, die intrazellulär Polypeptidketten, vorrangig aus Prolin, Glycin und Hydroxyprolin synthetisieren und zu einer  $\alpha$ -Tripelhelix verdrillen. Das sogenannte Prokollagen wird per Exozytose in den Extrazellularraum transportiert. Dort wird es zu Mikrofibrillen, Kollagenfibrillen und schließlich Kollagenfasern quervernetzt.

Die Kollagenfasern haben eine Dicke von 1-20  $\mu\text{m}$ . Sie lagern sich zu parallelen Bündeln zusammen, die in gewellter Form vorliegen und somit dem Gewebe eine gewisse Dehnbarkeit verleihen. Der Umbau der Kollagenfasern wird durch verschiedene Umwelteinflüsse wie die mechanische Beanspruchung und Wachstumsfaktoren reguliert [18, 19].



**Abbildung 2:** Längsschnitt durch ein VKB.

Der Hauptteil des VKB besteht aus straffem Bindegewebe. Im distalen Drittel weicht die Struktur von der typischen Struktur eines Bandes ab. In diesem Bereich besteht das VKB dort, wo es dem vorderen Rand der Fossa intercondylaris anliegt, aus Faserknorpel (Toluidinblaufärbung, Vergrößerung 4:1). b Ausschnitt aus dem distalen Drittel des VKB. Im vorderen Anteil des VKB kommen Knorpelzellen vor (Toluidinblaufärbung, Vergrößerung 60:1) (aus Petersen et al. 2002)

Außerdem besteht das Kreuzband oberhalb der tibialen Insertionszone aus Faserknorpel, was durch die Druck- und Schubbeanspruchung an dieser Stelle bedingt ist (siehe Abbildung 2) [20].

Vaskulär wird das vordere Kreuzband im proximalen Bereich von Ästen der Arteria media genus, distal von Ästen der Arteria mediae medialis und lateralis genus versorgt, die gemeinsam ein Netzwerk um die Bandstruktur bilden.

Die Länge des vorderen Kreuzbandes liegt zwischen 2,7 und 3,2 cm mit einer Reißfestigkeit von bis zu 2.500 N, abhängig von Alter und Geschlecht [21, 22].

Aufgrund der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des nativen Kreuzbandes nach Ruptur, die durch die geringe Vaskularisierung an den Insertionszonen und das Fehlen einer Weichteilüberbrückung bedingt ist, ist für die meisten Patienten, vor allem die sportlich aktiven, der Ersatz des Kreuzbandes die bevorzugte Therapie [16, 23].

### **1.1.3 Aktueller Stand der Kreuzbandchirurgie**

Für die chirurgische Versorgung der vorderen Kreuzbandruptur wird aktuell hauptsächlich zwischen zwei Operationsmethoden unterschieden - der Rekonstruktion mittels vierfach gelegter Semitendinosussehne und der Rekonstruktion durch eine Patellarsehnenplastik, beides arthroskopisch assistiert. Geringere Bedeutung hat der Ersatz durch Kunstbänder aus Dacron oder Gore Tex, durch die Quadrizepssehne oder allogene Transplantate. Diese Varianten kommen hauptsächlich in Spezialfällen und bei Revisionseingriffen in Betracht.

Nachdem lange Zeit die Patellarsehnenplastik als Goldstandard galt, wurde sie mittlerweile durch die Semitendinosussehnenplastik abgelöst [24].

Bei der Patellarsehnenplastik wird das zentrale Drittel des Ligamentum patellae mitsamt angrenzenden Knochenblöcken aus Patella und Tuberositas tibiae mittels Hohlfräse entnommen und dann zapfenförmig angespitzt. Wenn möglich wird femoral der Knochenblock in den anfangs mit Hilfe von Zielgeräten, Führungsdraht und kanüliertem Bohrer gebohrten Halbtunnel eingeschlagen, so dass er sich verklemmt (Pressfittechnik). Tibial wird die Verbolzungstechnik angewendet, wobei der Knochenblock im tibialen Kanal, der auf gleiche Art und Weise wie der femorale gebohrt wurde, mit Hilfe eines Spongiosazyinders befestigt wird. Ebenfalls möglich ist eine Fixation mittels Interferenzschrauben, falls die anderen Techniken nicht gelingen [25].

Durch die Knochenblöcke ist eine schnelle und sichere Einheilung mit hoher Stabilität gewährleistet, die Reruptur-Rate liegt zwischen 4,3% und 10,3% [26, 27]. Nachteilig wirkt sich jedoch die Entnahmestelle aus, die zu einer Schwächung des Knie-Streck-Apparates, Patellalängsfrakturen, postoperativen Bewegungseinschränkungen, Patellarsehnenrupturen, Schmerzen im vorderen Kniebereich (bis zu 38%) und muskulärer Dysbalance führen kann [26, 28]. Dies wird als Donor-site morbidity bezeichnet [29-31].

Bei der Semitendinosusplastik wird die Sehne über einen kleinen Hautschnitt medial der Tuberositas tibiae mittels eines Sehnenstrippers entnommen. Ab einer Länge von 28 cm kann die Sehne vierfach gelegt werden, bei kleineren Transplantaten ist die Hinzunahme der Sehne des musculus gracilis notwendig. Ähnlich wie bei der Patellarsehnenplastik werden femoral und tibial mit Hilfe von Zielgerät, Führungsdraht und kanülierten Bohrern Kanäle gebohrt, die im Durchmesser dem hergestellten Transplantat entsprechen. Das vernähte Transplantat wird mit einem Draht und Fäden in den femoralen Kanal eingezogen und mit Crosspin, Interferenzschraube oder Endobutton befestigt. Tibial erfolgt die Verankerung mittels Interferenzschraube oder Suture Disc [32].

Die Semitendinosustransplantate heilen langsamer ein, was eine anfangs vorsichtigere Rehabilitation fordert. Zu den postoperativen Problemen zählen ein Defizit der Beugekraft sowie Schmerzen an der Entnahmestelle, die sich nicht in allen Fällen vollständig regenerieren [33]. Jedoch ist die Entnahmemorbidity geringer als bei Patellarsehnenstransplantaten [34, 35]. Beispielsweise liegt die Rate der Schmerzen beim Knien und Beugen bei 2-3% bei Semitendinosustransplantaten gegenüber bis zu 36% bei Patellatransplantaten. Daher sollten Patellatransplantate nicht für Patienten mit kniender Tätigkeit angewandt werden [28, 35].

Hinsichtlich der Gesamtüberlegenheit ist die Studienlage kontrovers mit Vorteilen für die Semitendinosustransplantate [28, 35, 36].

In Sonderfällen wird schon heute eine kleine Anzahl der Kreuzbandplastiken in Deutschland mit Allografts durchgeführt. In den USA sind die Zahlen in den letzten Jahren stark angestiegen, so dass mittlerweile in fast der Hälfte der Fälle eine Versorgung mittels Allograft erfolgt [37, 38]. Die Allografts werden von Leichen entnommen und in unterschiedlichen Verfahren sterilisiert sowie auf eine mögliche Infektion untersucht. Hier spielen vor allem HI- und Hepatitis-Viren eine wichtige

Rolle, da sie potentiell lebensbedrohlich sein können. Die exakten Vorgaben zur Testung variieren je nach Land und Gewebe [39].

Des Weiteren gibt es synthetische Grafts basierend auf Materialien wie Gore-Tex oder Dacron.

Vorteile sind hier die fehlende Entnahmemorbidität, die kürzere Operationszeit sowie das kosmetische Ergebnis. Nachteile sind bei Leichenpräparaten die Infektionsgefahr mit Viren (HIV, Hepatitis) und die geringe Verfügbarkeit, bei Kunstmaterialien die teilweise mangelnde Haltbarkeit und Reißfestigkeit, sowie ein Abrieb innerhalb des Gelenks und die mögliche Abstoßungsreaktion [2, 40, 41].

Insgesamt lässt sich sagen, dass durch die heutigen Operationsmöglichkeiten noch keine vollständig zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden, da auf der einen Seite die OP-Komplikationen und auf der anderen Seite das auch postoperativ erhöhte Risiko einer Gonarthrose stehen.

## **1.2 Tissue Engineering**

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Fachgebiet mit dem Ziel, einen Ersatz für Organe und andere menschliche Gewebe wie Bänder, Haut und Knochen zu entwickeln oder deren Heilung und Funktion zu verbessern. Hierfür werden isolierte in-vitro gezüchtete Zellen, dreidimensionale Träger aus Biomaterialien und biologisch aktive Stoffe wie Wachstumsfaktoren einzeln oder in Kombination verwendet. Durch die Kombination sollen natürliche Wachstumsbedingungen imitiert werden.

Im Bereich des Tissue Engineering für Bänder und Sehnen kommen als Trägermaterialien verschiedenste Stoffe wie Kollagene, Hyaluronsäure, Seide und Polymere in Frage. Für den Zellersatz kann entweder auf mesenchymale Stammzellen oder auf reife Fibroblasten zurückgegriffen werden. Zur Verbesserung der Bedingungen für Zellansiedlung und Proliferation werden Sauerstoff, Wachstumsfaktoren und weitere Blutserumbestandteile erprobt [17].

Durch die begrenzte Regenerationsfähigkeit des Kreuzbandes und vielfältige Probleme beim autologen Kreuzbandersatz gewinnt das Tissue Engineering hier an besonderer Bedeutung. Die komplexe Struktur und Biomechanik des Kreuzbandes stellen große Herausforderungen an die Entwicklung eines gleichwertigen Implantates.

Schwierig ist vor allem die Ausbildung einer bandähnlichen extrazellulären Matrix unter schlechten Vaskularisationsbedingungen. Zudem sollte das Implantat

biokompatibel sein und eine hohe Porosität besitzen, um das Einwachsen von Zellen zu ermöglichen. Mit steigender Porosität sinkt die Reißfestigkeit. Diese muss jedoch bei dem Kreuzbandersatz sowohl direkt nach der Implantation, als auch während der Phase der Zelleinwanderung und des Materialumbaus ausreichend gegeben sein [17, 42, 43].

Für die Anwendung im klinischen Bereich müssen außerdem eine einfache Implantation mit bewährten Fixationsmethoden und ein minimales Infektionsrisiko gewährleistet werden.

In diesem Bereich befindet sich das Tissue Engineering noch auf dem Stand der Grundlagenforschung. Eine klinische Anwendbarkeit konnte bis jetzt noch nicht zufriedenstellend erreicht werden.

## **1.3 Biokompatibilität**

### **1.3.1 Definition**

*“Biocompatibility refers to the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application” – Biokompatibilität bezeichnet die Fähigkeit eines Materials, mit einem adäquaten Wirt in einer spezifischen Anwendung eine Reaktion zu vollziehen [44].*

Der Begriff Biokompatibilität beschreibt die Verträglichkeit eines technischen und eines biologischen Systems. Unterschieden wird die Strukturkompatibilität, die eine Anpassung der Implantatstruktur an mechanische Eigenschaften des Empfängergewebes darstellt, von der Oberflächenkompatibilität, die alle Oberflächeneigenschaften des Implantats und deren Wechselwirkung mit dem Empfängergewebe berücksichtigt. Beide sind sowohl Teil der statischen Biokompatibilität als auch der dynamischen Biokompatibilität, welche die Dauer der angestrebten Verbindung berücksichtigt.

Des Weiteren spielt für die Biokompatibilität die Art des Implantates eine Rolle. Hier kann man Ultrakurzzeit- (z.B. chirurgisches Instrument während OPs; <24 h), Kurzzeit- (z.B. Fäden; 24 h bis 30 d) und Langzeitimplantate (z.B. Endoprothese; >30 d) unterscheiden.

Folgende Grade der Biokompatibilität werden unterschieden:

Biokompatibel heißt, dass zwar Substanzen freigesetzt werden können, jedoch in nicht toxischer Konzentration, und so zur Einkapselung oder schwachen Fremdkörperreaktion führen können.



Bioinert bedeutet, dass keine toxischen Substanzen freigesetzt werden, aber auch keine biologische Aktivität besteht.

Bioaktiv sagt aus, dass durch eine positive Interaktion zwischen Material und Gewebe eine Bindung bzw. Adhäsion und gegebenenfalls ein Umbau des implantierten Materials erfolgt.

Je nach Grad der Biokompatibilität kommt es zu unterschiedlichen Implantat-Gewebe-Interaktionen (siehe Tabelle 1) [45-47].

**Tabelle 1: Übersicht über die Implantateigenschaften und folgende Gewebereaktion**

<b>Implantat-Eigenschaften</b>	<b>Gewebereaktion</b>
toxisch	Gewebenekrose
inert	Gewebe bildet nicht-adhärente Bindegewebekapsel um das Implantat
bioaktiv	Gewebe bildet Bindung mit Implantat
degradabel	Gewebe ersetzt Implantat

Zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten gibt es die Norm DIN EN ISO 10993. Hier sind in insgesamt 20 Teilen Normen für die Prüfung der Verträglichkeit von Medizinprodukten festgelegt.

Für die Überprüfung der Biokompatibilität ist insbesondere die DIN Norm Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2017) wichtig.

Es erfolgen zuerst in-vitro-Tests mit isolierten Zellen, in Form von Organkulturen oder einfachen Zellkulturen. Hier unterscheidet man zwischen Extraktionstests, Tests mit direktem Material-Zell-Kontakt und Tests mit indirektem Material-Zell-Kontakt, wie in der entsprechenden DIN-Norm festgehalten.

Das geeignete Prüfverfahren wird je nach Material und Anwendung anhand eines Prüfschemas gewählt.

Das Auswertungsverfahren ist in der DIN-Norm offen gelassen. Vier Bewertungskategorien dienen der Beurteilung der Zytotoxizität anhand der Ergebnisse:

- Abschätzungen der Zellschädigung aufgrund morphologischer Veränderungen
- Messungen der Zellschädigung
- Messungen des Zellwachstums
- Messungen spezifischer Aspekte des Zellstoffwechsels.

Dies kann mit verschiedenen Testmethoden überprüft werden [45, 48, 49].

Dann werden Anwendung und Applikationstechniken durch in-vivo-Tests an geeigneten Tieren überprüft und zuletzt klinische Studien an Menschen durchgeführt. Für die Zellkultur werden meist Monolayerkulturen, also Zellen, die den Boden eines Kulturgefäßes mit einer Lage Zellen vollständig besiedeln, verwendet. Für eine optimale Aussagekraft sollten die gleichen Zellen verwendet werden, die auch in der späteren Anwendung in Kontakt mit dem Implantat treten. So bietet sich für die Forschung an bindegewebigen Strukturen wie Sehnen und Bändern die Verwendung von fibroblastären Zelllinien an. Für andere Bereiche gibt es auch epitheliale, endotheliale, lymphoblastische und viele weitere spezifische Zelllinien. Diese Differenzierung ist wichtig, da verschiedene Zelllinien unterschiedlich auf Biomaterialien reagieren.

### **1.3.2 Bedeutung der Biokompatibilität für den Kreuzbandersatz**

Da es sich beim Kreuzbandersatz aufgrund der mangelnden Regenerationsfähigkeit des nativen Kreuzbandes um ein Langzeitimplantat handelt, spielt die Verträglichkeit im Gewebe eine bedeutende Rolle. Weder soll das Konstrukt eine zytotoxische Wirkung auf das Gewebe mit nachfolgender Entzündung und Nekrose entfalten, noch soll das Gewebe eine Abstoßungsreaktion entwickeln, die zur Schädigung des Konstruktes und somit zur Funktionsminderung bis hin zum Funktionsverlust führen kann.

Deshalb ist es wichtig, neue potenzielle Konstruktmaterialien in-vitro und in-vivo auf ihre Verträglichkeit hin zu überprüfen.

Ziel ist ein bioaktives Kreuzbandimplantat, das das umliegende Gewebe und dessen Zellen derart anregt, dass es neue Zellen und neues Gewebe anstelle bzw. zur Unterstützung des Implantates ausbildet und so das Implantat langfristig ersetzen bzw. stabilisieren und den ursprünglichen Funktionszustand wiederherstellen kann. Dieser Ligamentisierung bzw. Remodeling genannte Prozess des Umbaus geht mit einer Vaskularisierung sowie einer Neuorganisation der Zellen und der Extrazellulärmatrix einher und wurde sowohl für autologe Sehnen als auch für allogene Materialien beobachtet [50-52]. Für autologe Sehnen kann der Remodelingprozess in Phasen der avaskulären Nekrose, Revaskularisierung, Zellproliferation und Extrazellulärmatrixproduktion unterteilt werden [51, 53]. Besonders zu beachten ist, dass die Biodegradierung und der Wiederauf- bzw. -umbau mit körpereigenem Gewebe zu einer temporären reduzierten Reißfestigkeit

mit Implantatversagen führen kann. Es ist daher ein detailliertes Wissen über den Ablauf des Remodelings notwendig, um die Rehabilitation angemessen zu gestalten. Im Idealfall wird durch das Implantat eine erhöhte Reißfestigkeit gegenüber dem nativen Kreuzband erreicht.

#### **1.4 Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Biokompatibilität und Histologie eines Kreuzbandkonstruktes, das aus Kollagen I aus natürlicher Quelle hergestellt wurde.

Die Biokompatibilität der verwendeten Kollagenfasern wurde vor und nach  $\gamma$ -Sterilisation zuerst in-vitro an Fibroblasten anhand der Parameter Zellproliferation, Proteinbiosynthese, Zellzahl und Zellmorphologie überprüft, wobei auch die Lagerungsbedingungen über längere Zeiträume mitberücksichtigt und verglichen wurden. Im weiteren Verlauf wurde die Biokompatibilität in-vivo im Verlauf einer Tierversuchsreihe mit 16 Mini Pig Modellen kontrolliert. Hier wurde ein Kreuzbandkonstrukt aus den oben genannten Fasern anstelle des nativen VKBs im offenen Operationsverfahren mit Fixierung über Endobuttons implantiert. Des Weiteren wurden je acht der Konstrukte nach sechswöchiger bzw. sechsmonatiger Versuchszeit histologisch aufgearbeitet, wobei bei Entnahme auch mögliche Zeichen einer Entzündungsreaktion beachtet wurden. Die histologische Aufarbeitung sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit das Kollagen-basierte Konstrukt eine Gewebereaktion im Sinne eines Remodeling hervorgerufen hatte. Hier wurden insbesondere die Bandinsertion, die Vaskularisierung, die Zelleinwanderung und die Anpassung an physiologische Belastungen betrachtet. Auf Entzündungszeichen wurde als Hinweis auf eine mögliche unerwünschte Abstoßungsreaktion ebenfalls geachtet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Lösungen

#### 2.1.1 Verwendete Lösungen und Ansätze

##### Fixierlösung

124 ml	Formaldehyd 36%
540 ml	Methylalkohol 100%
130 ml	Barbital-Natrium-Puffer pH 7,4
6 g	Glukose

##### Chromogenpuffer

3,96 g	Sigma HCL T325
0,54 g	Sigma T 1503
2,63 g	NaCl
300 ml	Aqua dest.

##### LB-Medium

2 g	Hefeextrakt
4 g	Trypton
2 g	Natriumchlorid
400 ml	Aqua dest.

##### PBS

	hergestellt aus PBS Dulbecco Instamed Pulver
80g	NaCl
2 g	KCl
14,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

##### Präinfiltrationslösung

200 ml	entstabilisierte Technovit 9100® Basislösung
1g	„Härter 1“

### **Infiltrationslösung**

250 ml	entstabilisierte Technovit 9100® Basislösung
20 g	Pulver 2
1 g	„Härter 1“

### **Polymerisationsgemisch**

9 Volumenanteile Stammlösung A + 1 Volumenanteil Stammlösung B

#### **Stammlösung A**

80 g	Pulver 2 in entstabilisierter Basislösung
3 g	„Härter 1“

#### **Stammlösung B**

44 ml	entstabilisierter Basislösung
4 ml	„Härter 2“
2 ml	„Regler 5“

Antikörper aus dem Kaninchen (Faktor VIII rabbit polyclonal, BIOCARE, Deutschland)

Anti Kaninchen Antikörper hergestellt in der Ziege (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland)

Antikörperlösung (Dako, Hamburg, Deutschland)

Polyklonaler Anti Schwein Antikörper hergestellt im Kaninchen (ACRIS, Aachen, Deutschland)

Anti Ratte Antikörper (Quartett, Berlin, Deutschland)

### **2.1.2 Chemikalien und Medikamente**

Alkalische Phosphatase Substrat	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Aquatex	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Atropin	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Azaperon	Jansen GmbH, Neuss, Deutschland
Burprenorphin	Reckitt-Benckiser, London, UK
Butoxyethyl-Acetat	Merk Schurchart, Hohenbrunn,

CellTiter-Glo® Kit	Deutschland
DC Protein Assay	Promega, Madison, USA
DMEM high glucose	BioRad, München, Deutschland
	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
DMSO	Applichem über Fa. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
EDTA	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Ethanol 70%	
Fentanyl	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	BioChemica, Fa. Applichem, Darmstadt
Hyaluronidase	SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isofluran	Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Ketamin	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Metacam	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Fa. Applichem, Darmstadt, Deutschland
Normalserum Ziege	VECTOR Laboratories, Burlingame, CA
Paraffin	Paraplast Plus®, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield; USA
Paraformaldehyd	
PBS Dulbecco Instamed Pulver	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin	VETOQUINOL AG, Ittingen, Schweiz
Pepsin	SIGMA P-7012, Steinheim, Deutschland
PMS	Phosphormolybdänsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
Ringer - Lactat	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Technovit 9100®	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG,

	Wehrheim; Deutschland
Thiopental	Nycomed Deutschland GmbH, Deutschland
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
Trypton	BioChemica, Fa. Applichem, Darmstadt, Deutschland
Vectastain ABC Kit	Alkaline Phosphatase Universal, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Vitro-Clud®	R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

### 2.1.3 Materialien

24-Well Platte	Greiner Bio One Cellstar, Frickenhausen, Deutschland
Abdecktuch rechteckig mit Klebestreifen	Medline International Germany GmbH, Kleve, Deutschland
Adhäsionsobjektträger	HistoBond®, Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen; Deutschland
Aluschale mit Tupfer	
Analysenwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Arterienklemme	
Autoklav	Varioklav, HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Becherglas	
Bohrer	
Bohrer kanüliert 3.0; 3.5; 4.0; 4.5 Set	
Combitip plus	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

Deckgläser	Menzel Gläser, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Axioskop 40, Zeiss
Elektrokauter	
Elisareader SUNRISE	Tecan, Männedorf, Schweiz
Entwässerungsautomat	TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
EppendorfgeläÙe	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Eppizentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland)
Ethicon Prolene 2-0	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Fettstift	PAP PEN, G. Kisker, Steinfurt, Deutschland
Filterhalter	25 mm, steril, Fa. Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, Deutschland
Fixiergitter	Tissue Tek III, Miles Limited, Slough; England
Fotoschale aus Kunststoff	
50 ml Fläschchen	
Gewicht 200 g	
Gewicht 500 g	
Gewicht 600 g	
Glasflasche 100ml	Fa. Schott GmbH, Mainz, Deutschland
Glaspipetten 10 ml	
Haken	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Hartschnittmikrotom	Leica GmbH, Bensheim, Deutschland
Heraeus Multifuge X1R Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Inkubator	Hera Cell, Thermo Scientific, Waltham, USA
Kanüle 2mm	
Kirschnerdraht mit Öse und Spitze 15mm	
Kisolfolie	MDS GmbH, Buseck, Deutschland



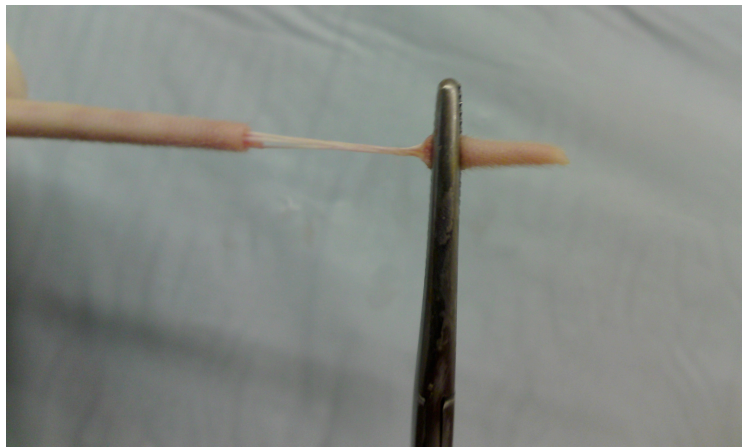
Knochennadel	
Kühlplatte	Leica EG 1130, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch; Deutschland
Längenmessgerät	
Lineal	
Lochplatte mit Durchmesserangabe	
Löffel scharf	
Makro-Trennschleifsystem	EXAKT-Apparatebau GmbH, Norderstedt; Deutschland
Manipler	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Melaminschale weiß	
Membranfilter 0,45 µm, 25 mm	Nylon Fa. Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, Deutschland
Mikroskop	Axioskop 40, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskopkamera	Axio Cam MRC 5, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikrotiterplatten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotom	Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch; Deutschland
Mullkompressen	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland
Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nadelhalter	
Objektträger	Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda- Königshofen; Deutschland
OP-Tape	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath, Deutschland
Paraffintank	Leica EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch; Deutschland
Petrischale	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pinzette anatomisch	Fa. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Pinzette chirurgisch	Fa. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pinzette spitz	Fa. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen blau	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen gelb	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettierhilfe Accu-Jet	Fa. Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Plastikstab 1cm	
Polyethylen green 3mm	
Präparierschere	
Rattenschwänze	Charles River, Wilmington, USA
Schlauchüberzüge steril	
Schlitztuch	
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Seralon Op-Faden	
Sigma T 1503	Sigma ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Skalpellgriff	
Skalpellklinge	
Spritzenhülle 1ml	
Sprühpflaster	
Sterilbank	Heraeus Hera Safe, Mannheim, Deutschland
Suture Button	Arthrex, Naples, USA
Trypticase-Soja-Agar + 5% Schafsblut- Platte	Fa. Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tube 50ml Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Vekaplan KT-Plättchen	
Vicryl 1.0	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Vitro-Clud®	Langenbrinck, Labor- und

	Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Vortex	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Wärmeschrank	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG., Wehrheim, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Improved, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Zellen L929 CC1 Maus-Fibroblasten	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

## ***2.2 Herstellung und Eigenschaften des Konstrukt***

Für das Konstrukt wurden Kollagenfasern bestehend aus Kollagen I aus Rattenschwänzen extrahiert und nach Länge bzw. Dicke und Qualität sortiert. Für die Extraktion wurde eine Arterienklemme verwendet, mit der das Ende des Rattenschwanzes fixiert und so lange rotiert wurde, bis die Kollagenfasern sich lösten und vorsichtig mit der Pinzette herausgezogen werden konnten (siehe Abbildung 3).

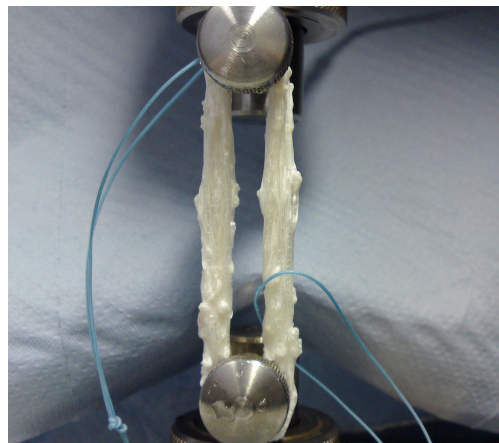


**Abbildung 3:** Isolation der Kollagenfasern aus einem Rattenschwanz. Diese erfolgte von kaudal durch Rotation am Schwanz und vorsichtiges Herauslösen der Fasern (aus Bischofberger 2013, mit freundlicher Erlaubnis).

Da alle Fasern gleichbleibende Reißfestigkeit aufweisen sollten, erfolgten zur Qualitätskontrolle Belastungstests mit Gewichten von 6 N und 5 N. Alle isolierten und

geprüften Fasern wurden dreifach durch 10-minütige Inkubation in 70% Ethanol sterilisiert, anschließend unter der Sterilbank zweifach mit sterilem PBS gewaschen und in 50 ml Röhrchen in sterilem PBS gelagert. Die Kollagenfasern wurden der Länge nach dreifach geknotet, wobei die Knoten jeweils mit 2 N erneut auf Reißfestigkeit geprüft wurden. Es erfolgte eine erneute Sterilisation der fertigen Kollagenfäden nach dem oben beschriebenen Verfahren. Zur Konstruktherstellung wurden diese in 15 Wicklungen um eine spezielle Halterung geschlungen und dann doppelt gelegt, so dass ein 4 cm langes und 4 mm dickes Konstrukt mit zwei Bündeln entstand (siehe Abbildung 4).

Später wurden diese Bündel ein weiteres Mal umeinander verdreht. Die Lagerung des fertigen Konstrukts erfolgte in einem 50 ml Röhrchen mit sterilem PBS, welches mit Datum, Chargennummer und Konstruktdatei versehen war, und noch am selben Tag sterilisiert wurde. Alle Konstrukte und ein Teil der isolierten Kollagenfasern wurden an die BBF-Sterilisationsservice GmbH zur  $\gamma$ -Sterilisation versandt, wo sie mit 25 kGy bestrahlt wurden. Detaillierte Ausführungen zu Konstruktherstellung und biomechanischen Eigenschaften sind in der Inauguraldissertation von Bischofberger zu finden [54].



**Abbildung 4:** Konstrukt bei der biomechanischen Messung. Vor Einbau im Mini Pig erfolgte eine Verdrehung der beiden Bündel (aus Bischofberger 2013, mit freundlicher Erlaubnis).

### **2.3 Testmethoden der Biokompatibilität**

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Tests entsprechen der Norm DIN EN ISO 10993-5. Diese gibt ein Prüfschema vor, das zur Auswahl der geeigneten Prüfverfahren dienen soll. Als mögliche Prüfverfahren stehen die Herstellung eines Extrakts, der direkte Zell-Material-Kontakt und der indirekte Zell-

Material-Kontakt zur Verfügung. Hier wurde die Herstellung eines Extrakts gewählt. Zur Auswertung dienten gemäß der DIN-Norm die Beurteilung der Zellmorphologie sowie Messungen des Zellwachstums als auch des Zellstoffwechsels.

### **2.3.1 Herstellung des Eluats**

Für die Herstellung des Eluats wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren Kollagenfasern aus Rattenschwänzen gewonnen und sterilisiert. Zum Trocknen wurde zuerst das Leergewicht einer Petrischale bestimmt, um danach eine genaue Gewichtsangabe über die getrockneten Kollagenfasern machen zu können. Dann wurde ein möglichst kompaktes Häufchen Kollagenfasern unter der Sterilbank für zwei Tage in die Petrischale zum Trocknen gegeben. Aus einem Feuchtgewicht von 10 g Kollagenfasern konnten hierbei etwa 2,5 g Trockenmasse gewonnen werden.

Alle folgenden Schritte fanden unter der Sterilbank mit sterilen Materialien statt.

Nach Ablauf der Trocknungszeit wurden die Kollagenfasern mit einer sterilen Pinzette in ein 50 ml Röhrchen oder ein 50 ml Fläschchen gegeben und je Gramm Kollagenfasern 10 ml DMEM + 0,5% DMSO zugesetzt.

Für die Negativkontrolle wurde in eine 24-Well Platte pro Well 500 µl DMEM + 0,5% DMSO pipettiert.

Für die Positivkontrolle wurde eine 24-Well Platte mit einem sterilisierten Vekaplan KT-Plättchen je Well besetzt und dann je 500 µl DMEM + 0,5% DMSO zugegeben.

Die Platten und die Röhrchen wurden mit leicht aufgeschraubtem Deckel für 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert.

### **2.3.2 Auslegen der Zellen und Inkubation mit Eluat**

Einen Tag nach Herstellung des Eluats wurden die Zellen (Maus-Fibroblasten vom Typ L929) für die Testreihen auf zwei 24-Well Platten für die Zellzählung und die Proteinbestimmung sowie zwei 96-Well Mikrotiterplatten für den Zellproliferationstest ausgelegt.

Zuerst wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen ein Mal mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde 10 ml Trypsin hinzugegeben und 3 min inkubiert, bis alle Zellen vom Flaschenboden gelöst waren. Die Suspension wurde anschließend zusammen mit 10 ml Medium in ein 50 ml Röhrchen gegeben und bei 1200 rpm 5 min in der Heraeus Multifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Medium gründlich resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Durch

Mittelung der vier Großquadrate konnte die Zellzahl pro ml berechnet werden. Hieraus ergab sich das Mischverhältnis von Suspension zu Medium in je einem 50 ml Rührchen, so dass die 24-Well Platte mit 25.000 Zellen pro Well (1 ml) und die Mikrotiterplatte mit 2000 Zellen pro Well (100 µl) belegt wurde.

Weitere 24 h später, also 48 h nach Eluatansetzung, wurden die Negativ- und die Positivkontrolle von den 24-Well Platten jeweils in ein 50 ml Rührchen pipettiert und gemischt. Aus den angesetzten Eluaten wurde je eine 50%-Verdünnung mit Medium hergestellt, so dass letztendlich 6 Rührchen mit Negativkontrolle, Positivkontrolle, Eluat 1, Eluat 1 50% verdünnt, Eluat 2 und Eluat 2 50% verdünnt bereitstanden.

Vor dem Verteilen des Eluats wurde jeweils das Medium unter Schonung der Zellen abgesaugt.

Für den Zellproliferationstest wurden zwei Mikrotiterplatten nach dem in Tabelle 2 gezeigten Schema mit Eluat inkubiert.

**Tabelle 2: Pipettierschema für den Zellproliferationstest (Ausschnitt aus 96-Well-Platte)**

	M	N	P	E1	E1 50	E2	E2 50	
	M	N	P	E1	E1 50	E2	E2 50	
	M	N	P	E1	E1 50	E2	E2 50	
	M	N	P	E1	E1 50	E2	E2 50	
	M	N	P	E1	E1 50	E2	E2 50	
	M	N	P	E1	E1 50	E2	E2 50	

**M = Medium (ohne Zellen); N = Negativkontrolle; P = Positivkontrolle; E 1 = Eluat 1 (Art je nach Versuchsreihe); E 1 50% = Eluat 1, 50% verdünnt mit Medium; E 2 = Eluat 2 (Art je nach Versuchsreihe); E 2 50% = Eluat 2, 50% verdünnt mit Medium**

Für die Proteinbestimmung und die Zellzählung wurde je eine 24-Well Platte nach dem in Tabelle 3 gezeigten Schema mit Eluat inkubiert.

**Tabelle 3: Pipettierschema für die Proteinbestimmung**

N	P	E 1	E 1 50%	E 2	E 2 50%
N	P	E 1	E 1 50%	E 2	E 2 50%
N	P	E 1	E 1 50%	E 2	E 2 50%

**Legende analog Erläuterung zu Tabelle 2**

In der Versuchsanordnung zur allgemeinen Überprüfung der Biokompatibilität entsprach Eluat 1 dem nicht  $\gamma$ -sterilisierten Eluat und Eluat 2 dem  $\gamma$ -sterilisierten Eluat. Im Langzeitversuch zur Überprüfung der Lagerungsbedingungen entsprach Eluat 1 dem bei 4 °C gelagerten Eluat und Eluat 2 dem bei Raumtemperatur (RT) gelagerten Eluat.

Die so mit Zellen und Eluat belegten Platten wurden für 48 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

### **2.3.3 Proliferationsmessung nach 48 und 72 h**

Zur Beurteilung der Zellproliferation wurde der CellTiter-Glo® verwendet. Er zeigt die Rate der Zellvermehrung an, indem der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen durch eine Luziferasereaktion im Luminometer gemessen wird.

Nach der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte in 10 min auf Raumtemperatur gebracht. Währenddessen wurden die Reagenzien des CellTiter-Glo®-Kit aufgetaut und, soweit nötig, neues Substrat aus 10 ml CellTiter-Glo®-Puffer und dem Substratpulver hergestellt. Mit einer Multipette wurden 100  $\mu$ l Substrat pro well pipettiert.

Die Messung erfolgte im Infinite M200 mit dem Programm i-control. Die Einstellung beinhaltete 2 min Schütteln mit der Amplitude von 1 mm und anschließend 10 min Stabilisierungszeit in einer dunklen Kammer. Nach Ablauf dieser Zeit startete die Messung bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einer Exceltabelle mit grafischer Auswertung sowie Normierung in Bezug auf die Negativkontrolle.

Auf die gleiche Art und Weise wurde ein weiterer CellTiter-Glo-Test nach 72 h durchgeführt.

### **2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Proteinbestimmung wurde der BioRad-Protein-Assay verwendet. Er basiert auf der Bradford-Methode und dient dem Nachweis von gelöstem Protein in den Zellen. Durch die Bindung des Farbstoffes „Coomassie Blue“ an die gelösten Proteine

ändert sich das Absorptionsspektrum der Probe. Dies wird mit einer Referenzlösung bekannter Proteinkonzentrationen verglichen. Dies ermöglicht einen Rückschluss auf den Proteingehalt in der Probe und somit die Anzahl an vitalen Zellen.

Für den BioRad-Protein-Assay war zuerst eine Lyse der Zellen nötig, die nach 48 h Inkubation durchgeführt wurde. Unter der Sterilbank wurde von den Zellen das Medium abgenommen und die Zellen drei Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Die mit 500 µl Trypsin/EDTA pro well abgelösten Zellen wurden in je ein Eppendorfgefäß gefüllt, mit 500 µl PBS versetzt und 5 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde des Zellpellet in 200 µl Cell Lysis Buffer resuspendiert. Danach folgte eine 10-minütige Inkubationszeit auf Eis und weitere 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 0-4 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellpellets in Eppendorfgefäßen auf Eis gelagert.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Referenzlösungen für die Proteinbestimmung**

Konzentration	Protein	H <sub>2</sub> O
1000 µg/ml	350 µl (aus Stammlsg.)	150 µl
800 µg/ml	80 µl (aus 1000 µg/ml)	20 µl
600 µg/ml	60 µl (aus 1000 µg/ml)	40 µl
400 µg/ml	40 µl (aus 1000 µg/ml)	60 µl
200 µg/ml	20 µl (aus 1000 µg/ml)	80 µl
100 µg/ml	10 µl (aus 1000 µg/ml)	90 µl
50 µg/ml	50 µl (aus 100 µg/ml)	50 µl

Für den BioRad-Protein-Assay mussten nun zuerst die Verdünnungen für die Standardkurve nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema in Eppendorfgefäße pipettiert werden.



**Tabelle 5: Pipettierschema für die Proteinbestimmung**

	1000	1000	1	1	9	9	17	17		
	800	800	2	2	10	10	18	18		
	600	600	3	3	11	11				
	400	400	4	4	12	12				
	200	200	5	5	13	13				
	100	100	6	6	14	14				
	50	50	7	7	15	15				
	Blanc	Blanc	8	8	16	16				

**1-3 Negativkontrolle, 4-6 Positivkontrolle, 7-9 Eluat 1, 10-12 Eluat 1 50%, 13-15 Eluat 2, 16-18 Eluat 2 50%, Referenzlösungen siehe Tabelle 5**

Des Weiteren wurden aus je 20 µl der Reagenz A und je 1 ml Reagenz S des oben genannten Sets das Reagenz A' hergestellt. Je 5 µl der Standards, des Blancs (H<sub>2</sub>O) und der 18 Proben wurden in Doppelbestimmung auf die Mikrotiterplatte (TPP) pipettiert (siehe Tabelle 5).

Pro well wurden 25 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B mit dem Combitip zugegeben. Nach 15 min wurde die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Verteilung von Eluat 1 und Eluat 2 entsprach der Proliferationsmessung.

### **2.3.5 Zellzählung und Zellmorphologie**

Durch die Zellzählung konnte eine Aussage über die quantitative Proliferation gemacht werden, ergänzt durch die Begutachtung der Zellmorphologie, die eine qualitative Bewertung darstellte.

Für die Zellzählung wurden die Zellen nach Absaugen des Überstandes einmal vorsichtig mit 500 µl PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin/EDTA abgelöst. Die Suspension wurde nach mikroskopischer Kontrolle auf Ablösung aller Zellen in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Pro well der Platte wurde ein Eppendorfgefäß verwendet, in welches zur Neutralisierung des Trypsins 500 µl DMEM-Vollmedium zugegeben wurde. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 µl Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 15 µl in eine Neubauerzählkammer gegeben und vier Großquadrate pro Probe unter dem Mikroskop ausgezählt und gemittelt.

Für die Zellmorphologie wurden die Zellen jeweils in ihrem well unter dem Mikroskop betrachtet und auf Adhäsion, Form und Größe geachtet.

### **2.3.6 Langzeitversuch zum Vergleich der Lagerungsbedingungen**

Um den Einfluss einer längerfristigen Lagerung auf die Kollagenfasern und deren Biokompatibilität zu überprüfen, wurde ein Langzeitversuch unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Zum Zeitpunkt Null wurde eine ausreichende Menge Kollagenfasern nach oben genanntem Schema isoliert, sterilisiert und auf 16 Röhrchen verteilt. Nach erfolgter  $\gamma$ -Sterilisation aller verwendeten Fasern startete die Inkubationszeit. Die Hälfte der Fasern wurde bei Raumtemperatur, die andere Hälfte bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

Nach einer, sechs, zwölf und 24 Wochen wurde jeweils eine komplette Messung, bestehend aus Proliferationsmessung nach 24 h und 72 h, Proteinbestimmung, Zellzählung und Zellmorphologie nach oben genannten Schemata, für beide Lagerungstechniken durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in einer Exceltabelle als Zeitverlauf dargestellt.

### **2.3.7 Auswertung der Testergebnisse**

Zur Auswertung wurde von allen Ergebnissen ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. Alle Werte wurden normiert, indem sie durch den Mittelwert der Negativkontrolle geteilt wurden, der dann 100% oder 1,000 entsprach. So wurden die Werte aller Testläufe und aller Einzeltests vergleichbar und kombinierbar. Zur weiteren Auswertung wurde das Programm Statistica von StatSoft® verwendet. Alle Ergebnisse wurden auf Normalverteilung überprüft und durch eine Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanz getestet. Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha = 5\%$  festgelegt. Als signifikant gelten Werte mit  $0,01 < p \leq 0,05$ , als hoch signifikant Werte mit  $p \leq 0,01$ .

### **2.3.8 Sterilität der gelagerten Kollagenfasern**

Zur Untersuchung der Kollagenfasern auf Pilzkolonien und aerobe Bakterien diente der Bioburden test. Dies ermöglichte eine Überprüfung des Sterilisations- und Lagerungsverfahrens. Für diesen Test wurden Kollagenfasern verwendet, die nicht  $\gamma$ -sterilisiert, jedoch nach verschiedenen Verfahren mit Ethanol und PBS sterilisiert worden waren (siehe Tabelle 6). Anhand des Testergebnisses ließ sich das wirksamste Sterilisationsvorgehen ermitteln.

Zur Vorbereitung wurden Filterhalter mit angefeuchteten 0,45 µm dicken Membranfiltern bestückt und autoklaviert.

Die Kollagenfasern wurden aus einem 50 ml Röhrchen unter der Sterilbank entnommen und in eine sterile Glasflasche gegeben. Zu den Kollagenfasern wurde 10 ml LB-Medium gegeben und die Mixtur auf einem Schüttler 10 min bei Raumtemperatur eluiert. Vom Eluat wurden mit einer Spritze mit steriler Kanüle 5 ml abgenommen und durch einen Filterhalter mit Filterpapier gedrückt. Das Filterpapier wurde aus dem Halter entnommen und auf eine TSA-Platte gelegt. Die verbliebenen 5 ml wurden auf gleiche Art und Weise entnommen, durch einen Filter gedrückt und dieser auf eine Sabouraud-Agar-Platte mit Gentamycin und Chloramphenicol gegeben.

Die Kollagenfasern wurden drei weitere Male mit je 10 ml LB-Medium eluiert und anschließend je 5 ml durch einen Filter gedrückt, wobei der erste auf eine TSA-Platte und der zweite auf eine Sabouraud-Agar-Platte gegeben wurde. Der Prüfkörper, in Form der Kollagenfasern, wurde auf eine weitere TSA-Platte gelegt und gemeinsam mit den vier mit Filtern belegten TSA-Platten zwei bis fünf Tage bei 37°C inkubiert. Die vier Sabouraud-Agar-Platten wurden drei bis sieben Tage bei 20-25°C (RT) inkubiert.

Die Sabouraud-Agar-Platten dienten dem Nachweis von Pilzkolonien, während die TSA-Platten für den Nachweis von aeroben Bakterien bestimmt waren.

Nach der Inkubationszeit wurden die Platten auf vorhandene Vegetationen bzw. Kolonien überprüft, diese bei Vorhandensein gezählt, beschrieben und tabellarisch dokumentiert.

**Tabelle 6: Übersicht über die angewandten Sterilisationsmethoden**

Testnummer	Art der Sterilisation der KF
1-6	Inkubation 10 min in 70% Ethanol, anschließend ein Mal Waschen mit PBS in Röhrchen
7-9	Inkubation 10 min in 70% Ethanol, ein Mal Waschen mit PBS, in großflächigen Schalen
10-12	Inkubation 10 min in 70% Ethanol, anschließend Waschen mit sterilem NaCl, zwei Mal Waschen mit PBS

## **2.4 Studiendesign**

Im Rahmen unserer Studie wurde an 40 Mini-Pigs eine Ersatzplastik des vorderen Kreuzbandes durchgeführt. Das Implantat wurde aus Kollagenfasern, gewonnen aus Rattenschwänzen, im eigenen Labor hergestellt und vor Verwendung  $\gamma$ -sterilisiert. Die Fasern wurden vor und nach  $\gamma$ -Sterilisation, sowie vor Verwendung mit verschiedenen Testmethoden auf ihre Biokompatibilität untersucht. Die Implantate wurden biomechanisch getestet und daraus ableitend die Herstellung verbessert, so dass ihre biomechanischen Eigenschaften letztendlich denen eines natürlichen Kreuzbandes gleichen sollten. Die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung sind in der Dissertation von Bischofberger nachzulesen [54]. Rekonstruiert wurde das Kreuzband orientierend am anatomischen Verlauf mit je einem tibialen und femoralen Bohrkanal und jeweiliger extrakortikaler Fixierung mittels EndoButton und Surgical Loop. Die Standzeiten betragen je zur Hälfte sechs Wochen und sechs Monate (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7: Übersicht über die Standzeiten der Studientiere**

Standzeiten	Anzahl Studientiere „Biomechanik“	Anzahl Studientiere „Histologie“	Summe
6 Wochen	8	8	16
6 Monate	8	8	16
Testtiere (6 Wochen)	4	4	8
Summe	20	20	40

Bei acht Testtieren erfolgte ein MRT nach einer Woche und nach Ablauf der Standzeit. Die restlichen Tiere wurden nach sechs Wochen und bei Standzeit sechs Monate ein weiteres Mal kurz vor dem Exitus per MRT untersucht. Nach der Tötung der Tiere wurde das operierte Knie entnommen und makroskopisch bezüglich Arthrosezeichen, Entzündung, Veränderungen der Synovia und Einwachsen des Implantates untersucht. Nach Freipräparation des Implantates mit den jeweiligen Knochenansatzstücken wurde die Hälfte der Implantate biomechanischen Tests zugeführt, während die andere Hälfte histologisch aufgearbeitet wurde. Für die Histologie wurden sowohl Schnitte mit als auch Schnitte ohne Knochenansatz mit Standardfärbungen verwendet, sowie eine Faktor VIII-Spezialfärbung zum Nachweis einer Vaskularisierung und eine Kollagen I-Spezialfärbung zur Darstellung von Remodelingvorgängen. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung sind detailliert in der Dissertation von Monique Uhlig dargelegt [55].

## **2.5 Der Tierversuch**

Die Genehmigung für den Tierversuch wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit erteilt. Die Tierversuchsnummer lautet: 55.2-2531.01-86/09.

Das Kreuzbandkonstrukt wurde in 40 Minipig Tiermodelle implantiert. Acht Tiere dienten als Testtiere, um die OP-Methode und Konstruktvariante zu optimieren. Die Implantate und nativen Kreuzbänder von 16 Tieren wurden post mortem für biomechanische Tests verwendet, 16 für die histologische Aufarbeitung. Die Standzeiten betragen sechs Wochen und sechs Monate bei je acht Tieren (siehe auch Tabelle 7). Die Implantation erfolgte in den rechten Hinterlauf, während der linke Hinterlauf als Kontrolle verwendet wurde. Durchgeführt wurden die Operationen im ZEMM, Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin, unter Bedingungen, die

denen humaner Operationen weitgehend glichen. Auf sorgfältige Hygiene und steriles Arbeiten wurde besonderer Wert gelegt. Die Narkose erfolgte durch eine Tierärztin unter Verwendung von Azaperon 4 mg/kg, Ketamin 15 mg/kg, Atropin 0,044 mg/kg, Thiopental 5,5-6 mg/kg und Isofluran 1,5-4% MAC. Bei Bedarf wurde Fentanyl 0,005 mg/kg als Bolus gegeben. Zudem wurde während der Operation Ringer-Lactat 5 ml/kg/h zur Flüssigkeitssubstitution infundiert.

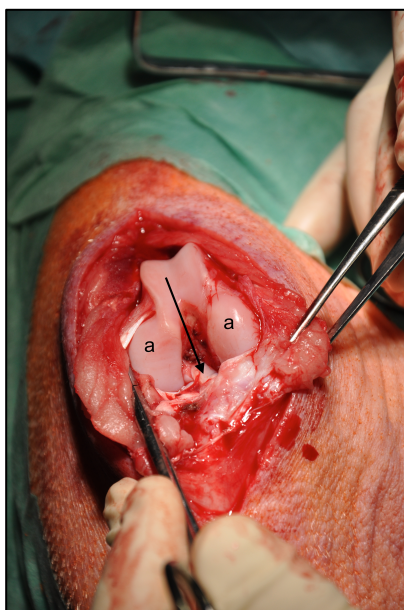
Nach der Operation erhielten die Tiere eine antibiotische Prophylaxe mit Penicillin über drei Tage. Zur analgetischen Nachbehandlung wurde den Tieren Buprenorphin 0,005-0,01 mg/kg bis zu sieben Tage und Metacam 0,4 mg/kg mindestens drei Tage postoperativ verabreicht.

Die Tiere wurden zur Gewöhnung bereits einige Tage vor der Operation vom Züchter ins ZEMM gebracht und aus Gründen der artgerechten Haltung immer mindestens zu zweit gehalten. Nach der Operation wurden die Tiere mehrere Tage intensiv mit mehrmals täglichen Vitalzeichen- und Wundkontrollen im ZEMM überwacht. Nach 5-10 Tagen wurden die Tiere zurück in den Großtierstall gebracht.

### **2.5.1 Operatives Vorgehen**

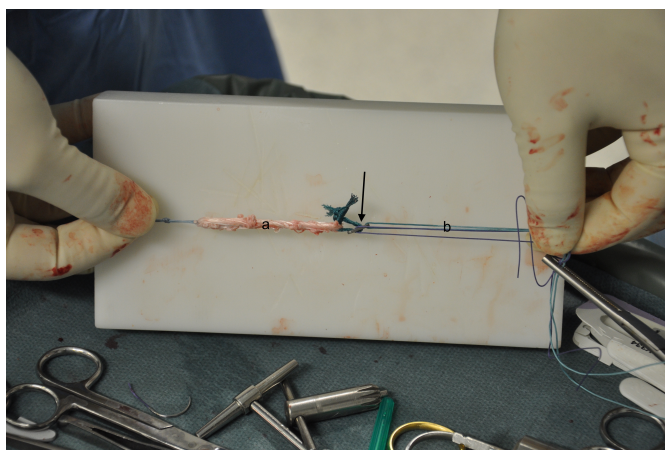
Der etwa 10 cm lange Hautschnitt erfolgte medial der Patella von proximal nach distal. Schicht für Schicht wurde die Kniegelenkkapsel unter Blutstillung eröffnet, bis sich die Patella nach lateral luxieren ließ. Es folgte die Darstellung und Resektion des Hoffa-Fettkörpers, um bessere Sicht zu gewährleisten. Weiteres Gewebe wurde entfernt, bis das vordere Kreuzband deutlich sichtbar und abgrenzbar wurde. Dieses wurde an beiden Ansatzpunkten knochennah mit dem Skalpell abgetrennt. Übrige Faserreste wurden mit dem scharfem Löffel entfernt, so dass der tibiale und femorale Ansatzpunkt dargestellt werden konnten (siehe Abbildung 5).

Tibial wurde von distal etwa 4 cm unterhalb des Tibiaplateaus mit dem Kirschnerdraht gebohrt mit dem Zielpunkt des ursprünglichen Ansatzes. Femoral erfolgte die Bohrung ebenfalls von distal, also intraartikulär, mit dem Kirschnerdraht, wobei der Ansatzpunkt des ursprünglichen Kreuzbandes als Orientierung diente.



**Abbildung 5:** Intraoperativer Blick auf die eröffnete Kniegelenkshöhle eines Minipig. a bezeichnet die Femurkondylen, der Pfeil markiert den Verlauf des vorderen Kreuzbandes (aus Bischofberger 2013, mit freundlicher Erlaubnis).

Beide Bohrlöcher wurden mit dem 4 mm-Bohrer überbohrt und mit dem Längenmessgerät ausgemessen. Femoral ergaben sich Bohrkanallängen zwischen 16 und 28 mm, wobei meist Längen zwischen 18 und 22 mm erreicht wurden. Tibial lagen die Bohrkanallängen zwischen 20 und 28 mm. Der Winkel zur tibialen und femoralen Längsachse betrug jeweils etwa 20 Grad.



**Abbildung 6:** Konstrukt vor Implantation in das Minipig. An einem Ende des Konstruktes (a) ist bereits der Surgical Loop (b) und der Suture Button (Pfeil von oben) befestigt (rechts im Bild).

Ein Suture Button wurde mit dem Surgical Loop dreifach an das Konstrukt geknotet und die Länge so bemessen, dass sich mindestens ein Zentimeter Konstrukt im Bohrkanal befand (siehe Abbildung 6).

Mit Hilfe des Kirschnerdrahtes und eines Ethibondfadens, der durch den Surgical Loop geschlungen wurde, ließ sich das Konstrukt von distal in den femoralen Bohrkanal einziehen, bis der Suture Button außerhalb des femoralen Bohrkanals umklappte und sich dem Knochen anlegte. Dies wurde durch leichten Zug am Konstrukt überprüft. In den tibialen Bohrkanal wurde das Konstrukt mit dem Surgical Loop ebenfalls mit Hilfe eines Kirschnerdrahtes eingezogen und der Surgical Loop außerhalb des Knochenkanals dreifach an den Suture Button geknotet. Um die physiologischen Verhältnisse nachzuahmen, geschah dies in 20-30 Grad Beugung im Kniegelenk.

Nach Überprüfung der Stabilität und Beweglichkeit im Kniegelenk wurde die Patella in ihre ursprüngliche physiologische Lage reponiert und das Kniegelenk einer weiteren Kontrolle unterzogen, um Post-OP-Luxationen zu vermeiden.

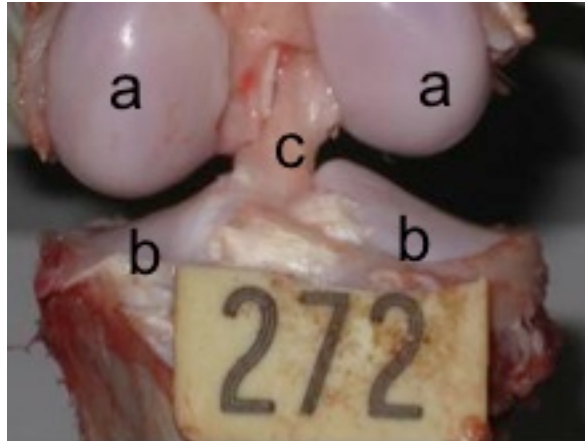
Die Gelenkkapsel und das Subkutangewebe wurden Schicht für Schicht genäht, bevor der Hautschnitt sorgfältig mit dem Hauttacker verschlossen und mit Sprühpflaster versiegelt wurde.

### **2.5.2 Postmortale Entnahme und Präparation des Kreuzbandes**

Am letzten Tag des Versuchszeitraums eines jeden Tieres wurden beide Kniegelenke untersucht. Anschließend wurden die narkotisierten Tiere mit T61 eingeschläfert. Im Anschluss wurden beide Hinterläufe mit Hilfe einer Knochensäge amputiert und die Kniegelenke mit einem Abstand von etwa 10 cm nach distal und proximal herausgetrennt. Es wurden jeweils sowohl die operierte Seite als auch die Kontrollseite nach demselben Verfahren präpariert. Nach grober Entfernung der Muskulatur und der Haut folgte der Transport des Kniegelenks ins Labor. Dort wurden vorsichtig die Gelenkkapsel und der Gelenkspalt freipräpariert und abgelöst. Hierbei wurde auf Entzündungszeichen wie Rötung und Schwellung geachtet. Außerdem wurden die Menisken und die Knorpelflächen auf degenerative Schäden hin untersucht.

Die Patella wurde durch einen Horizontalschnitt durch die Patellarsehne entfernt. Auch die Kollateralbänder wurden durchtrennt und entfernt. Anschließend wurden vorsichtig Menisken, Kapsel und hinteres Kreuzband abgetrennt, bis Femur und Tibia nur noch durch das vordere Kreuzband bzw. das Implantat verbunden waren (siehe Abbildung 7).





**Abbildung 7:** Freipräpariertes Konstrukt.  
Es ist das Implantat (c) zwischen den Femurkondylen (a) und dem Tibiaplateau (b) zu sehen.

Für die biomechanischen Tests wurde das Kniegelenk in diesem Zustand weiterverwendet. Für die histologischen Untersuchungen wurde der freie Anteil der Kreuzbänder bzw. der Implantate herausgetrennt und auf Korkscheiben aufgespannt. Die Ansätze verblieben in ihren jeweiligen Knochenkanälen und wurden so weiterverarbeitet.

## 2.6 Histologie

### 2.6.1 Fixierung, Einbettung und Färbung der Proben

Die histologische Untersuchung der operierten Kniegelenke wurde im Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskelettale Regeneration der medizinischen Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Zur Fixierung wurden die Knochen sowie die aufgespannten Kreuzbänder und Implantate in eine 4% Paraformaldehydlösung eingelegt.

Um die Paraffineinbettung vorzubereiten, wurden die Kreuzbänder und Implantate im Anschluss nach dem Entwässerungsprotokoll (siehe Anhang) entwässert.

Anschließend wurden die Proben von den Korkscheiben entfernt und das tibiale und femorale Ende des Implantates und der Knochenstücke mit Hilfe von verschiedenen farbigen Fäden gekennzeichnet.

Nun folgte die Paraffineinbettung unter Verwendung eines Paraffintanks und einer entsprechenden Kühlplatte. Aus den gefertigten Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte hergestellt, welche auf silanisierte Adhäsionsobjektträger aufgezogen wurden.

Die fixierten und für 20-30 min entwässerten Knochen wurden auf die exakte Bohrkanallage untersucht und in das Makro-Trennschleifsystem eingespannt. Die Ausrichtung der Sägeebene erfolgte parallel zur Bohrkanallage. Je zwei bis drei 3-4 mm dicke Knochenscheiben wurden abgetragen, mit der Schnittfläche nach unten in ein Fixiergitter eingebracht und mit Tiername, Datum und Schnittebene beschriftet. Die laterale Knochenscheibe wurde für die Kunststoffeinfbettung, die mediale für die Paraffineinfbettung verwendet.

Hierfür wurden die medialen Knochenscheiben für sieben Wochen zur Entkalkung in EDTA eingelegt, welches 14-tägig gewechselt wurde, und bei 37 °C im Wärmeschrank aufbewahrt. Danach folgte eine Entwässerung im Entwässerungsautomaten nach Protokoll (siehe Anhang).

Die Paraffineinfbettung erfolgte nach dem gleichen Schema wie oben für die Kreuzbänder beschrieben.

Die lateralen Knochenscheiben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe Anhang) und anschließend in eine Kunststofflösung aus Technovit eingebettet. Dafür erfolgte erst eine Präinfiltation bei RT mit Hilfe von 200 ml entstabilisierter Technovit 9100 Basislösung und 1 g „Härter 1“. Für die Infiltration wurden die Knochenscheiben zwei Mal für jeweils sieben Tage bei 4 °C in 250 ml Infiltrationslösung eingelegt.

Für die Einbettung wurden die Knochenscheiben mit der Schnittfläche nach unten in Formen mit Polymerisationsgemisch eingelegt, welche luftdicht verschlossen bei 0-6 °C bis zur Aushärtung gekühlt wurden.

Die Kunststoffblöcke wurden parallel zur Schnittfläche in das Hartschliffmikrotom eingespannt. Es wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf beschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Nach Abdeckung mit Kisolfolie und Filterpapier wurden die Schnitte in einer Schnittpresse bei 36 °C für zwei Tage im Wärmeschrank getrocknet.

Im Anschluss folgten HE-, Masson Goldner- und Movat Pentachrom-Färbungen. Zusätzlich wurden einige Präparate mit einer immunhistochemischen Faktor VIII-Färbung angefertigt. Diese wurde zur besseren Darstellung der Zellkerne mit einer Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer kombiniert. Die Faktor VIII-Färbung ermöglicht eine Darstellung der frühen Vaskularisierung in Geweben durch Markierung von Endothelzellen.

Zur Darstellung des Bandmodellings wurde außerdem eine Kollagen I-Färbung mit polyklonalen Antikörpern Schwein und polyklonalen Antikörpern Ratte durchgeführt. Zur Kontrolle wurden sowohl vom nativen Implantat als auch vom nativen vorderen Kreuzband ebenfalls Schnitte und Färbungen angefertigt und beurteilt.

Die Färbeprotokolle befinden sich im Anhang.

## **2.6.2 Deskriptive histologische Auswertung**

### **2.6.2.1 Durchlichtmikroskopie**

Die gefärbten Präparate wurden an einem Mikroskop mit 1,6-, 2,5-, 5-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung beurteilt und mit einer Axio Cam am Mikroskop fotografiert.

Die HE-Färbung diente der Übersicht und Vergleichbarkeit. Die Masson Goldner Trichrom-Färbung wurde zur Beurteilung der Zelldifferenzierung und der Umbauvorgänge an Implantat und Knochen im Sinne von Zelleinwanderung, Nekrosen und Infiltrationen herangezogen. Die Movat Pentachrom-Färbung diente besonders der Darstellung der Bandinsertion, der Knorpelzellen und der Mineralisationsfronten.

In der Faktor VIII-Färbung konnte die Vaskularisierung durch Darstellung der Endothelzellen beurteilt werden. Die Vaskularisierung wurde hier auch quantitativ durch Zählung der Gefäßquerschnitte ausgewertet. Die Kollagen I-Färbung wurde auf das Vorkommen von Kollagen I des Schweins und der Ratte zur Beurteilung von Remodelingvorgängen ausgewertet.

### **2.6.2.2 Zählung der Gefäßquerschnitte**

Für die quantitative Auswertung der Vaskularisierung wurden mit dem Mikroskop und der Kamera Mosaikaufnahmen aller Präparate in 20er-Vergrößerung gemacht. Für die Aufnahmen galt, dass sie möglichst zentral, ohne viel Hintergrund und in einer festgelegten Größe sein sollten. Mit Hilfe eines Computerprogrammes wurden Gesichtsfelder, sogenannte ROIs (region of interest) definiert. Diese Gesichtsfelder wurden gleichmäßig so oft wie möglich auf jede Aufnahme gelegt, so dass etwa 15-25 ROIs pro Aufnahme entstanden. Anschließend wurden die Gefäßanschnitte je ROI gezählt, wobei Mehrfachanschnitte und Gefäße, die in mehreren ROIs lagen nur einfach gezählt wurden.

### 2.6.2.3 Beurteilung der Bandinsertion

Zur verbesserten Beurteilung und Vergleichbarkeit der Bandinsertion wurde ein von Unterhauser et. al im Jahr 2006 entwickelter Score verwendet. Der Score erlaubt eine Einteilung der Bandinsertion anhand des histologischen Bildes, wobei die Zelltypen und deren Anordnung im Präparat berücksichtigt werden (siehe Tabelle 8) [56]. Der 4-Zonenaufbau einer direkten Bandinsertion besteht aus Band (Zone 1), Faserknorpel (Zone 2), Kalkknorpel (Zone 3) und Knochen (Zone 4). Im Gegensatz dazu ist bei der indirekten Bandinsertion eine bindegewebige Schicht bzw. Sharpey'sche Fasern zwischen Band und Knochen anzufinden.

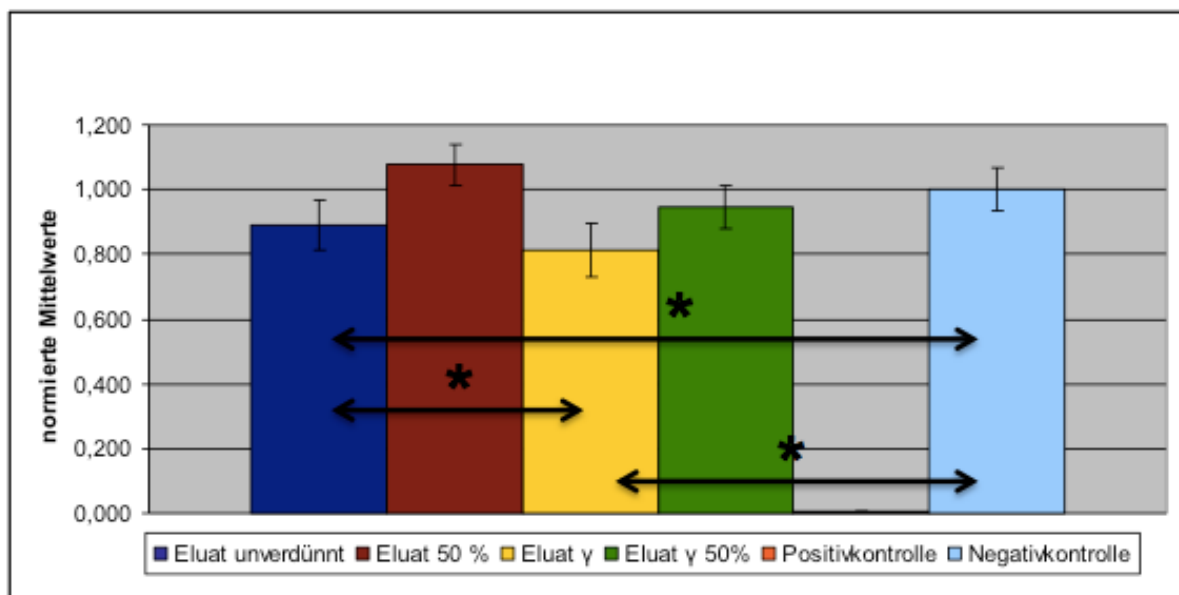
**Tabelle 8:** Score zur Beurteilung der Bandinsertion

Klassifikation	Beschreibung
0	Keine Anzeichen einer direkten Bandinsertion
1	Frühe direkte Bandinsertion, unverkalkte chondroide Zellen
2	Frühe direkte Bandinsertion, verkalkte chondroide Zellen
3	Reifende direkte Bandinsertion mit teilweise 4-Zonenaufbau aus Band, Faserknorpel, Kalkknorpel und Knochen
4	Reife direkte Bandinsertion mit 4-Zonenaufbau

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Proliferationsmessung

In der Proliferationsmessung nach 48 h (siehe Abbildung 8) wurde vom unverdünnten nicht  $\gamma$ -sterilisierten Eluat eine Extinktion von  $0,890 \pm 0,080$  im Vergleich zur Negativkontrolle erreicht. Dies bedeutete einen etwas höheren Wert als das  $\gamma$ -sterilisierte unverdünnte Eluat mit  $0,813 \pm 0,082$ , der Unterschied war signifikant mit  $p = 0,016$ . Auch die Verdünnungen zeigten mit  $1,076 \pm 0,062$  für das nicht sterilisierte Eluat und  $0,946 \pm 0,069$  für das  $\gamma$ -sterilisierte Eluat einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ). Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten sie geringere Abweichungen als die unverdünnten Proben. Die Positivkontrolle erreichte einen Wert von  $0,007 \pm 0,001$ . Die Unterschiede zwischen den Eluaten und der Positivkontrolle waren jeweils hoch signifikant, wie auch die Differenzen zur Negativkontrolle ( $p < 0,001$ ).

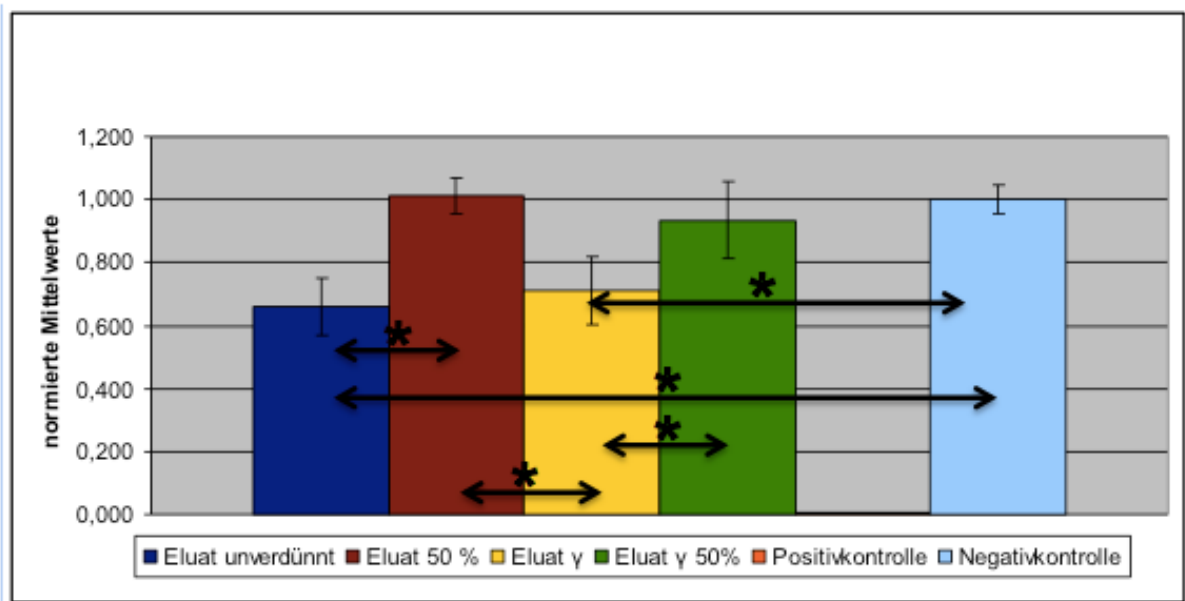


**Abbildung 8: Ergebnisse der Proliferationsmessung nach 48 h.**

Sowohl das sterilisierte als auch das nicht sterilisierte Eluat zeigten signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle, graphisch ist der deutliche hochsignifikante Unterschied zur Positivkontrolle zu sehen. Das  $\gamma$ -sterilisierte Eluat zeigte signifikant niedrigere Werte als das nicht sterilisierte Eluat. Signifikanz ist durch einen Pfeil mit Stern \* gekennzeichnet (ohne Positivkontrolle).

Die Proliferationsmessung nach 72 h zeigte analoge Ergebnisse, jedoch mit insgesamt niedrigeren Werten als nach 48 h (siehe Abbildung 9). Die unverdünnten

Proben erreichten einen Wert von  $0,660 \pm 0,092$  für das nicht sterilisierte und  $0,709 \pm 0,108$  für das  $\gamma$ -sterilisierte Eluat ( $p = 0,664$ ). Auch die Verdünnungen unterschieden sich mit  $1,011 \pm 0,056$  für das nicht sterilisierte Eluat und  $0,935 \pm 0,121$  für das  $\gamma$ -sterilisierte Eluat nicht signifikant ( $p = 0,241$ ). Im Vergleich hierzu zeigte die Positivkontrolle eine Extinktion von  $0,006 \pm 0,000$ . Die Unterschiede zu Positiv- und Negativkontrolle waren jeweils hoch signifikant für die unverdünnten Proben ( $p < 0,001$ ).



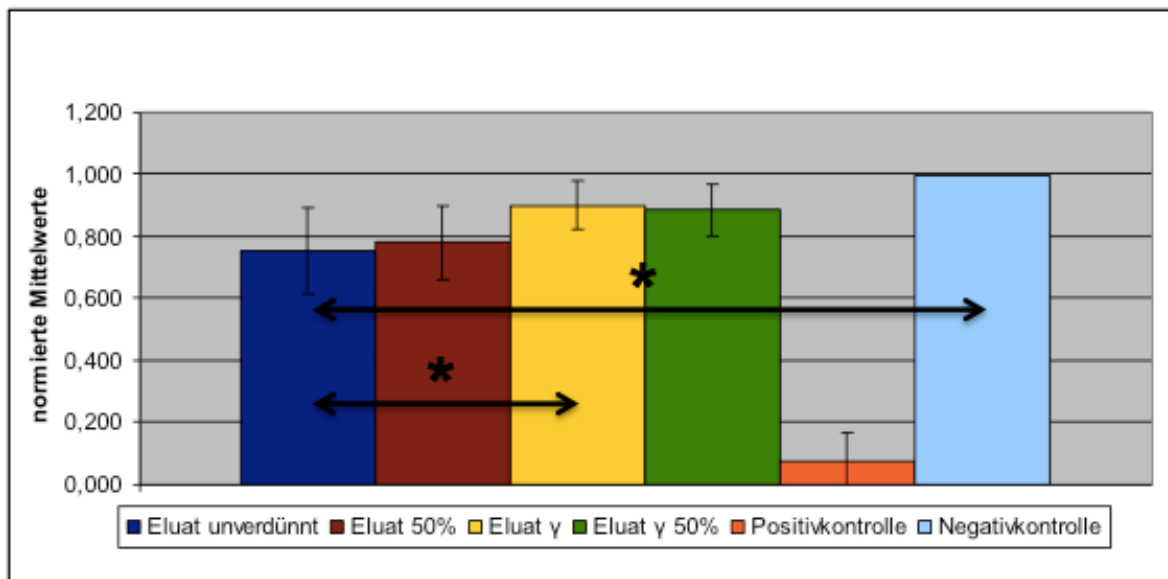
**Abbildung 9: Ergebnisse der Proliferationsmessung nach 72 h.**

Auch nach 72 h waren signifikante Unterschiede zwischen den beiden Eluaten in unverdünnter Form und der Negativkontrolle, sowie auch der Positivkontrolle zu sehen. Im Vergleich der beiden Eluate konnte weder in den unverdünnten noch in den verdünnten Proben ein signifikanter Unterschied gesehen werden. Signifikanz ist durch einen Pfeil mit Stern \* gekennzeichnet (ohne Positivkontrolle).

### 3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

In der Proteinbestimmung zeigten sich folgende Ergebnisse: Die Proteinproduktion in den Zellen wurde durch die nicht sterilisierten Fasern signifikant stärker reduziert mit Werten von  $0,752 \pm 0,138$  als durch  $\gamma$ -sterilisierte Fasern mit Werten von  $0,901 \pm 0,078$  ( $p = 0,03$ , siehe Abbildung 10). Dieses Verhältnis spiegelte sich auch bei den Verdünnungen wieder mit  $0,781 \pm 0,118$  für das nicht sterilisierte Eluat und  $0,887 \pm 0,084$  für das  $\gamma$ -sterilisierte Eluat, wobei der Unterschied hier nicht signifikant war ( $p = 0,083$ ). Die Positivkontrolle erzielte einen Wert von  $0,076 \pm 0,092$ . Die Unterschiede zur Positivkontrolle waren jeweils hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Im

Vergleich zur Negativkontrolle waren nur die Werte des nicht sterilisierten Eluats hoch signifikant niedriger ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 10: Ergebnisse der Proteinbestimmung.**

Das unverdünnte nicht sterilisierte Eluat reduzierte die Proteinproduktion signifikant stärker als das sterilisierte Eluat sowie die Negativkontrolle. Die Verdünnungen unterschieden sich jeweils nicht signifikant. Signifikanz ist durch einen Pfeil mit Stern \* gekennzeichnet (ohne Positivkontrolle).

### 3.3 Zellzählung und Zellmorphologie

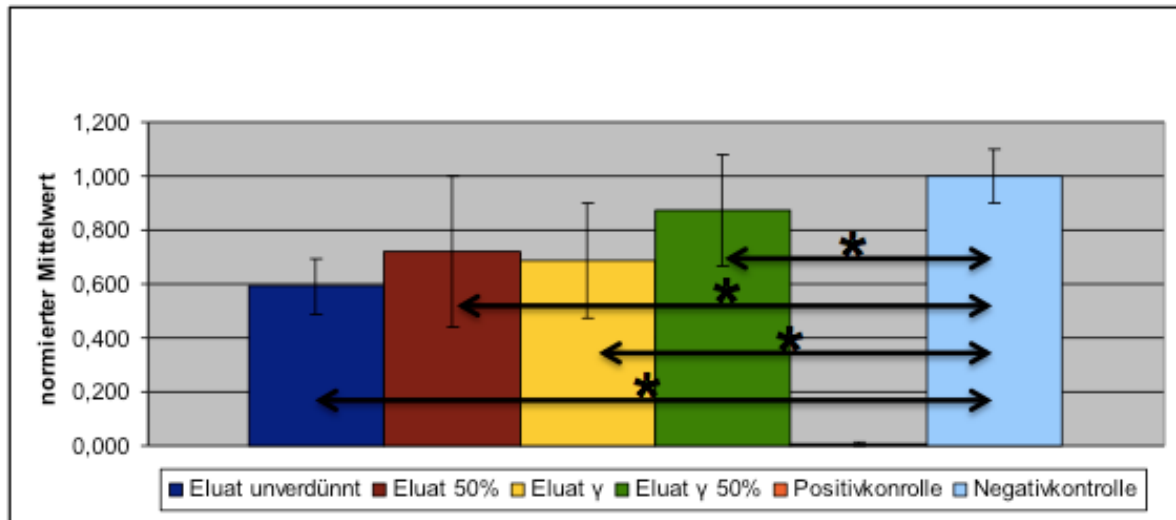
In der Zellzählung zeigte sich bei den unverdünnten Proben ein geringer, nicht signifikanter Vorteil für die  $\gamma$ -sterilisierten Proben mit Werten von  $0,684 \pm 0,213$  gegenüber  $0,591 \pm 0,104$  für die nicht sterilisierten Proben ( $p = 0,843$ , siehe Abbildung 11).

Auch bei den Verdünnungen waren die Werte für das  $\gamma$ -sterilisierte Eluat mit  $0,872 \pm 0,205$  nicht signifikant höher als die Werte des nicht sterilisierten Eluats mit  $0,721 \pm 0,278$  ( $p = 0,464$ ).

Im Vergleich dazu erzielte die Positivkontrolle einen Wert von  $0,009 \pm 0,006$ . Die Unterschiede zur Positiv- und zur Negativkontrolle waren jeweils hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

In der Zellmorphologie fanden sich folgende Ergebnisse: Die Zellen der Negativkontrolle zeigten eine gute Konfluenz und waren neben einigen runden Zellen überwiegend fibroblastär. In der Positivkontrolle dagegen gab es kaum adhärente Zellen, die wenigen vorhandenen Zellen waren rund. In den nicht sterilisierten

Proben waren die Zellen nicht konfluent, jedoch überwiegend fibroblastär mit wenigen runden Zellen. In den  $\gamma$ -sterilisierten Proben zeigten die Zellen Konfluenz und waren ebenfalls überwiegend fibroblastär mit einigen wenigen runden Zellen.



**Abbildung 11: Ergebnisse der Zellzählung.**

Alle Eluate unterschieden sich signifikant von der Negativkontrolle, wobei sowohl bei dem verdünnten als auch beim dem unverdünnten Eluat höhere Werte für die  $\gamma$ -sterilisierte Variante zu sehen sind, bei jedoch nicht signifikantem Unterschied. Signifikanz ist durch einen Pfeil mit Stern \* gekennzeichnet (außer Positivkontrolle).

### 3.4 Langzeitversuch zum Vergleich der Lagerungsbedingungen

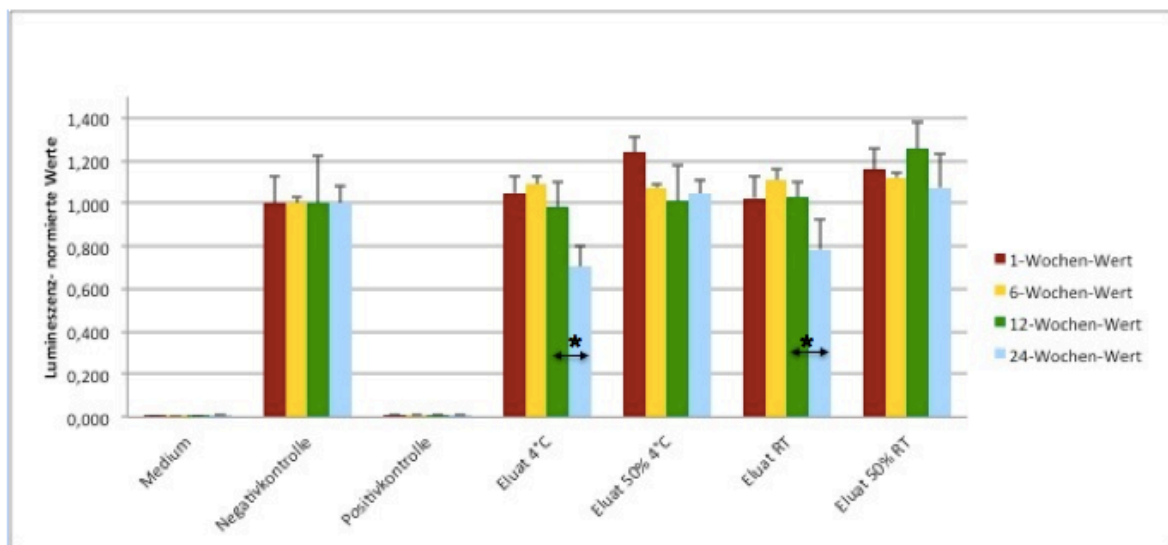
Da für die klinische Anwendbarkeit des Implantats die Möglichkeit und Art der Lagerung eine entscheidende Rolle spielt, wurden in dieser Versuchsreihe die Lagerungsbedingungen bei 4°C und bei Raumtemperatur (RT) über insgesamt 24 Wochen verglichen. Es erfolgten Tests nach 1, 6, 12 und 24 Wochen.

Die Lagerung bei 4°C unterschied sich im Proliferationstest nach 48 h zu den einzelnen Zeitpunkten nicht signifikant von der Lagerung bei RT (1 Woche  $p = 1,000$ , 6 Wochen  $p = 1,000$ , 12 Wochen  $p = 0,405$ , 24 Wochen  $p = 0,999$ , siehe Abbildung 12). Auch die Unterschiede zur Negativkontrolle waren an den einzelnen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Zellproliferation nahm der Lagerungszeit deutlich ab mit Werten zwischen  $1,050 \pm 0,076$  nach einer Woche und  $0,702 \pm 0,097$  nach 24 Wochen für das bei 4°C gelagerte Eluat. Bis zur 12. Woche war der Abfall nicht signifikant. Signifikant war bei der 4°C-Lagerung der Unterschied nach 24 Wochen zu 6 Wochen ( $p = 0,038$ ).



Das Eluat bei RT hatte einen ähnlichen Verlauf mit Werten zwischen  $1,026 \pm 0,100$  nach einer Woche und  $0,787 \pm 0,136$  nach 24 Wochen (siehe Abbildung 12). Auch hier war bis zur 12. Woche kein signifikanter Abfall zu sehen. Signifikant war hier der Abfall von 12 Wochen zu 24 Wochen ( $p = 0,004$ ).

Als Referenzwert erreichte die Positivkontrolle konstante Werte zwischen  $0,008 \pm 0,001$  nach einer Woche und  $0,009 \pm 0,001$  nach sechs Wochen. Die Differenz zur Positivkontrolle war für beide Lageroptionen hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 12: Ergebnisse der Zellproliferation nach 48 h im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.**

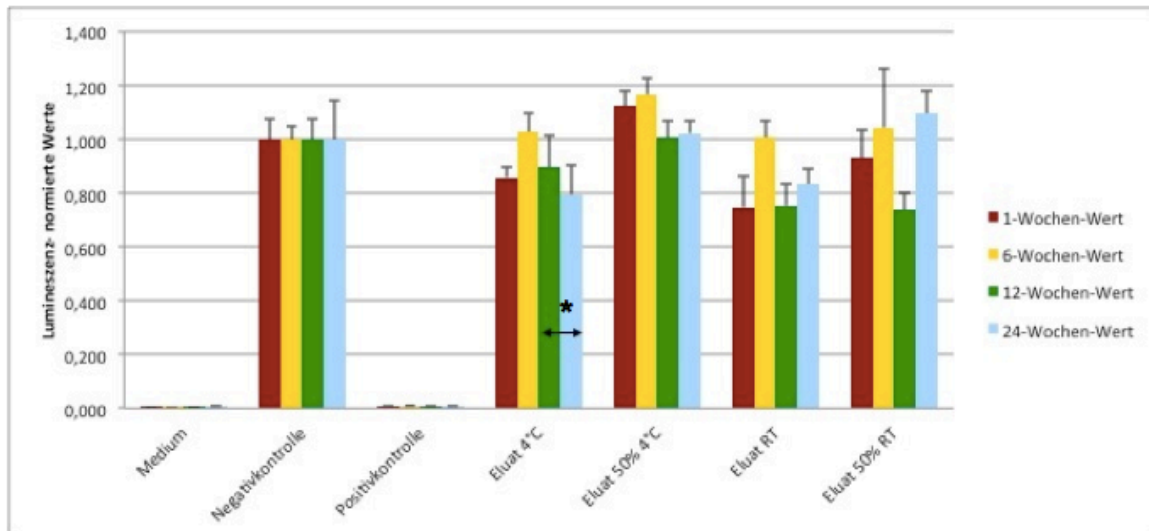
Für alle Eluate ist eine Abnahmetendenz über 24 Wochen zu sehen, wobei über die Gesamtzeit gemittelt kein signifikanter Unterschied von Negativkontrolle zu den beiden Lagerungsbedingungen zu sehen war. Im Text erwähnte signifikante Unterschiede sind mit einem Pfeil mit Stern \* gekennzeichnet.

Auch im Proliferationstest nach 72 h waren die Unterschiede zwischen den Lagerungsbedingungen zu den einzelnen Zeitpunkten nicht signifikant mit Werten zwischen  $0,859 \pm 0,040$  nach einer Woche und  $0,796 \pm 0,109$  nach 24 Wochen für das  $4^\circ\text{C}$  Eluat und leicht verminderte Werte zwischen  $0,748 \pm 0,112$  nach einer Woche und  $0,833 \pm 0,058$  nach 24 Wochen für das RT Eluat (siehe Abbildung 13).

Im Zeitverlauf war der Abfall bis zur 12. Woche nicht signifikant. Bei der  $4^\circ\text{C}$ -Lagerung war der Unterschied des 24-Wochen-Wertes zu dem 6-Wochen-Wert signifikant ( $p = 0,038$ ).

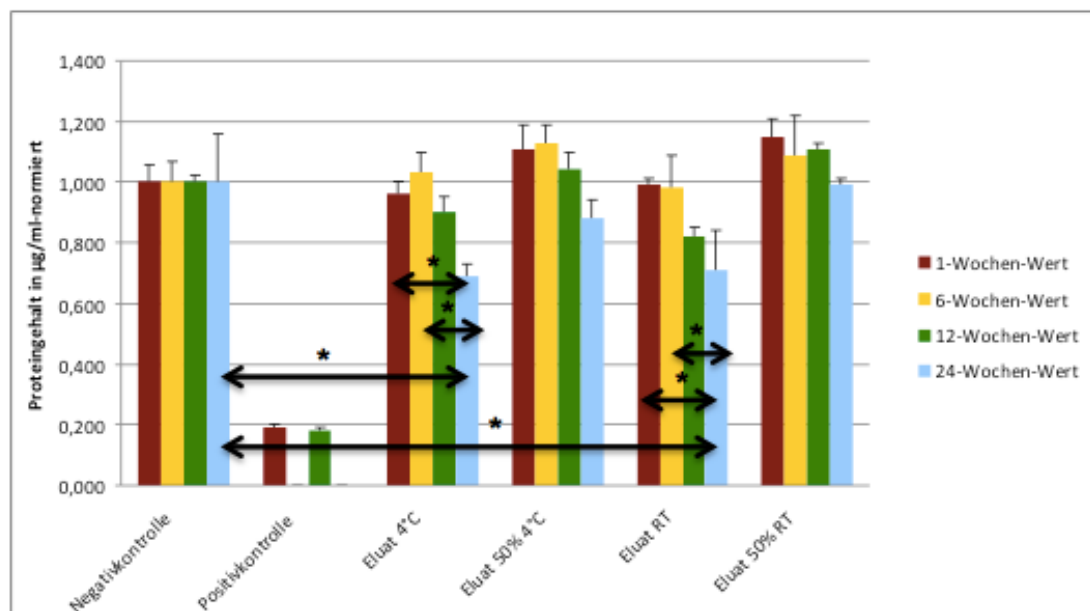
Als Referenzwert zeigte die Positivkontrolle Werte zwischen  $0,007 \pm 0,001$  nach einer Woche und  $0,009 \pm 0,001$  nach 24 Wochen. Die Differenzen zur

Positivkontrolle waren jeweils hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Zwischen den Lagerungsbedingungen und der Negativkontrolle war zu den einzelnen Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied zu sehen (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Ergebnisse der Zellproliferation nach 72 h im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.**

Bei stark schwankenden Werten ist auch hier eine Abnahme der Werte über die Zeit zu sehen. Der Unterschied zwischen den Lagerungen war nicht signifikant. Der Unterschied zur Negativkontrolle war bei 4°C signifikant, bei RT hochsignifikant. Im Text erwähnte signifikante Unterschiede sind mit einem Pfeil mit Stern \* gekennzeichnet.



**Abbildung 14: Ergebnisse der Proteinbestimmung im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.**

Es ist eine Abnahme der Werte über 24 Wochen zu sehen, wobei der Unterschied zur Negativkontrolle über die Gesamtzeit nur für das bei RT gelagerte Eluat signifikant war. Das bei 4°C gelagerte Eluat unterschied sich nicht signifikant. Im Text erwähnte signifikante Unterschiede sind mit einem Pfeil mit Stern \* gekennzeichnet.

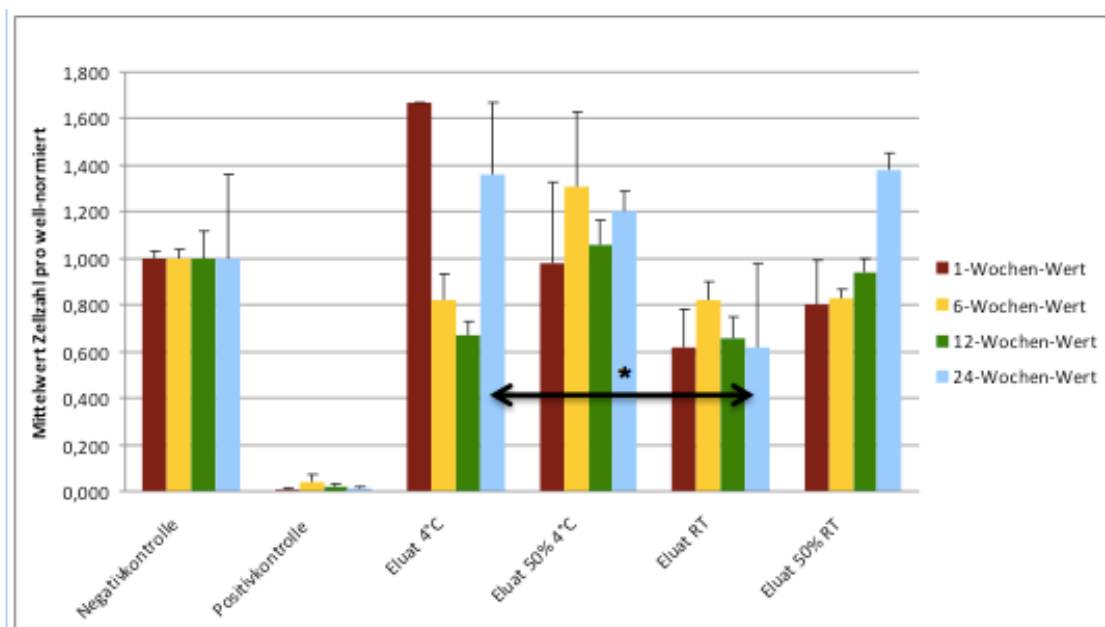
In der Proteinbestimmung zeigte das bei 4 °C gelagerte Eluat eine Verminderung der Proteinproduktion über die Zeit mit Werten zwischen  $0,960 \pm 0,040$  nach einer Woche und  $0,690 \pm 0,040$  nach 24 Wochen.

Das bei RT gelagerte Eluat zeigte einen ähnlichen Verlauf mit Werten zwischen  $0,990 \pm 0,020$  nach einer Woche und  $0,710 \pm 0,130$  nach 24 Wochen.

Bis zur 12. Woche war der Abfall der Werte jeweils nicht signifikant. Der 24 Wochen-Wert fiel sowohl für die 4°C Lagerung als auch für die RT-Lagerung gegenüber dem 1-Wochen-Wert (4°C  $p = 0,0179$ , RT  $p = 0,010$ ) und dem 6-Wochen-Wert (4°C  $p = 0,001$ , RT  $p = 0,015$ ) jeweils signifikant ab. Hier waren die Unterschiede der Lagerungen nach 24 Wochen zur Negativkontrolle signifikant. (4°C  $p = 0,004$  und RT  $p = 0,007$ ). Zu den anderen Zeitpunkten bestand jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den Lagerungsbedingungen und der Negativkontrolle.

Im Vergleich dazu erreichte die Positivkontrolle Werte zwischen  $0,190 \pm 0,010$  nach einer und  $0,000 \pm 0,000$  nach 24 Wochen. Die Differenzen zur Positivkontrolle waren jeweils hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 14).

In der Zellzählung variierten die Werte sehr stark. Das Eluat 4 °C erreichte hier fluktuierende Werte zwischen  $1,670 \pm 0,000$  nach einer Woche und  $0,670 \pm 0,060$  nach zwölf Wochen.



**Abbildung 15: Ergebnisse der Zellzählung im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.**

Es zeigten sich stark schwankende Werte. Die Lagerung bei 4°C unterschied sich über die Gesamtzeit gemittelt nicht signifikant von der Negativkontrolle. Bei der Lagerung bei RT war über die Gesamtzeit ein signifikanter Unterschied sowohl zu der Lagerung bei 4°C als auch zur Negativkontrolle zu sehen. Signifikante Unterschiede sind mit einem Pfeil mit Stern gekennzeichnet.

Im Vergleich dazu lag das RT Eluat konstant signifikant niedriger mit Werten zwischen  $0,620 \pm 0,160$  nach einer Woche und  $0,820 \pm 0,080$  nach sechs Wochen (siehe Abbildung 15).

Für die Einzelzeitpunkte bestand nur bei 24 Wochen ein signifikant höherer Abfall der Werte für das bei RT gelagerte Eluat gegenüber dem bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagerten ( $p = 0,011$ ). Im Vergleich zeigte die Positivkontrolle Werte zwischen  $0,004 \pm 0,010$  nach einer Woche und  $0,040 \pm 0,030$  nach sechs Wochen, was hoch signifikant niedriger war als jeweils die Eluate ( $p < 0,001$ ).

Wie aus der Abbildung 16 zu ersehen sind die Werte nur eingeschränkt verwertbar.

### **3.5 Sterilität der gelagerten Kollagenfasern**

Zur Bestimmung der Sterilität der eingesetzten Proben erfolgte der BioBurden-Test (siehe Tabelle 9 und Tabelle 6: Übersicht über die angewandten Sterilisationsmethoden).

**Tabelle 9: Ergebnisse der Sterilitätstestungen**

Testnummer	Sabouraud-Agar-Platte	TSA-Platte
1	Negativ	Negativ
2	Negativ	Negativ
3	Negativ	Negativ
4	Rosa Pilzkulturen	1 kleine Kolonie im 1. und 2. Durchgang und Prüfkörper
5	Negativ	Viele Kolonien im 1., 3. und 4. Durchgang und Prüfkörper
6	Negativ	Negativ
7	Negativ	Ca. 30 Kolonien im 1., 2., 3. Durchgang
8	Negativ	Kleine Kolonien im 1., 2., 3. und 4. Durchgang und Prüfkörper
9	Negativ	Kolonien in allen Durchgängen und Prüfkörper
10	Negativ	Negativ
11	Negativ	Negativ
12	Negativ	Negativ

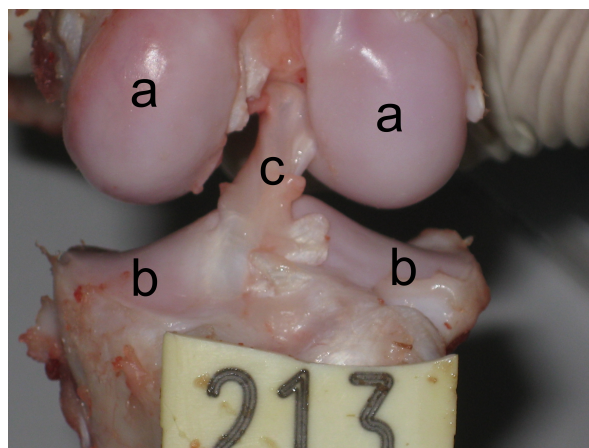
Siehe auch Tabelle 6: Übersicht über die angewandten Sterilisationsmethoden

Nach dem ersten Sterilisationsverfahren mit Inkubation 10 min in 70% Ethanol und anschließend einmal Waschen mit PBS in Röhrchen (Test 1-6) waren noch mehrmals Bakterienkolonien und einmal Pilzkulturen nachweisbar. Auch die erste Modifikation des Sterilisationsverfahrens mit Inkubation 10 min in 70% Ethanol sowie ein Mal Waschen mit PBS in großflächigen Schalen statt in Röhrchen (Test 7-9) konnte eine Kolonialisierung mit Bakterien und Pilzen noch nicht vollständig vermeiden.

Erst durch die Weiterentwicklung des Sterilisationsverfahrens, die Kollagenfasern zwischen der Ethanolinkubation und dem Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung ein weiteres Mal mit sterilem NaCl zu waschen (Testnummern 10-12), wurde die gewünschte Sterilität erreicht, so dass anschließend keine Bakterien oder Pilze in der Kultur nachweisbar waren

### **3.6 Anwendung des Implantats im Tierversuch**

Direkt nach der OP war reizbedingt bei allen Tieren eine Schwellung und Rötung des Kniegelenks um die Operationswunde zu verzeichnen, die jedoch regelmäßig ab dem zehnten postoperativen Tag abklang. Etwa über die gleiche Zeit zeigten die Tiere eine Schonhaltung und ein hinkendes Gangbild, welches ebenfalls ab Tag zehn postoperativ bis zur vollständigen Genesung rückläufig war. Ab der sechsten postoperativen Woche belasteten alle Tiere voll. Die Wundheilung gestaltete sich bis auf eine Ausnahme komplikationslos. Bei dem ersten operierten Tier trat lagebedingt eine leichte Entzündung im Bereich der Naht auf, die nach einigen Tagen abheilte.



**Abbildung 16:** Implantat 6 Monate post OP. Nach Entfernung der Kapsel und Bandstrukturen ist das Implantat (c) zwischen Femurkondylen (a) und Tibiaplateau (b) zu sehen. Minipig 213

Langfristig traten bei keinem der Tiere äußerliche Entzündungszeichen wie Rötung und Schwellung oder Symptome einer Abstoßungsreaktion auf.

Bei der Präparation der Kniegelenke war stets eine von Synovia überzogene Bandstruktur mit sichtbaren Faserzügen im anatomischen Verlauf des ACL erkennbar, die jedoch häufig schwer von dem umliegenden Gewebe abgrenzbar war (siehe Abbildung 16).

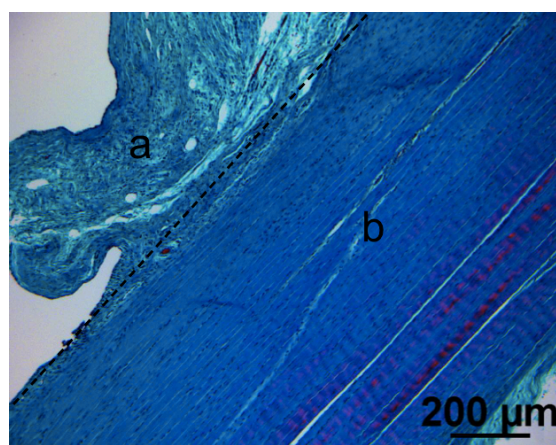
In der Area intercondylaris waren neu gebildete Weichteilstrukturen ohne biomechanische Stabilität zu erkennen. Starke Gefäßinjektion, Eiter oder Flüssigkeitsansammlungen im Sinne einer Abstoßung oder Entzündung waren makroskopisch nicht zu sehen. In der 6-Wochengruppe war keine Destruktion der Knorpel oder Menisken zu beobachten. In der 6-Monatsgruppe zeigten sich vereinzelt Knorpeldefekte im Bereich der Femurkondylen.

### **3.7 Histologische Aufarbeitung**

Eine detaillierte Ausführung über die histologische Aufarbeitung ist in der Dissertation von Monique Uhlig zu finden [55].

#### **3.7.1 Ergebnisse der 6-Wochengruppe**

Das Implantat war in allen Präparaten deutlich erkennbar. Zeichen einer Entzündungsreaktion waren in keinem der Präparate nachweisbar. Auf Abbildung 17 ist ein Ausschnitt eines Implantats mit anhängendem Bindegewebe zu sehen.

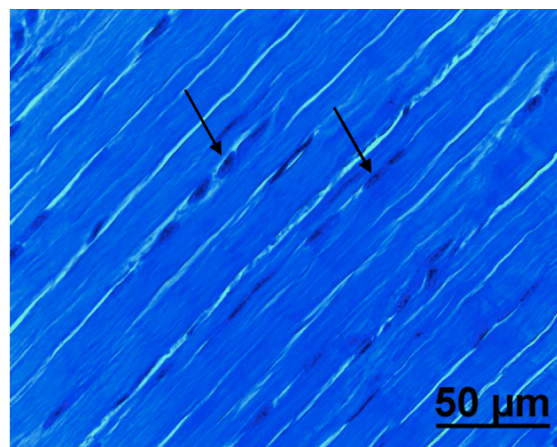


**Abbildung 17:** Masson-Goldner-Färbung einer Übersichtsaufnahme eines Implantats (b) 6 Wochen post OP. Links im Bild anhängendes Bindegewebe und synoviale Deckschicht (a). Minipig 210, Masson-Goldner x2,5.



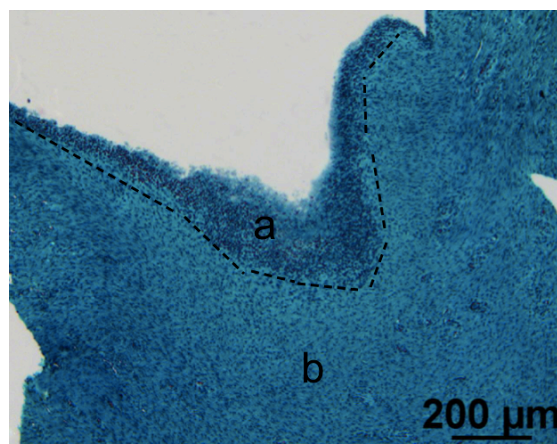
Vorherrschende Zellgruppe im hypozellulären zentralen Bereich waren längliche, ovale Fibrozyten, die gleichmäßig der Länge nach ausgerichtet waren und einen spindelförmigen Zellkern aufwiesen (siehe Abbildung 18). Nach peripher nahm die Zellzahl insgesamt und die Zahl der Fibroblasten zu, die Zellkerne zeigten vermehrt eine runde Form.

Umgeben wurde das Implantat von lockerem Bindegewebe mit zahlreichen Blutgefäßen, welches nach peripher an eine 2-8-lagige Zellschicht, einer synovialen Deckschicht entsprechend, angrenzte. In einem Präparat war die Deckschicht besonders ausgeprägt mit bis zu 20 Schichten (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 18:** Masson-Goldner-Färbung einer Detailaufnahme eines Implantats 6 Wochen post OP. Zu sehen sind ovoid bis spindelförmige Fibrozyten (Pfeile). Minipig 210 Masson-Goldner x40.

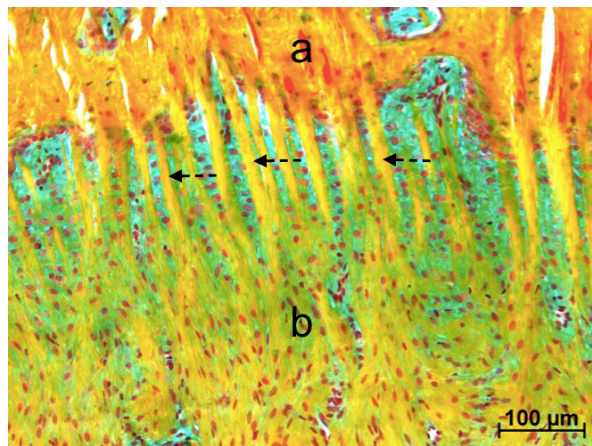
Im femoralen Bohrkanal fand sich neu gebildeter Geflechtknochen mit deutlichen Osteoidsäumen und Osteoblasten mit runden Zellkernen.



**Abbildung 19:** Masson-Goldner-Färbung eines Implantats (b) mit angrenzender Synovia 6 Wochen post OP. Synoviale Deckschicht (a), teils außergewöhnlich ausgeprägt mit bis zu 20 Lagen. Minipig 286, Masson-Goldner x5.

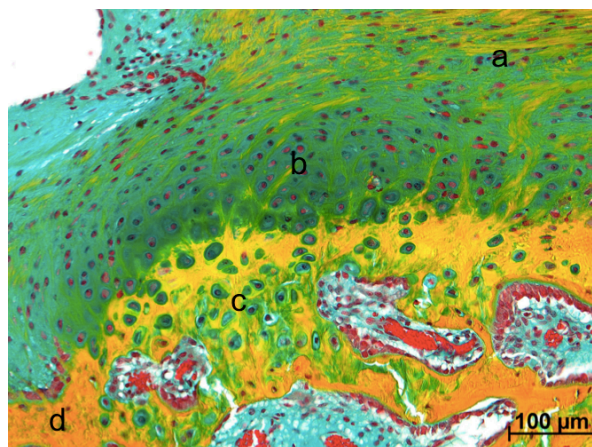
Angrenzend lag eine bindegewebige Zwischenschicht (fibrous interzone, FIZ), die ausgehend vom Geflechtknochen von Sharpey'schen Fasern durchzogen wurde. Diese reichten bis zu den Kollagenfasern in Tunnelmitte, welche längs, parallel zur Zugrichtung, ausgerichtet waren.

An der Gelenkoberfläche konnten in allen Präparaten chondroide Zellen gesehen werden.



**Abbildung 20:** Movat-Pentachrom-Färbung der Übergangszone Knochen zu Implantat 6 Wochen post OP. Sharpey'sche Fasern (Pfeile) ziehen aus dem Geflechtknochen (a) in das Konstrukt (b). Minipig 224, Movat-Pentachrom x20.

Eine reife Bandinsertion mit dem 4-Zonenaufbau aus Band, Faserknorpel, Kalkknorpel und Knochen war in keinem der Präparate sichtbar.



**Abbildung 21:** Movat-Pentachrom-Färbung der Bandinsertion 6 Wochen post OP. Teilweise ist ein 4-Zonen-Aufbau erkennbar mit Implantat (a), Faserknorpel (b), Kalkknorpel (c) und Geflechtknochen (d). Score Klasse 3. Minipig 224, Movat-Pentachrom x20.



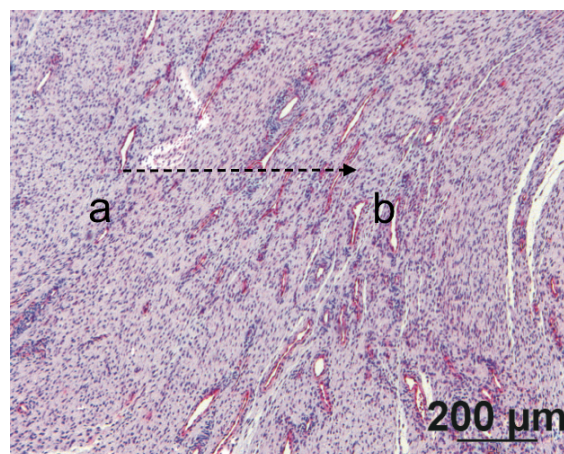
Jedoch konnte in einem Präparat (siehe Abbildung 21) zumindest teilweise der 4-Zonenaufbau nachvollzogen werden, so dass dieses der Klasse 3 nach der Klassifikation von Unterhauser zugeordnet werden konnte (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Klassifikation der Bandinsertion der 6-Wochen- und 6-Monatsgruppe nach dem Score von Unterhauser et. al. [56].

Klasse	0	1	2	3	4
6-Wochengruppe	0	4	2	1	0
6-Monatsgruppe	1	0	2	3	0

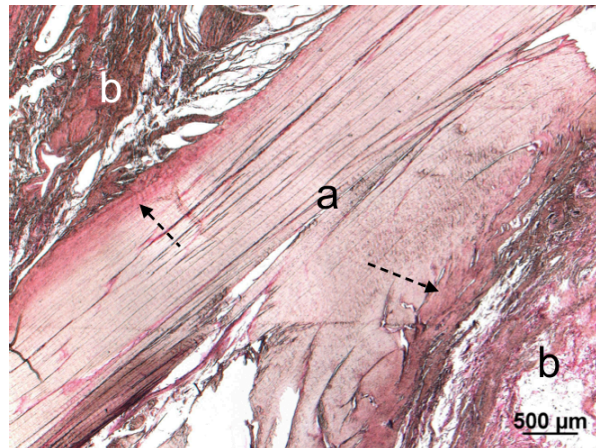
Weitere zwei Präparate entsprachen Klasse 2 mit verkalkten chondroiden Zellen und vier Präparate der Klasse 1 mit unverkalkten chondroiden Zellen (siehe Tabelle 8 und Tabelle 10) [56].

In der Faktor VIII-Färbung war eine ausgeprägte Vaskularisierung erkennbar, die von zentral nach peripher zunahm (siehe Abbildung 22). Zentral waren wenige bis gar keine Gefäße nachweisbar. Quantitativ ließen sich im Mittelwert 6 (0-32) Gefäße pro Gesichtsfeld nachweisen.



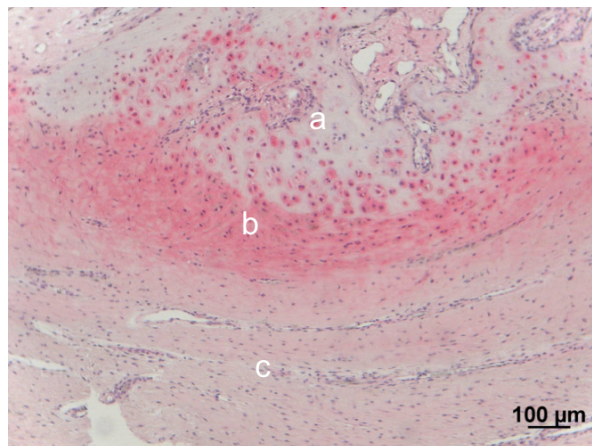
**Abbildung 22:** Faktor-VIII-Gefäßdarstellung eines Implantats 6 Wochen post OP. Gefäßanzahl von links (zentral, a) nach rechts (peripher, b) zunehmend (Pfeilrichtung). Minipig 286, FVIII x5.

Im Kollagen I-Nachweis mit polyklonalen Antikörpern Schwein zeigte sich in etwa der Hälfte der Fälle eine inhomogene Färbung, wobei vor allem peripheres Bindegewebe und Gefäße deutlich angefärbt waren (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Kollagen-I-Nachweis in einem Implantat 6 Wochen post OP. Peripher ist eine deutliche Anfärbung (siehe Pfeile) sichtbar. Zentral (a) besteht noch keine Anfärbung, peripher ist angrenzendes Bindegewebe (b) zu sehen. Minipig 210, Kollagen I Schwein x2,5.

In der anderen Hälfte fand sich keine klare Differenzierung, sondern eine homogene Hintergrundfärbung. Wie in Abbildung 24 zu sehen, waren im Bereich der Bandinsertion vor allem die FIZ und das Knorpelgewebe deutlich angefärbt.



**Abbildung 24:** Kollagen-I-Nachweis mit Detailaufnahme eines Implantats 6 Wochen post OP. Deutlich sichtbare Anfärbung der knorpeligen Zone im Insertionsbereich (b) zwischen Bindegewebe/Knorpel (a) und Implantat (c). Minipig 209, Kollagen I Schwein x10.

Für den Kollagen I-Nachweis mit polyklonalen Antikörpern Ratte waren nur in zwei Präparaten dezente Anfärbungen im zentralen Bereich sichtbar. In den weiteren Präparaten war keine klare Anfärbung sichtbar.

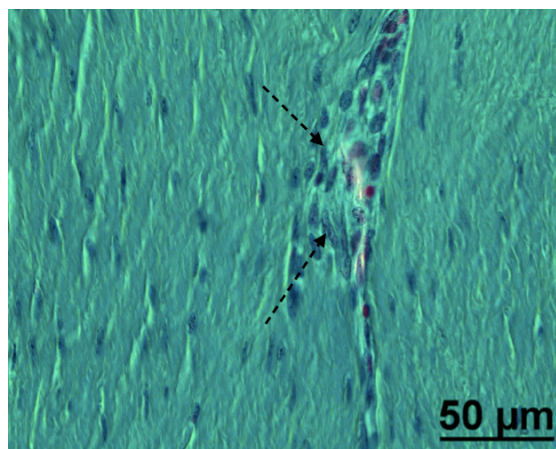
### 3.7.2 Ergebnisse der 6-Monatsgruppe

Im Vergleich zu den 6-Wochen-Präparaten zeigten sich deutliche Veränderungen. Die Implantate waren im Vergleich mit den 6-Wochen-Präparaten hyperzellulär mit

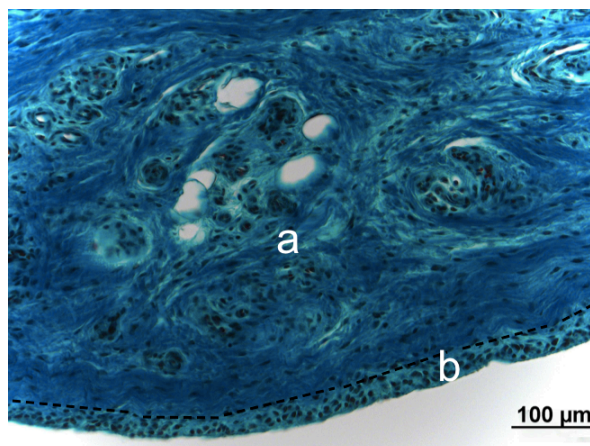
einer gleichmäßigen Zell- und Gefäßverteilung. Sowohl Fibroblasten als auch Fibrozyten waren erkennbar (siehe Abbildung 25).

Auch war ansatzweise eine Septierung der Implantate sichtbar. Nach peripher schloss sich die bereits in der 6-Wochen-Gruppe sichtbare synoviale Deckschicht an, die nun 2-6-lagig war und auf Abbildung 26 sichtbar ist.

An der Gelenkoberfläche war eine Schicht kalzifizierter chondroider Zellen sichtbar, die die Insertionsstelle des Implantates bildeten. In der femoralen Tunnelmitte zeigten sich ausgeprägte Sharpey'sche Fasern, die vom Geflechtknochen zu den Kollagenfasern zogen.



**Abbildung 25:** Masson-Goldner-Färbung einer Detailaufnahme eines Implantats 6 Monate post OP. Fibroblasten und Fibrozyten mit ovoiden Zellkernen (Pfeile) zwischen Kollagenfasern. Minipig 203, Masson-Goldner x40.

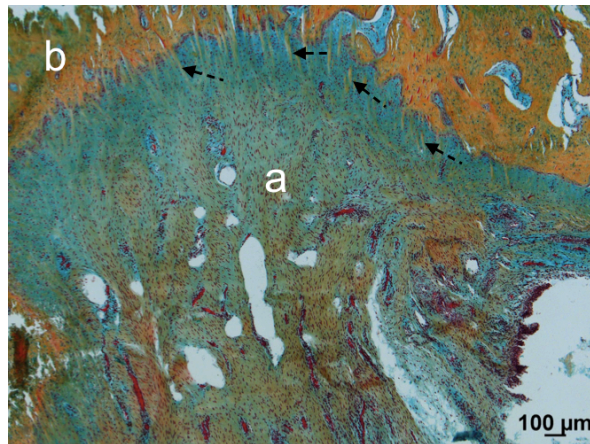


**Abbildung 26:** Masson-Goldner-Färbung eines Implantats mit Synovia 6 Monate post OP. Anhängendes Bindegewebe (a) mit synovialer Deckschicht (b), 2-6-lagig. Minipig 222, Masson-Goldner x10

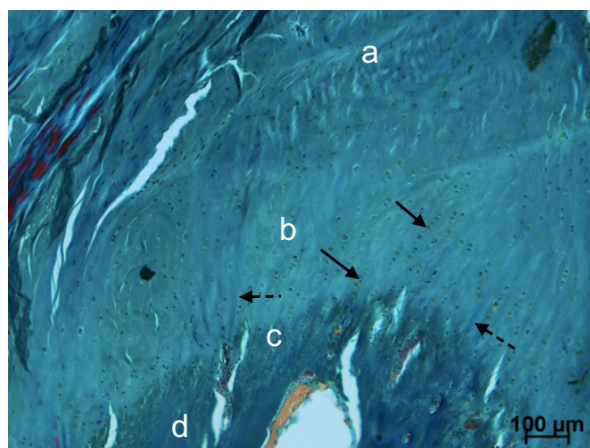
Sie waren in Zugrichtung des Implantates angeordnet. Die in der 6-Wochengruppe deutliche bindegewebige Zwischenschicht fehlte vollständig, so dass der



Geflechtknochen direkt an das Implantat grenzte. Zudem war neu gebildeter Geflechtknochen sichtbar, der den Bohrkanal eingrenzte.

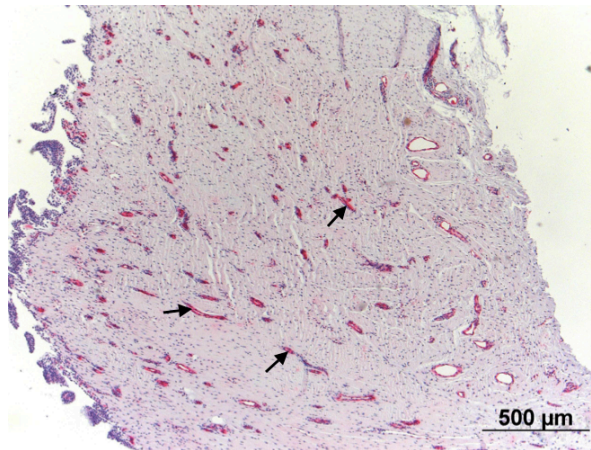


**Abbildung 27:** Movat-Pentachromfärbung der Übergangszone Knochen zu Implantat 6 Monate post OP. Sharpey'sche Fasern (Pfeile) ziehen aus dem Geflechtknochen (b) in das Implantat (a). Minipig 290, Movat-Pentachrom x5

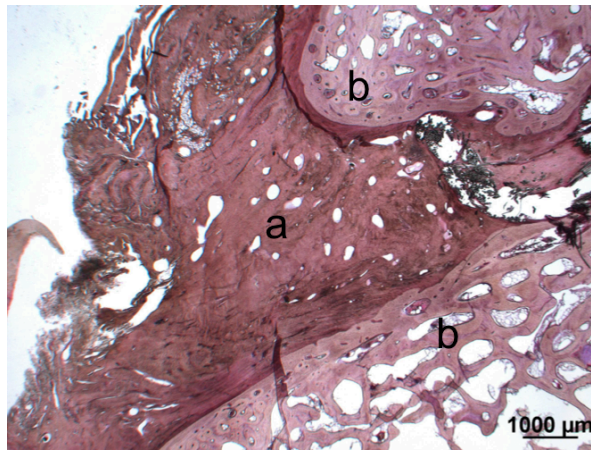


**Abbildung 28:** Masson-Goldner-Färbung eines Implantats mit Sharpey'schen Fasern 6 Monate post OP. Chondroide Zellen (durchgezogene Pfeile) sind säulenförmig angeordnet, dazwischen ziehen Sharpey'sche Fasern (gestrichelte Pfeile) aus dem Geflechtknochen (d) in das Implantat (a). Es ist ein angedeuteter 4-Zonen-Aufbau mit Geflechtknochen (d), Kalkknorpel (c) und Faserknorpel (b) zu sehen. Minipig 212, Masson-Goldner x10.

Die Bandinsertion der Implantate konnte mit einer Ausnahme nach dem Score von Unterhauser et. al. in Klasse 2 oder 3 eingeteilt werden. Zwei Präparate zeigten verkalkte chondroide Zellen, der Klasse 2 entsprechend. Drei Präparate zeigten teilweise einen 4-Zonenaufbau mit Band, Faserknorpel, Kalkknorpel und Knochen, somit Klasse 3 entsprechend (siehe Abbildung 28). Eine reife Bandinsertion war in keinem der Präparate zu sehen (siehe Tabelle 8 und Tabelle 10) [56].



**Abbildung 29:** Faktor-VIII-Gefäßdarstellung eines Implantats 6 Monate post OP. Homogene Verteilung der Gefäße (Pfeile) mit Zunahme nach peripher (links). Minipig 222, FVIII x5

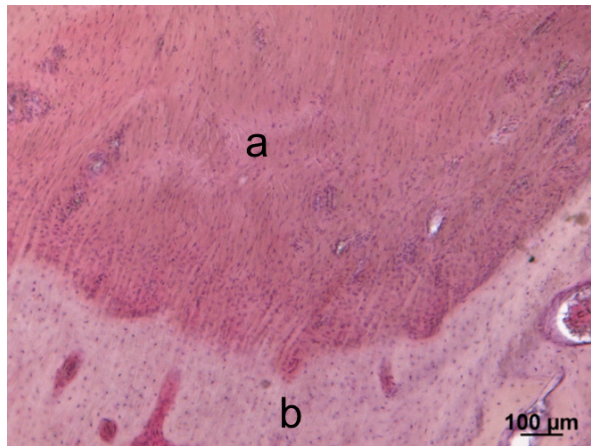


**Abbildung 30:** Kollagen-I-Nachweis im Tunnelausgangsbereich eines Implantats 6 Monate post OP. Deutliche Markierung des Implantats (a) im Tunnelausgangsbereich mit umgebenden Geflechtknochen (b). Minipig 290, Kollagen I Schwein x1.25

Die Faktor VIII Färbung ließ eine homogene Verteilung der Gefäße erkennen, die von zentral nach peripher zunahm (siehe Abbildung 29).

Im Mittel waren 8 (0-35) Gefäße pro Gesichtsfeld nachweisbar. Im Vergleich zur 6-Wochengruppe waren demnach mehr Gefäße nachweisbar, jedoch ohne Signifikanz. In der Kollagen I Färbung mit polyklonalen Antikörpern Schwein ließ sich im Vergleich zur 6-Wochengruppe eine deutliche Färbung in allen Präparaten mit verstärkter Anfärbung der Insertionsbereiche nachweisen (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31).

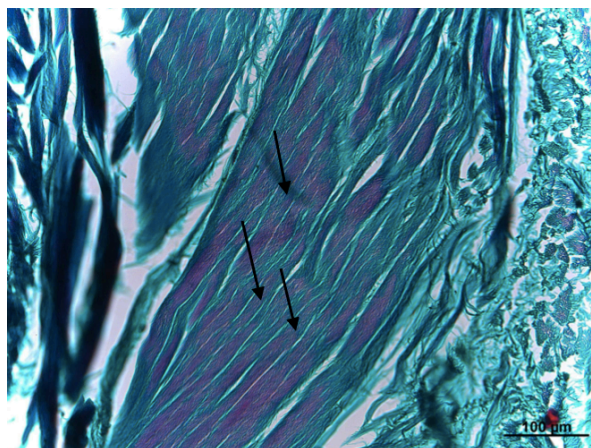
Ein Nachweis von Kollagen I der Ratte war nicht möglich.



**Abbildung 31:** Kollagen-I-Nachweis im Implantat 6 Monate post OP. Deutliche Markierung im Insertionsbereich des Implantates (a) in den Geflechtknochen (b). Minipig 290, Kollagen I Schwein x10

### 3.7.3 Kontrollpräparate

Das ursprüngliche Implantat, das als Kontrolle bzw. zum Vergleich histologisch aufgearbeitet wurde, stellte sich azellulär mit straffen Kollagenfasern dar, die eine geordnete Faserrichtung ohne Bündelung aufwiesen. Es fanden sich weder Gefäße noch eine synoviale Deckschicht (siehe Abbildung 32).



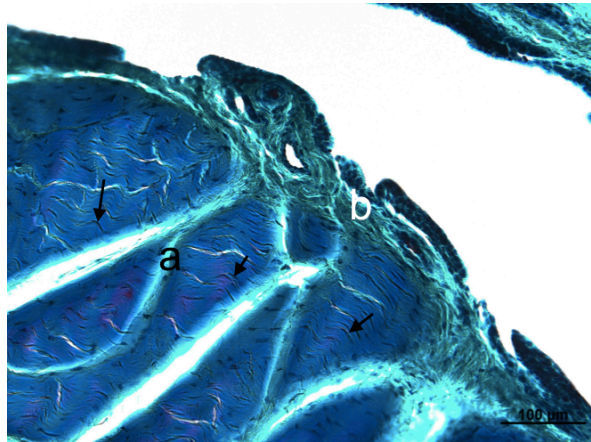
**Abbildung 32:** Masson-Goldner-Färbung eines Implantats nativ. Kollagenfasern im Längsschnitt ohne Zellen und ohne synoviale Deckschicht (Pfeile). Masson-Goldner x20

Der zur Kontrolle durchgeführte Nachweis von Kollagen I mit polyklonalen Antikörpern Ratte zeigte eine deutliche homogene Anfärbung, während mit polyklonalen Antikörpern Schwein keinerlei Anfärbung erfolgte.

Das native vordere Kreuzband eines Minipigs war normozellulär mit reifen Fibrozyten und deutlicher Kollagenbündelung, welche von septalen Gefäßen durchzogen



wurden. Peripher war eine 2-4-lagige synoviale Decksicht sichtbar (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Masson-Goldner-Färbung eines nativen VKB. Fibrozyten (Pfeile) und Kollagenfasern eines vorderen Kreuzbandes (a) mit Septierung und synovialer Deckschicht (b). Minipig 207, Masson-Goldner x20

Die Faktor VIII-Färbung zeigte eine periphere Vaskularisierung, die sich in bindegewebigen Septen nach zentral fortsetzte.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde ein xenoplastisches Implantat für den Ersatz des vorderen Kreuzbandes untersucht. Das Implantat wurde aus Kollagenfasern aus Rattenschwänzen hergestellt und in-vitro sowie in-vivo im Tiermodell hinsichtlich seiner Biokompatibilität und Biomechanik getestet. Zudem wurden einige Implantate für eine histologische Untersuchung aufgearbeitet, um Zelleinwanderung und -wachstum im Bereich des Implantates, ein mögliches Remodeling und die Reaktion zwischen Implantat und Knochen zu untersuchen. Ziel war es, ein dem ACL gleichwertiges Implantat herzustellen, das weder eine Entnahmemorbidität noch eine immunologische Reaktion hervorruft, sondern einem physiologischen Remodeling hin zur nativen Kreuzbandstruktur unterzogen wird.

Beurteilt wurden die Biokompatibilität in in-vitro-Tests sowie das histologische Bild hinsichtlich Remodeling, Vaskularisation und Bandinsertion. Die biomechanischen Eigenschaften wurden in der Dissertation von Bischofberger untersucht [54].

### 4.1 Testmethoden der Biokompatibilität

Die Auswahl der Testmethoden und -materialien hat bei der Überprüfung der Biokompatibilität einen entscheidenden Einfluss auf die Verwertbarkeit der Ergebnisse. Für die Testung der Zytotoxizität diente die DIN-Norm 10993-5 in der vorliegenden Arbeit als Grundlage der Testreihe [57].

Die Wahl der Zelllinie kann Einfluss auf die Testergebnisse haben. Hierfür ist ein detailliertes Wissen über den Implantationsort und die zu erwartenden Zell-Material- und Zell-Zell-Kontakte nötig, da verschiedene Zelltypen ganz unterschiedlich auf Biomaterialien reagieren. Dies kann falsch positive oder auch falsch negative Ergebnisse hervorrufen.

So zeigten Brunner et al. (2006), dass Konzentrationen von  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , die für Pleurazellen stark zytotoxisch sind, auf fibroblastäre Zellen keinerlei Effekt haben [45, 58]. Chang et al. stellten eine unterschiedliche Reaktion von Zellen verschiedener Organe auf Silizium-Nanopartikel fest. Hier hing das Ausmaß der Zytotoxizität von der metabolischen Aktivität der Zellen ab [59].

Aufgrund der zu erwartenden Zell-Material-Kontakte, wurden in dieser Arbeit Mausfibroblasten der Zelllinie L929 verwendet.



Des Weiteren ist bei der in dieser Arbeit verwendeten Extraktionsmethode mit Herstellung eines Eluats darauf zu achten, dass das Medium geeignet ist, alle Komponenten des Materials aufzunehmen. Durch die Verwendung von DMSO ist eine Aufnahme aller hydrophilen Substanzen gewährleistet. Einschränkungen bestehen jedoch aufgrund der geringen Sättigungsrate für hydrophobe Substanzen. Eine Verbesserung der Löslichkeit kann hier durch hohe Temperaturen (bis zu 121 °C) erreicht werden, was jedoch einen unphysiologischen Zustand darstellt und somit ebenfalls das Ergebnis verfälschen kann. Bevorzugt wird hier eine Inkubation von 24-48 h bei 37 °C, wie in dieser Arbeit dargestellt und nach DIN-Norm 10993-5 vorgegeben [45, 57].

Für eine Validierung der Ergebnisse hätten sich weitere Testmethoden angeboten. So kann ein direkter Kontakttest Aufschluss über die Auswirkungen des unmittelbaren Zell-Material-Kontakts geben. So platzierten Schmidt et al. und Pati et al. Kollagengerüste in einer 12-well-Platte und inkubierten diese mit Medium und verschiedenen Zelltypen [60, 61]. Song et al. verwendeten eine einprozentige Lösung der Testmaterialien aus Quallenkollagen, bovinem Kollagen, Gelatine und Hyaluronsäure und brachten sie in direkten Zellkontakt [62]. Jedoch ist die Fehlerrate hier durch Manipulation und technische Probleme bei der Versuchsanordnung sehr hoch. Das gleiche gilt für den indirekten Kontakttest über Agardiffusion oder Filter.

Als weiterer Schritt zur Überprüfung der Biokompatibilität wird meist die direkte Implantation in ein Versuchstier durchgeführt.

So implantierten Yosuke et al. Kollagengerüste mit PGA (Polyglycolsäure) in das Subkutangewebe von Ratten. Dies rief keine entzündliche Reaktion hervor bei guter Zelleinwanderung [63]. Xiao et al. implantierten Kollagengerüste in die Kornea von Hasen und sahen weder ein Ödem noch Entzündungszeichen [64].

Dieser Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Tierversuch, bei dem gleichzeitig Biomechanik und Biokompatibilität untersucht wurden, ersetzt. Dies bot den Vorteil, dass das Implantat ohne weiteren Zwischenschritt direkt an seinem Einsatzort getestet werden konnte. Hier wäre noch eine Untersuchung der intraartikulären Flüssigkeit in-vivo zum Ausschluss von Entzündungsparametern denkbar gewesen. Möglich ist hier sowohl die Messung und Differenzierung von Zellen wie Leukozyten als auch die Bestimmung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 und Immunglobulinen. Dies kann entweder direkt im Gelenkpunktat oder in den Organen der Immunabwehr analysiert werden. So untersuchten Song et al. die

Zellen und Zytokinproduktion in Lymphknoten und Milz von Mäusen nach subkutaner Implantation eines Kollagengerüsts, um eine Aussage über die Abwehrreaktion des Körpers zu erhalten. Sie nutzten Antikörper gegen Oberflächenmoleküle der Zellen wie T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren und bestimmten die Höhe der Zytokine Interleukin 4 und Interferon  $\gamma$ . Diese Messungen zeigten eine dem bovinen Kollagen vergleichbare Immunogenität [62]. Allerdings ist die Kosten-Nutzen-Relation dieser Untersuchungen, die nur in zertifizierten Laboren für die Zulassung zu klinischen Studien durchgeführt werden, fraglich.

## **4.2 Materialwahl und -eigenschaften**

In der vorliegenden Arbeit wurde Kollagen I verwendet, das aus Rattenschwänzen isoliert wurde. Als Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix von Sehnen und Bändern und als natürlich im Körper vorkommende Grundsubstanz bietet Kollagen I sehr gute Voraussetzungen für den Ersatz eines rupturierten Kreuzbandes. Für Kollagene im Allgemeinen und Kollagen I im Speziellen liegen vielfältige Daten zur Biokompatibilität und Biomechanik vor. Kollagengerüste bieten gute Bedingungen für die Ansiedlung und Vitalität von Fibroblasten und die Ausbildung von neuer Extrazellulärmatrix [47, 61, 65].

Kollagen I aus Rattenschwänzen verwendeten auch Abreu et al., um daraus ein Kollagengerüst für den Einsatz im Bereich der Wundheilung herzustellen. Dieses besiedelten sie mit Thrombozyten und Fibroblasten. Die Studie zeigte, dass die Dichte des Kollagengerüsts signifikanten Einfluss auf die Zellbesiedelung mit Fibroblasten hat, die Thrombozytenaktivierung blieb unabhängig von der Kollagendichte konstant [66].

Song et. al. extrahierten Kollagen aus Quallen und überprüften dessen Biokompatibilität, Degradierbarkeit und Immunogenität mittels MTT-Test, Zellkultur und Tierversuch. Sie konnten keine relevanten zytotoxischen Effekte feststellen und verglichen mit Rinderkollagen eine verbesserte Zellvitalität sowie eine vergleichbare Immunogenität [62]. Einen ähnlichen Ansatzpunkt untersuchten Pati et al. bei Kollagen aus Fischgewebe. Sie stellten ebenfalls eine gute Biokompatibilität bei gutem Zellwachstum, geringer Immunogenität und fehlender Zytotoxizität fest [61]. Schmidt et al. analysierten einen neuen Zellträger aus Kollagen auf in-vitro-Biokompatibilität. Hierfür verarbeiteten sie die mittlere Schicht von enthaarter Rinderhaut zu einem dünnen Kollagenfilm. Sie testeten diesen in Zellkulturen mit

humanen Osteosarkomzellen, mesenchymalen Stammzellen und Kardiomyozyten. Für alle drei Zelllinien konnten sie eine gute Proliferation und Funktion feststellen [60]. Rahmanian-Schwarz et al. implantierten in einer weiteren Studie dieses Kollagengewebe zur Überprüfung der in-vivo-Biokompatibilität in das Subkutangewebe von Ratten und nahmen Biopsien bis zu 84 Tage postoperativ. In der histologischen Untersuchung zeigten sich weder Narbenbildung noch Fremdkörperreaktionen. Das implantierte Gewebe war nach 42 Tagen komplett abgebaut [47].

Probleme gab es bisher noch bei der Resorptionszeit und den biomechanischen Eigenschaften. Die Schwierigkeit bezüglich der Biodegradierung besteht darin, dass je nach Einsatzort verschiedene Zeiträume notwendig sind. So sollte bei Kollagen, das als Band- und Sehnenersatz verwendet wird, die Biodegradierung langsamer ablaufen als beispielsweise bei Nervengewebe [43, 67]. Wichtig ist auch, dass Phasen verminderter Stabilität im Rahmen des Umbaus vermieden werden oder zumindest gut erforscht sind, um durch angepasste Rehabilitation das Risiko eines Implantatversagens zu minimieren. Zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften und zur besseren Steuerung der Degradierung arbeiteten einige Studien mit Crosslinking durch UV-Licht oder mit Hilfe von Chemikalien. Dies führte zwar zu einer verbesserten, jedoch im Vergleich zum nativen ACL und autologen Sehnen immer noch reduzierten Reißfestigkeit [61, 68].

Eine Modifikation durch Crosslinking ist mit dem verwendeten Implantat ebenfalls möglich. Die Auswirkungen des Crosslinkings auf Biomechanik und Biokompatibilität wurden in einer anderen Arbeit untersucht [69].

Des Weiteren sind verschiedene andere Veränderungen des Trägermaterials möglich.

Durch die Kombination von Kollagen mit PGA konnten auch in der Verwendung beim vorderen Kreuzbandersatz noch bessere Ergebnisse in der Zelleinwanderung und Kompressionsstärke erzielt werden, ohne die Biokompatibilität negativ zu beeinflussen [63].

Ebenfalls möglich ist die Beschichtung des Trägermaterials mit Fibronectin, für das eine verbesserte Zellhaftung, Proliferation und Extrazellulärmatrixproduktion nachgewiesen werden konnten [70, 71].

Ob auch in unserem Fall die Zelleinwanderung dadurch verbessert werden würde, müssten weitere Studien zeigen. Auch der Nutzen für die biomechanischen Eigenschaften muss noch weiter erforscht werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Besiedelung des Implantates mit autologen Zellen.

Hierfür wurden erfolgreich reife Fibroblasten wie auch multipotente mesenchymale Stammzellen verwendet [72, 73].

Erstere haben den Vorteil, dass sie bereits ausdifferenziert und sofort aktiv sind. Jedoch sind sie nur in eingeschränkter Menge verfügbar und besitzen ein begrenztes Proliferationspotential.

Zweitere sind differenzierungsfähig hin zu Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten und können einfach und zahlreich aus Knochenmark gewonnen werden [65, 74]. Im direkten Vergleich mit ACL-Fibroblasten und Hautfibroblasten zeigten die multipotenten mesenchymalen Stammzellen die höchste Proliferationsrate und Extrazellulärmatrixproduktion [73].

Der Nachteil der Kombination mit Zellen ist das aufwendigere Zulassungsverfahren, da ein solches Implantat als Arzneimittel gehandelt wird. Mit Zellen besiedelte Tissue Engineering Produkte fallen unter das Gesetz für Arzneimittel für neuartige Therapien ATMP (Advanced Therapy Medicinal Products), das Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG § 4b Sondervorschriften für Arzneimittel für neuartige Therapien). Hierfür gelten aufgrund des häufig experimentellen Charakters und der geringen Stückzahl abweichende Regeln zur Arzneimittelzulassung. Die Zuordnung und Zulassung wird durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA – European Medicines Agency) vorgenommen. „Regulation (EC) No 1394/2007 of the european parliament and of the council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004“.

Dazu kommt, dass ein mit Zellen besiedeltes Implantat in Herstellung und Lagerung mehr Aufwand und Kosten verursacht.

Auch die Anwendung von Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor), GDF (growth and differentiation factor), PDGF (platelet-derived growth factor) und TGF (transforming growth factor) wurde untersucht. Hier ergaben sich Hinweise, dass damit direkt die Zellvermehrung und die Zelldifferenzierung sowie die Ausbildung von Gefäßen und

Extrazellulärmatrix gesteigert werden kann. Haddad-Weber et. al. wiesen nach, dass BMP (bone morphogenetic protein) 12 und 13 (auch GDF 6 und 7 genannt) Fibroblasten aus mesenchymalen Stammzellen und aus vorderen Kreuzbandzellen zu einer ligamentogenen Differenzierung stimulieren können [75].

Es fehlen jedoch noch genauere Schlüsse über die exakte Anwendung und Auswahl der Wachstumsfaktoren [75-77]. Auch hier müssten weitere Arbeiten zeigen, ob eine Kombination mit dem in dieser Arbeit verwendeten Implantat zu der gewünschten Verbesserung führen würde. Jedoch erfordert dies ein etwas aufwendigeres Zulassungsverfahren wie bereits oben beschrieben.

Juncosa-Melvin et al. analysierten den Einfluss einer zyklischen Belastung über zwei Wochen auf die Genexpression von Kollagen I und III und die biomechanischen Eigenschaften eines mit MSC (mesenchymal stem cells) besiedelten Kollagengerüsts. Sie sahen eine signifikant höhere Festigkeit und drei bis vier Mal stärkere Genexpression im Vergleich zu nicht belasteten Kollagengerüsten [78, 79]. Nachteil dieser Modifikation ist der technisch größere Aufwand und die längere Produktionszeit.

In der vorliegenden Studie haben die Versuchstiere postoperativ das operierte Knie weitgehend voll belastet. Es wäre zu erwarten, dass auch diese Belastung das Remodeling, das Zellwachstum und die Einheilung des implantierten ACL fördert.

Ebenfalls als Trägermaterial für den Kreuzbandersatz wurde Seide untersucht, womit hinsichtlich Biokompatibilität, Zelleinwanderung und biomechanischen Eigenschaften gute Ergebnisse erzielt werden konnten [80, 81]. Eine weitere Studie muss die Anwendbarkeit dieses Trägermaterials bestätigen [82].

Im direkten Vergleich von biodegradierbaren Polymeren als alleinige Träger für den Kreuzbandersatz stellte sich PLLA (*poly-l-lactid-acid*) als das mit der höchsten Proliferationsrate und Ansiedlung der Fibroblasten heraus. Die biomechanischen Eigenschaften erwiesen sich als gut, jedoch noch verbesserbar. Hier war PGA führend, welches jedoch wiederum Mängel in der Zellansiedlung aufwies [83].

Nakayama et al. kombinierten Patellarsehnentransplantate mit Polyester. Dies führte zwar zu einer früheren Belastbarkeit, aber auch zu verstärkten entzündlichen Reaktionen [84].

Für alle Trägermaterialien und deren Modifikationen konnten in Studien bis hin zum großen Tiermodell gute Ansätze gefunden werden. Jedoch hat sich bis jetzt keines der Implantate soweit durchsetzen können, dass es als Alternative für den

Kreuzbandersatz in der Humanmedizin weitergeführt wurde. Verantwortlich hierfür sind unter anderem die Komplexität des ACL und seiner Umbauvorgänge, sowie die biomechanischen Eigenschaften des Kniegelenkes [43, 85].

Seit 2008 läuft eine klinische Studie zu einem SeriACL™ -Device, das auf einem bioresorbierbaren Gerüst beruht (Identifizierungsnummer NCT00775892). Zudem wird seit 2012 ein PLLA-Implantat, welches ebenfalls resorbierbar ist, in einer klinischen Studie getestet (Identifizierungsnummer NCT01634711). Hier stehen die Ergebnisse noch aus.

Weitere Informationen zu laufenden Studien finden sich unter [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

### **4.3 Ergebnisse der Biokompatibilitätstestungen**

Die in-vitro-Testungen sollten eine erste Aussage über die Biokompatibilität der aus Rattenschwänzen isolierten Kollagenfasern geben. Zudem wurde untersucht, ob die  $\gamma$ -Sterilisation die Biokompatibilität beeinflusste. Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigte keine klaren Unterschiede zwischen  $\gamma$ -sterilisierten und nicht sterilisierten Fasern. In der Zellzählung und der Zellproliferation nach 72 h gab es keine signifikanten Unterschiede, während in der Zellproliferation nach 48 h und in der Proteinbestimmung je eine Faserart signifikant bessere Ergebnisse erzielte. Leichte Vorteile für die  $\gamma$ -sterilisierten Fasern zeigten sich in der Zellmorphologie, da sich hier die Zellen konfluent und fibroblastär zeigten.

Zwar waren auch signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle im Sinne eines leicht reduzierten Zellwachstums und einer leicht reduzierten Zellaktivität zu beobachten. Jedoch war in allen Fällen eine hoch signifikante Differenz zur Positivkontrolle zu sehen, was auf eine zwar leicht reduzierte, jedoch immer noch gute Zellproliferationsrate als auch Zellvitalität schließen lässt. Dies wurde durch die Zellmorphologie bestätigt, in der fibroblastäre vitale Zellen bei beiden Eluatzen zu sehen waren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Testergebnisse auf eine gute Biokompatibilität der Kollagenfasern schließen lassen. Für die klinische Anwendung ist bei mindestens gleicher Biokompatibilität die Anwendung von  $\gamma$ -sterilisierten Fasern vorzuziehen, um eine nahezu vollständige Keimfreiheit zu gewährleisten.

Für die  $\gamma$ -Sterilisation liegen vielfältigen Daten zur Reduktion der Keimzahl vor, wobei die in der vorliegenden Studie verwendete Dosis von 25 kGy empfohlen wird [86-88].

Bezüglich des Einflusses auf biomechanische Eigenschaften und Enzymaktivitäten bestehen gegensätzliche Studienergebnisse. So konnten Kayurapan et al. keine Reduktion der Reißfestigkeit der Fascia lata bei einer Sterilisation mit 25 kGy feststellen [87]. In anderen Studien zeigte sich ein Verlust von Knochenfestigkeit bei einer Bestrahlung mit mehr als 30 kGy [89-91]. Fideler et. al. und Curran et al. sahen eine signifikante Reduktion der biomechanischen Eigenschaften bei  $\gamma$ -sterilisierten Bone-Tendon-Bone-Patella-Transplantaten gegenüber nicht sterilisierten Kontrollgruppen [92, 93].

Haddad-Weber et. al. überprüften den Einfluss der  $\gamma$ -Sterilisation auf die biomechanischen Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kollagenfasern aus Rattenschwänzen. Hier zeigten sich auch unter Sterilisation mit Ethanol und  $\gamma$ -Sterilisation unveränderte biomechanische Eigenschaften, sowie eine unveränderte Struktur in der Elektronenmikroskopie [94].

Unter Beachtung solcher Ergebnisse bietet sich die  $\gamma$ -Sterilisation mit begrenzter kGy-Zahl für die Implantate an, da sie unter Erhalt der biomechanischen Eigenschaften einfach und gründlich durchzuführen ist. Vom Paul-Ehrlich-Institut wird die Kombination eines chemischen Verfahrens (in diesem Falle durch Ethanol erfolgt) mit der  $\gamma$ -Sterilisation mit 25 bis 32 kGy empfohlen [95].

Die Biokompatibilität von Kollagen im Allgemeinen wurde auch in anderen Arbeiten bestätigt. So sahen Yosuke et al. Zelleinwanderung in großer Zahl in Kollagengerüste mit PGA, sowie Simionescu et. al. regelrechte Zellproliferation und fehlende Zytotoxizität für Kollagen und Elastingerüste [63, 96]. Song et al. extrahierten Kollagen aus Quallen und verglichen es mit Rinderkollagen, Gelatine und Hyaluronsäure. Sie stellten eine verbesserte Zellviabilität und fehlende Zytotoxizität fest [62]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Pati et al., die Kollagen aus Fischgewebe isolierten und in-vitro in Zellkulturen und in-vivo in Mäusen untersuchten. Hier zeigte sich eine ungestörte Zellansiedlung, immunogene Reaktionen blieben aus [61].

Zu beachten ist dennoch die Immunogenität und Antigenität von Kollagen, die zwar gering ausgeprägt ist, jedoch gerade in der klinischen Anwendung beobachtet und weiter erforscht werden muss. Minimiert wird das Risiko in diesem Fall durch die Verwendung von Kollagen I und die intraartikuläre Implantation [97].

Für die Langzeitlagerung bis zu 24 Wochen konnte kein eindeutiger Vorteil für eine der beiden Lagerungsbedingungen gesehen werden. Lediglich in der Zellzählung war

ein signifikanter Unterschied nach 24 Wochen zu sehen, was für die Lagerung bei 4°C spricht.

In der Einzelbeobachtung der Zeitpunkte war auffallend, dass ein signifikanter Abfall der Werte von 6 bzw. 12 zu 24 Wochen in der Mehrzahl der Testreihen für beide Lagerungsvarianten bestand.

So sollte für die klinische Anwendung ein Lagerungszeitraum von maximal 12 Wochen, optimalerweise 6 Wochen, eingehalten werden. Zur genauen Differenzierung vor klinischer Anwendung wäre eine weitere Testreihe mit zusätzlichen Zeitpunkten nach 8, 10 und gegebenenfalls 16 Wochen empfehlenswert.

In der Produktinformation für eine Lösung aus Rattenschwanzkollagen der Firma Sigma Aldrich wird beispielsweise eine Lagerung bei 2-8 °C für maximal 2 Wochen empfohlen (Katalognummer C3867) [98].

Die minimalen Vorteile für die Lagerung bei 4°C und auch die Empfehlung der Hersteller kann man darauf zurückführen, dass bei Kühlung weniger Abbauvorgänge ablaufen und somit bei der Eluatherstellung auch weniger Stoffe, die potentiell die Zellproliferation beeinflussen, freigesetzt werden. Es bietet sich deshalb eine Lagerung bei 4 °C an, um eine gleichbleibende Biokompatibilität auch über längere Lagerungszeiträume zu gewährleisten. Der Zeitraum von 12 Wochen ist ein für die klinische Anwendung akzeptabler Zeitraum zur Lagerung. Aufgrund der neuartigen Gewinnung und Isolierung der Kollagenfasern liegen keine Vergleichsstudien zur Langzeitlagerung vor.

#### **4.4 Wahl des Versuchstieres**

Die Wahl des Versuchstieres ist wichtig für die Anwendbarkeit und Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen. In der vorliegenden Arbeit wurden Miniaturschweine (Mini-Pigs) als Versuchstiere ausgewählt.

In bisherigen Arbeiten zur Rekonstruktion des ACL wurden verschiedene Versuchstiere wie Kaninchen, Schafe, Ziegen, Hunde und Schweine verwendet [99-102].

Proffen et. al verglichen in ihrer Studie Kniegelenke von Kühen, Schafen, Ziegen, Kaninchen, Hunden, Schweinen und Menschen und kamen zu dem Schluss, dass Kühe, Schafe, Ziegen und Schweine ausreichend bis gut für Untersuchungen am ACL geeignet seien. Es wurden jedoch rein anatomische Details wie Weite der



interkondylären Notch, Länge, Verlauf und Ansatzpunkte des ACL untersucht [103]. Für die Rekonstruktion des ACL sind die Knochenheilung, der histologische Aufbau und das Remodeling ebenso wichtige Vorgänge.

Murray et al. stellten fest, dass das ACL des Hundes dem des Menschen hinsichtlich Vaskularisierung und Histologie die größte Ähnlichkeit hatte. In dieser Studie wurde jedoch nur das ACL von Kuh, Schaf und Hund untersucht [104].

Laiblin et. al zeigten in ihrer Studie, dass die Knochenheilung von Miniaturschweinen der menschlichen ähnlicher sei als die von Hunden [105]. Auch Xerogeanes et. al stellten in ihrer Studie fest, dass das ACL des Schweins dem menschlichen näher steht in Bezug auf Kräfteverteilung und Belastung der beiden Bündel als das des Schafs und der Ziege [106]. Kääb et. al. verglichen den Knorpelaufbau von Mensch, Schwein, Kuh, Hund, Schaf, Ratte und Hase und kamen zu dem Ergebnis, dass der des Schweins dem Menschen am ähnlichsten ist [107]. Dazu kommt eine der humanen vergleichbare Biomechanik und Knochendichte, wie mehrere Studien feststellten [108-110].

Diese Ergebnisse machten das Schwein für die vorliegende Studie zum optimalen Versuchstier.

Zur Minimierung des Aufwandes für Haltung, Operation und Versorgung wurde das Göttinger Minischwein gewählt.

#### **4.5 Ergebnisse der Tierstudie**

Die Operationen und postoperativen Verläufe gestalteten sich komplikationslos ohne Implantatversagen oder äußerliche Entzündungszeichen. Dass die Tiere nach spätestens sechs Wochen voll belasteten, spricht für gute Beweglichkeit und Schmerzfreiheit.

Die Präparation der Gelenke mit stets erkennbarer Bandstruktur und fehlenden Entzündungszeichen bestätigte die Ergebnisse der in-vitro-Tests. Zeichen einer Abstoßungsreaktion waren nicht erkennbar. Somit ist auch in-vivo von einer guten Biokompatibilität auszugehen.

Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien, die Kollagene als Basis für den Ersatz von Bändern und Sehnen verwendeten. So nutzten Tovar et al. ein Konstrukt aus synthetischem Polymer und Kollagen aus Rinderhaut zur Kreuzbandrekonstruktion bei Schafen. Makroskopisch sahen sie nach drei, vier und

sechs Wochen ein straffes Implantat mit Synoviaüberzug ohne Zeichen einer Entzündung im Kniegelenk [111].

Goldstein et al. implantierten einen Sehnersatz aus Kollagen I, ebenfalls gewonnen aus Rinderhaut, in Achillessehnen von Hasen. Makroskopisch war dieser nach drei, zehn und zwanzig Wochen vollständig eingewachsen ohne Entzündungszeichen oder fibrotischen Umbau und ähnelte dem natürlichen Sehngewebe [112].

Beim Menschen jedoch besteht bei bovinem Kollagen eine erhöhte Gefahr von Abstoßungsreaktionen, da Rind Teil der menschlichen Nahrungskette ist.

Dass in der vorliegenden Studie alle Tiere die Operation ohne Schaden oder Infektion überstanden haben, spricht für die Qualität der intra- und postoperativen Versorgung. So hatten einige andere Arbeiten den Verlust von einzelnen Tieren aufgrund von Infektionen oder Anästhesiekomplikationen zu kompensieren [52, 113].

Das neu gebildete umliegende Gewebe um die Area intercondylaris könnte dem beim humanen Kreuzbandersatz bekannten „cyclops syndrome“ entsprechen. Hierbei kommt es zu einer überschießenden Gewebereaktion im OP-Gebiet, die zu einer Einschränkung der Kniefunktion führen kann [114]. Diese ist bei bis zu 4% der rekonstruierten ACLs nachzuweisen, wobei die Dunkelziffer auch weitaus höher liegen könnte [115, 116]. Die Ursachen für diese Weichteilreaktion sind ungeklärt, sie tritt jedoch bei Quadrizepssehnentransplantaten häufiger auf [117]. Delcogliano et al. sehen als mögliche Ursachen Mikrotraumata und Mikrobewegungen zwischen Implantat und tibialen Tunnel [118]. Mögliche Lösungen sind eine möglichst atraumatische OP-Technik und eine sorgfältige Abrundung des tibialen Tunnels. Ziel wäre es, den Kreuzbandersatz arthroskopisch mit möglichst kleinen Schnitten durchzuführen.

Die OP-Methode, die in dieser Studie, angelehnt an die des humanen Kreuzbandersatzes, durchgeführt wurde, wurde in ähnlicher Art und Weise auch in anderen Studien eingesetzt. Unterschiedlich war jeweils die Art der Fixation. So verwendeten einige Arbeiten femoral ebenfalls eine gelenkferne Fixation mittels Button, während Hunt et al. das Transplantat mit biodegradierbaren Interferenzschrauben fixierten. Tibial befestigten Weiler et al. und Scheffler et al. das Transplantat über Nähte und eine Knochenbrücke [50, 119, 120]. Weiler et al. sahen eine direkte Bandinsertion 24 Wochen postoperativ nach Verwendung einer resorbierbaren Interferenzschraube. Sie postulierten einen klaren Zusammenhang

der Bandinsertion mit der Verwendung der direkten intraartikulären Fixation [121]. Ma et al. verglichen die Verankerung mittels Endobutton und resorbierbarer Interferenzschraube und konnten keine Unterschiede im klinischen Verlauf feststellen [122]. Bei Verwendung von Interferenzschrauben besteht jedoch eine erhöhte Gefahr der Transplantatnekrose [123-125]. In dieser Studie wurde die gelenkferne Fixation gewählt, um eine möglichst unbeeinflusste Knochen-Band-Einheilung zu beobachten. Außerdem entspricht diese Fixationstechnik der OP-Technik, die für die Semitendinosussehe angewandt wird, die aktuell den Goldstandard in der Humanmedizin darstellt. Genauere Ausführungen zum Einfluss der Fixationsart auf die Bandinsertion finden sich unter Punkt 4.6.

#### **4.6 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen**

In der histologischen Untersuchung zeigte sich nach sechs Wochen wie auch nach sechs Monaten ein gut erhaltenes Implantat ohne Entzündungsreaktion. Dies unterstützt die Annahme einer angemessenen Biokompatibilität, da weder eine Abstoßung, noch ein vorzeitiger Abbau nachweisbar waren.

Nach sechs Wochen waren Form und Anordnung der Zellen, Ausbildung einer synovialen Deckschicht, Vaskularisierung und Anfärbung im Nachweis des polyklonalen Antikörpers Schwein deutliche Anzeichen eines beginnenden Bandremodelings.

Nach sechs Monaten nahm die Zellzahl weiter zu mit beginnender Septierung, was einem Fortschreiten des Remodelings entspricht.

Die synoviale Deckschicht war nach sechs Wochen mit 2-8 Lagen dicker als die des nativen ACL mit 2-4 Lagen. Dies lässt auf eine erhöhte Aktivität und einen erhöhten Nährstoffbedarf schließen, da vermutlich in der Phase der unvollständigen Vaskularisierung ein Großteil der Versorgung über die Deckschicht erfolgt. Folgerichtig konnte bei der 6-Monatsgruppe eine Deckschicht von nur noch 2-6 Lagen gesehen werden. Die Ausbildung der synovialen Deckschicht wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben und stellt einen wichtigen Aspekt im Remodelingprozess dar [126, 127].

Die Vaskularisierung war nach 6 Wochen ungleichmäßig mit einer stärkeren Ausprägung peripher als zentral. Nach 6 Monaten zeigte sich ein homogeneres Bild mit insgesamt stärkerer Vaskularisierung auch in den zentralen Bereichen. Dies deutet auf eine Ähnlichkeit zum nativen ACL hin, bei dem ebenfalls vor allem

peripher Gefäße vorhanden sind, die septal nach zentral ziehen. Außerdem ist die Gefäßversorgung des Implantates entscheidend für die Abläufe des Remodeling, um die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sicherzustellen und für eine gute Zellvitalität und damit Extrazellulärmatrixproduktion zu sorgen. Gleichzeitig muss jedoch beachtet werden, dass das Einwachsen der Gefäße zu einer verminderten Reißfestigkeit führen kann [51, 128, 129]. Eine ähnliche Verteilung und Entwicklung der Gefäße stellten auch Weiler et al. und andere in ihren Arbeiten fest [126, 127, 130]. So sahen Shino et. al. eine zunehmende Vaskularisierung von 6 bis 15 Wochen, wobei zentral noch avaskuläre Gebiete sichtbar waren [126]. Scheffler et. al. teilten das Implantat in drei Zonen, subsynovial, intermediär und zentral, und stellten eine abnehmende Gefäßdichte von der subsynovialen bis zur zentralen Zone fest [127]. Weiler et al. fand ebenfalls eine über die Zeit von 6 bis 24 Wochen zunehmende Vaskularisierung mit nur wenigen Gefäßen zentral [100, 130].

Eine weitere Möglichkeit, die Vaskularisierung zu beobachten, ist der Nachweis von VEGF (Vascular endothelial growth factor). So verfolgten Petersen et al. das Remodeling von autologen Achillessehnentransplantaten als Kreuzbandersatz bei Schafen. Sie sahen eine von zentral nach peripher zunehmende Färbung mit Anti VEGF-Antikörper, die ihre stärkste Ausprägung 12 Wochen postoperativ hatte, nach 24 Wochen abgenommen hatte und nach 52 Wochen nicht mehr nachweisbar war. Nachteil an dieser Methode ist die rein qualitative Auswertung, so dass Petersen et al. zusätzlich die in dieser Studie angewendete Faktor VIII-Färbung einsetzten [128].

Zur genaueren Beobachtung von Remodelingvorgängen verwendeten Weiler et. al. den Nachweis von Myofibroblasten [130]. Diese sollen für das „crimping“ der Kollagenfasern verantwortlich sein und die Extrazellulärmatrix maßgeblich beeinflussen [131]. Somit sind sie möglicherweise ein Indikator für die Ligamentisierung. Meller et al. nutzten einen Antikörper gegen SMA (smooth muscle actin), das in Myofibroblasten vorkommt und auf Remodelingaktivität hinweist [51, 132]. In dieser Studie wurde dafür der Kollagen I-Nachweis von zwei verschiedenen Spezies verwendet. Dies ist naheliegend, da das Konstrukt aus Kollagen I produziert wurde und dies gleichzeitig den Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix des nativen ACL darstellt. Nach sechs Wochen konnte bereits in der Hälfte der Präparate, vor allem peripher, Kollagen des Schweins nachgewiesen werden, bei nur dezentem

Nachweis des Rattenkollagens in zwei Präparaten. Nach sechs Monaten war dann in allen Präparaten eine deutliche Anfärbung für Kollagen I des Schweins zu sehen.

Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die Zellen des Empfängers in das Implantat eingewandert sind und zur Produktion von Extrazellulärmatrix angeregt wurden. Bestätigt wurde dies dadurch, dass eine hohe Zellzahl mit einer starken Anfärbung für Kollagen I des Schweins einherging und nach sechs Monaten kein Kollagen I der Ratte mehr nachgewiesen werden konnte.

Für eine abschließende Beurteilung der Vaskularisierung, der Zellproliferation und des Remodeling wäre gegebenenfalls ein weiterer Untersuchungszeitpunkt nach 12 oder 24 Monaten sinnvoll, um zu überprüfen, ob die Vaskularisierung und Zellzahl dann dem eines nativen ACL entsprechen und die Remodelingvorgänge gänzlich abgeschlossen sind.

Die Vorgänge an der Implantat-Knochengrenze mit Neubildung von Geflechtknochen und Sharpey'schen Fasern, die das Implantat mit dem Knochen verbinden, lassen auf eine beginnende Bandinsertion in der 6-Wochengruppe schließen. Bestätigt wird dies durch den Score von Unterhauser et. al., in dem die Präparate den Klassen 1 bis 3 zugeordnet werden konnten [56]. Während in der 6-Wochengruppe noch eine bindegewebige Schicht (FIZ, fibrous interzone) das Implantat vom Knochen trennt, ist diese nach sechs Monaten vollständig abgebaut. Diese FIZ wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben, als Zwischenschritt für die Entwicklung einer tragfähigen Implantat-Knochen-Verbindung [121, 133, 134]. Hier wurde auch die Möglichkeit beschrieben, dass es bei direktem Knochen-Implantat-Kontakt, beispielsweise durch eine Interferenzschraube zu einer direkten Knochen-Implantatheilung ohne die Ausbildung einer fibrösen Zwischenschicht kommen kann [121]. Interferenzschrauben führten bei den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten jedoch zur Verglasung, was sich negativ auf die Reißfestigkeit auswirkte.

Weiler et al. postulierten, dass bei der Band-Knochen-Heilung zwei verschiedene Mechanismen berücksichtigt werden müssen. So unterscheidet sich die Einheilung im Bohrtunnel von der Einheilung an der Gelenkoberfläche, da im Bohrtunnel die Kräfte parallel zur Knochen- und Implantatoberfläche wirken. Am Tunnelausgang dagegen ist die Hauptrichtung der Belastung senkrecht zur Oberfläche [121, 135]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen in eine ähnliche Richtung, da in Tunnelmitte vermehrt Sharpey'sche Fasern als Zeichen der indirekten Bandinsertion und am Tunnelausgang vermehrt chondroide Zellen als Hinweis auf die Entwicklung

einer direkten reifen Bandinsertion sichtbar waren. Die Sharpey'schen Fasern im Rahmen der indirekten Bandinsertion wurden in vielen weiteren Studien beschrieben, vor allem in Bereichen in denen kein direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat bestand [81, 121, 135].

Nach sechs Monaten konnte die Bandinsertion den Klassen 2 und 3 zugeordnet werden, mit vermehrt kalzifizierten chondroiden Zellen vor allem an der Gelenkoberfläche, was auf die Entwicklung einer direkten Bandinsertion hinweist. Außerdem engte neu gebildeter Geflechtknochen den Bohrkanal weiter ein. In anderen Studien mit extraartikulärer Fixation konnte nach dem gleichen Zeitraum lediglich eine indirekte Bandinsertion gesehen werden [81, 123, 135].

Vereinzelte Studien konnten nach sechs Monaten schon eine reife direkte Bandinsertion feststellen. Dies kann man auf Speziesunterschiede, unterschiedliche mechanische Beanspruchung und vor allem verschiedene Fixationsmethoden zurückführen. So sahen Fan et al. bei Kaninchen nach Kreuzbandersatz eine reife Bandinsertion nach 24 Wochen. Nach Einbau des gleichen Transplantates ins Schwein waren nach 24 Wochen zwar Zeichen einer Bandinsertion mit Sharpey'schen Fasern zu beobachten, jedoch noch keine reife Bandinsertion [81]. Weiler et al. untersuchten einen autologen Sehnenersatz am Schaf, den sie anatomisch gelenknah mittels Interferenzschraube fixierten. Hier konnte nach 24 Wochen eine reife Bandinsertion bei allen Tieren gesehen werden [121]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Hunt et al. mit einer abbaubaren Interferenzschraube, wobei hier auch vermehrt Zellinfiltrate und Fremdkörperriesenzellen im Bereich der Implantate gefunden wurden [120].

Gründe dafür, dass in dieser Arbeit trotz der extraartikulären Verankerung Zeichen für eine beginnende direkte Bandinsertion gefunden wurden, könnten auf der einen Seite eine gelungene feste Fixierung in anatomischem Winkel und auf der anderen Seite die speziellen Eigenschaften des Implantates sein. Laut Weiler et al. hat die Bewegung des Implantates entscheidenden Einfluss auf die Einheilung [121]. Das verwendete Implantat wiederum hatte durch die Wicklung Fasern in verschiedenen Lagen und Richtungen und damit eine spezielle Oberflächenstruktur.

Für das verwendete Konstrukt ist die extraartikuläre Fixierung die Methode der Wahl. Dies liegt an den beschriebenen negativen Auswirkungen auf die Reißfestigkeit bei Verwendung von Interferenzschrauben. Zudem bietet die Ähnlichkeit zur

Fixierungstechnik bei Verwendung der Semitendinosussehne die Sicherheit und die Expertise einer langen klinischen Erfahrung.

Hier wäre für weitere Studien eine längere Versuchsdauer vorteilhaft, um die Bandinsertion weiter zu beobachten, da sie für die Implantateinheilung eine bedeutende Rolle spielt und die Ergebnisse nach sechs Monaten auf die Entwicklung einer reifen direkten Bandinsertion hinweisen. Langzeitstudien zeigen, dass eine vollständige Implantat-Knochenheilung bis zu 12 Monate in Anspruch nimmt und die Umbauvorgänge nach zwei Jahren noch nicht abgeschlossen sein müssen [121, 130].

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Biokompatibilität von Kollagen I-basierten ACL-Konstrukten in-vitro und in-vivo zu überprüfen. Zudem erfolgte eine histologische Charakterisierung der Konstrukte nach sechswöchiger bzw. sechsmonatiger Versuchslaufzeit im Minipig-Tiermodell.

Das Kollagen I wurde durch eine neuartige Methode aus Rattenschwänzen isoliert und zu einem Implantat geknotet und gewickelt. Die Fasern wurden mittels Proliferationsmessung, Proteinbestimmung, Zellzählung und Zellmorphologie auf in-vitro-Biokompatibilität getestet. Hier zeigte sich eine gute Biokompatibilität sowohl für  $\gamma$ -sterilisierte Fasern als auch für nicht sterilisierte Fasern. In der Sterilitätsüberprüfung waren nach Anpassung des Sterilisationsverfahrens weder Bakterien- noch Pilzwachstum nachweisbar. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit vielfältigen Studien zur Biokompatibilität von Kollagen, in denen jeweils gute Zellviabilität und –proliferation im direkten oder indirekten Kontakt mit Kollagen gezeigt werden konnte.

Anschließend wurde das Konstrukt im Tierversuch direkt im Kniegelenk als vorderer Kreuzbandersatz implantiert. Nach Ablauf der Standzeit und Explantation der Kniegelenke wurden Paraffinschnittpräparate der Implantate sowie Paraffinschnittpräparate und Kunststoffschnittpräparate der ossa femora angefertigt und durchlichtmikroskopisch deskriptiv ausgewertet. Zusätzlich wurden die immunhistochemischen Färbungen Kollagen I des Schweins und der Ratte und Faktor VIII angefertigt, wobei in der Faktor VIII-Färbung zusätzlich eine quantitative Auswertung der Gefäßzahl vorgenommen wurde. Es wurde in der Kollagenfärbung ein Ersatz des Rattenkollagens durch das Schweinekollagen einhergehend mit einer hohen Zellzahl gezeigt. Eine synoviale Deckschicht und eine fortschreitende Vaskularisierung, sowie Form und Anordnung der Zellen zeigten Vorgänge des Remodeling. Innerhalb von 6 Monaten nahm die Vaskularisierung zu und neu gebildeter Geflechtknochen verengte die Bohrkanäle. Die Knochen-Implantat-Heilung war im Bohrkanal durch Sharpey'sche Fasern gekennzeichnet. Am Tunnelausgang fanden sich von sechs Wochen zu sechs Monaten Hinweise auf die fortschreitende Entwicklung einer direkten Bandinsertion.



Diese Ergebnisse entsprechen weitgehend den in der Literatur beschriebenen Remodelingvorgängen bei Studien zum Thema Kreuzbandersatz. Die beginnende direkte Bandinsertion spricht für eine gute Fixation und die Einheilung begünstigende Eigenschaften des Implantates. Dies ist ein geeigneter Ansatz für weitere Untersuchungen. Von Seiten der Biokompatibilität und der Integration des Gewebes ist das Implantat zum Kreuzbandersatz geeignet. Es bleibt abzuwarten, inwieweit die erforderlichen mechanischen Eigenschaften erreicht werden können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kim, S., et al., *Increase in outpatient knee arthroscopy in the United States: a comparison of National Surveys of Ambulatory Surgery, 1996 and 2006*. J Bone Joint Surg Am, 2011. **93**(11): p. 994-1000.
2. Kiapour, A.M. and M.M. Murray, *Basic science of anterior cruciate ligament injury and repair*. Bone Joint Res, 2014. **3**(2): p. 20-31.
3. Rizzo M, H.S., Bassett FH 3rd., *Comparison of males' and females' ratios of anterior-cruciate-ligament width to femoral-intercondylar-notch width: a cadaveric study*. Am J Orthop (Belle Mead NJ). 2001. **30**(8): p. 660-4.
4. Lephart SM, A.J., Ferris CM., *Neuromuscular contributions to anterior cruciate ligament injuries in females*. Curr Opin Rheumatol. , 2002. **14**(2): p. 168-73.
5. Breusch, S., et al., *Klinikleitfaden Orthopädie Unfallchirurgie*. Vol. 8. 2016, München: Urban & Fischer bei Elsevier.
6. Fink C, H.C., Benedetto KP., *Arthroseentwicklung nach Ruptur des vorderen Kreuzbandes*. Der Unfallchirurg, 1994. **97**(7): p. 357-361.
7. Daniel, D.M., et al., *Fate of the ACL-injured Patient*. The American Journal of Sports Medicine, 1994. **22**(5): p. 632-644.
8. Renström, P.K.J., *Vorderes Kreuzband - Operation und Rehabilitation*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 2007. **11**.
9. Benninghoff, A., Drenckhahn, Detlev (Hrsg.); Waschke, Jens (Hrsg.), *Taschenbuch Anatomie*. Vol. 1. 2008, München: Elsevier GmbH. 80-86.
10. Niethard, F., Pfeil, Joachim, Biberthaler, Peter, *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Vol. 6. Auflage. 2009, Stuttgart: Thieme. 550.
11. Faller, A., Schünke, M., *Der Körper des Menschen*. Vol. 14. Auflage. 2004, Stuttgart: Thieme. 194-195.
12. Platzer, W., *Taschenatlas Anatomie Band 1 Bewegungsapparat*. Vol. 10. Auflage. 2009, Stuttgart: Thieme. 206-212.
13. Teske, W., et al., *Ruptur des vorderen Kreuzbands*. Der Orthopäde, 2010. **39**(9): p. 883-900.
14. Yagi, M., et al., *Biomechanical analysis of an anatomic anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 2002. **30**(5): p. 660-6.

15. Woo, S.L., et al., *Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair*. J Biomech, 2006. **39**(1): p. 1-20.
16. Petersen, W. and B. Tillmann, *Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes*. Der Orthopäde, 2002. **31**(8): p. 710-718.
17. Vunjak-Novakovic, G., et al., *TISSUE ENGINEERING OF LIGAMENTS*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2004. **6**(1): p. 131-156.
18. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme E-Book Library Studium & Lehre, 2015.
19. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. Vol. 17. 2008: Urban & Schwarzenberg.
20. Petersen, W. and T. Zantop, *Anatomy of the anterior cruciate ligament with regard to its two bundles*. Clin Orthop Relat Res, 2007. **454**: p. 35-47.
21. Siewert, J., *Chirurgie*. Vol. 7. Auflage. 2006, Heidelberg: Springer. 858-860.
22. Woo SL, H.J., Adams DJ, Lyon RM, Takai S., *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): p. 217-225.
23. Murray, M.M., *Current status and potential of primary ACL repair*. Clin Sports Med, 2009. **28**(1): p. 51-61.
24. Petersen, W. and T. Zantop, *Das vordere Kreuzband: Grundlagen und aktuelle Praxis der operativen Therapie*. 2009: Deutscher Ärzte-Verlag.
25. Rüter, A., *Unfallchirurgie*. 2004: Urban & Fischer.
26. Kraeutler, M.J., J.T. Bravman, and E.C. McCarty, *Bone-patellar tendon-bone autograft versus allograft in outcomes of anterior cruciate ligament reconstruction: a meta-analysis of 5182 patients*. Am J Sports Med, 2013. **41**(10): p. 2439-48.
27. Dai, C., et al., *Arthroscopic single-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with six-strand hamstring tendon allograft versus bone-patellar tendon-bone allograft*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2016. **24**(9): p. 2915-2922.
28. Lin, Y.-C., et al., *Arthroscopic transtibial single-bundle posterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon graft compared with hamstring*

- tendon graft*. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2013. **133**(4): p. 523-530.
29. Ouweleen, K.M. and J.J. McElroy, *A unique complication following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy, 1995. **11**(2): p. 225-8.
  30. Rosenberg, T.D., et al., *Extensor mechanism function after patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction*. Am J Sports Med, 1992. **20**(5): p. 519-25; discussion 525-6.
  31. Rubinstein, R.A., Jr., et al., *Isolated autogenous bone-patellar tendon-bone graft site morbidity*. Am J Sports Med, 1994. **22**(3): p. 324-7.
  32. Dehne, A., *Kniechirurgie: Individueller Erfahrungsquerschnitt*. Dtsch Arztebl International, 2009. **106**(5): p. A-188.
  33. Ageberg, E., et al., *Knee extension and flexion muscle power after anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon graft or hamstring tendons graft: a cross-sectional comparison 3 years post surgery*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2009. **17**(2): p. 162-169.
  34. Kartus, J., T. Movin, and J. Karlsson, *Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts*. Arthroscopy, 2001. **17**(9): p. 971-80.
  35. Mascarenhas, R., et al., *Bone-patellar tendon-bone autograft versus hamstring autograft anterior cruciate ligament reconstruction in the young athlete: a retrospective matched analysis with 2–10 year follow-up*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2012. **20**(8): p. 1520-1527.
  36. Gifstad, T., et al., *Lower Risk of Revision With Patellar Tendon Autografts Compared With Hamstring Autografts: A Registry Study Based on 45,998 Primary ACL Reconstructions in Scandinavia*. The American Journal of Sports Medicine, 2014. **42**(10): p. 2319-2328.
  37. Tisherman, R., et al., *Allograft for knee ligament surgery: an American perspective*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2019.
  38. Brown, M.J. and T. Carter, *ACL Allograft: Advantages and When to Use*. Sports Med Arthrosc Rev, 2018. **26**(2): p. 75-78.
  39. Fishman, J.A., M.A. Greenwald, and P.A. Grossi, *Transmission of infection with human allografts: essential considerations in donor screening*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(5): p. 720-7.

40. Bhatia, S., et al., *Bony Incorporation of Soft Tissue Anterior Cruciate Ligament Grafts in an Animal Model: Autograft Versus Allograft With Low-Dose Gamma Irradiation*. Am J Sports Med, 2012.
41. Sun, K., et al., *Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament with hamstring tendon autograft and fresh-frozen allograft: a prospective, randomized controlled study*. Am J Sports Med, 2011. **39**(7): p. 1430-8.
42. Ignatius, A. and L. Dürselen, *Möglichkeiten und Grenzen des „tissue engineering“ des vorderen Kreuzbandes*. Der Orthopäde, 2009. **38**(11): p. 1080-1086.
43. Nau, T. and A. Teuschl, *Regeneration of the anterior cruciate ligament: Current strategies in tissue engineering*. World Journal of Orthopedics, 2015. **6**(1): p. 127-136.
44. Williams, D.F., ed. *Definitions in biomaterials*. Advances in biomaterials. Vol. 8. 1987, Elsevier: Amsterdam.
45. Bruinink, A. and R. Luginbuehl, *Evaluation of Biocompatibility Using In Vitro Methods: Interpretation and Limitations [Without Title]*. 2011, Springer Berlin / Heidelberg. p. 1-36.
46. E. Wintermantel, B.S.-D., A. Bruinink, M. Petitmermet, J. Blum, S.-W. Ha, *Biokompatibilität*, in *Medizintechnik Life Science Engineering Interdisziplinarität · Biokompatibilität · Technologien · Implantate · Diagnostik · Werkstoffe · Business*. 2008, Springer. p. 59-96.
47. Rahmanian-Schwarz, A., et al., *In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013: p. n/a-n/a.
48. Wintermantel, E. and S. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering. Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business*. 2009: Springer. 59-94.
49. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.
50. Weiler, A., et al., *The Influence of Locally Applied Platelet-Derived Growth Factor–BB on Free Tendon Graft Remodeling After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*. The American Journal of Sports Medicine, 2004. **32**(4): p. 881-891.

51. Meller, R., et al., *Graft remodeling during growth following anterior cruciate ligament reconstruction in skeletally immature sheep*. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2009. **129**(8): p. 1037-1046.
52. Dustmann, M., 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 Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2008. **16**(4): p. 360-369.
53. Amiel, D., J.B. Kleiner, and W.H. Akeson, *The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin*. Am J Sports Med, 1986. **14**(6): p. 449-62.
54. Bischofberger S., *Biomechanische Untersuchung von biomaterialbasierten Kreuzbandkonstrukten*. 2012: Würzburg.
55. Uhlig, M., *Histologische Untersuchung eines aus Rattenkollagen gefertigten Implantates zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes beim Minipig*. 2013, Mensch und Buch Verl.: Berlin. p. II, 156 S.
56. Unterhauser, F., Scheffler SU, Keil J, Weiler A *Comparison of tendon/to/bone healing using soft tissue autografts and fresh-frozen allografts in a sheep model of ACL reconstruction*, in *52th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*. 2006: Chicago, IL.
57. 10993-5:2009-10, D.E.I., *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten in Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009) German version EN ISO 10993-5:2009*. 2009-10, Beuth Verlag.
58. Brunner TJ, W.P., Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark WJ., *In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility*. Environ Sci Technol., 2006. **40**(14): p. 4374-4381.
59. Chang, J.S., et al., *In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line*. Environ Sci Technol, 2007. **41**(6): p. 2064-8.
60. Schmidt, T., et al., *Evaluation of a thin and mechanically stable collagen cell carrier*. Tissue Eng Part C Methods, 2011. **17**(12): p. 1161-70.
61. Pati, F., et al., *Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. **100A**(4): p. 1068-1079.

62. Song, E., et al., *Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility*. *Biomaterials*, 2006. **27**(15): p. 2951-2961.
63. Yosuke Hiraoka, Y.K., Hiroki Ueda and ,Yasuhiko Tabata, *Fabrication and Biocompatibility of Collagen Sponge Reinforced with Poly(glycolic acid) Fiber*. *Tissue Engineering*, December 2003,. **9**(6): p. 1101-1112.
64. Xiao, X., et al., *In vivo study of the biocompatibility of a novel compressed collagen hydrogel scaffold for artificial corneas*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013: p. n/a-n/a.
65. Liu, Y., H.S. Ramanath, and D.-A. Wang, *Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies*. *Trends in Biotechnology*, 2008. **26**(4): p. 201-209.
66. Abreu, E.L., M.P. Palmer, and M.M. Murray, *Collagen density significantly affects the functional properties of an engineered provisional scaffold*. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2010. **93**(1): p. 150-157.
67. Kato, Y.P. and F.H. Silver, *Formation of continuous collagen fibres: Evaluation of biocompatibility and mechanical properties*. *Biomaterials*, 1990. **11**(3): p. 169-175.
68. Caruso, A.B. and M.G. Dunn, *Changes in mechanical properties and cellularity during long-term culture of collagen fiber ACL reconstruction scaffolds*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005. **73**(4): p. 388-97.
69. Klug, A., *Biomechanische und zellbiologische Untersuchung von augmentierten Biomaterial-basierten Kreuzbandkonstrukten*. 2016.
70. Laurencin, C.T. and J.W. Freeman, *Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach*. *Biomaterials*, 2005. **26**(36): p. 7530-6.
71. Repesh, L.A., T.J. Fitzgerald, and L.T. Furcht, *Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits*. *J Histochem Cytochem*, 1982. **30**(4): p. 351-8.
72. Hongbin Fan, H.L., Siew L. Toh, James C.H. Goh *Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model*. *Biomaterials* 30 (2009), 2009: p. 4967–4977.

73. Van Eijk, F., et al., *Tissue engineering of ligaments: a comparison of bone marrow stromal cells, anterior cruciate ligament, and skin fibroblasts as cell source*. Tissue Engineering, 2004. **10**(5-6): p. 893-903.
74. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
75. Haddad-Weber, M., et al., *BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells*. Cytotherapy, 2010. **12**(4): p. 505-13.
76. Steinert, A.F., et al., *In situ IGF-1 gene delivery to cells emerging from the injured anterior cruciate ligament*. Biomaterials, 2008. **29**(7): p. 904-16.
77. Madry, H., D. Kohn, and M. Cucchiaroni, *Direct FGF-2 gene transfer via recombinant adeno-associated virus vectors stimulates cell proliferation, collagen production, and the repair of experimental lesions in the human ACL*. Am J Sports Med, 2013. **41**(1): p. 194-202.
78. Juncosa-Melvin, N., et al., *Effects of mechanical stimulation on the biomechanics and histology of stem cell-collagen sponge constructs for rabbit patellar tendon repair*. Tissue Engineering, 2006. **12**(8): p. 2291-300.
79. Juncosa-Melvin, N., et al., *Mechanical stimulation increases collagen type I and collagen type III gene expression of stem cell-collagen sponge constructs for patellar tendon repair*. Tissue Engineering, 2007. **13**(6): p. 1219-26.
80. Altman, G.H., et al., *Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments*. Biomaterials, 2002. **23**(20): p. 4131-41.
81. Fan, H., et al., *Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model*. Biomaterials, 2009. **30**(28): p. 4967-77.
82. Richmond, J.C. and P.P. Weitzel, *Bioresorbable scaffolds for anterior cruciate ligament reconstruction: do we need an off-the-shelf ACL substitute?* Sports Med Arthrosc, 2010. **18**(1): p. 40-2.
83. Lu, H.H., et al., *Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies*. Biomaterials, 2005. **26**(23): p. 4805-16.
84. Nakayama, Y., et al., *Remodeling of patellar tendon grafts augmented with woven polyester after anterior cruciate ligament reconstruction in humans*. Journal of Orthopaedic Science, 1999. **4**(3): p. 163-170.



85. Leong, N.L., F.A. Petrigliano, and D.R. McAllister, *Current tissue engineering strategies in anterior cruciate ligament reconstruction*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013: p. n/a-n/a.
86. Ireland, L. and D. Spelman, *Bacterial Contamination of Tissue Allografts – Experiences of the Donor Tissue Bank of Victoria*. Cell and Tissue Banking, 2005. **6**(3): p. 181-189.
87. Kayurapan, A., S. Makadelok, and S. Waikakul, *Effect of gamma sterilisation and deep-freezing on length and strength of fascia latae*. J Orthop Surg (Hong Kong), 2010. **18**(1): p. 68-70.
88. Vangsness, C.T., et al., *Allograft Transplantation in the Knee: Tissue Regulation, Procurement, Processing, and Sterilization*. The American Journal of Sports Medicine, 2003. **31**(3): p. 474-481.
89. Bright R, S.J., Gambill V, *Sterilization of human bone by irradiation*, in *Osteochondral Allografts: Biology, Banking, and Clinical Applications*, M.H. Friedlaender GE, Sell KW Editor. 1983, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (US) & AAOT Banks: Boston, Little Brown. p. 223–232.
90. Pelker, R.R., G.E. Friedlaender, and T.C. Markham, *Biomechanical properties of bone allografts*. Clin Orthop Relat Res, 1983(174): p. 54-7.
91. Shelton, W.R., et al., *Use of allografts in knee reconstruction: II. Surgical considerations*. J Am Acad Orthop Surg, 1998. **6**(3): p. 169-75.
92. Fideler, B.M., et al., *Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts*. Am J Sports Med, 1995. **23**(5): p. 643-6.
93. Curran, A.R., et al., *The biomechanical effects of low-dose irradiation on bone-patellar tendon-bone allografts*. Am J Sports Med, 2004. **32**(5): p. 1131-5.
94. Haddad-Weber, M., *Development of stem cell-based ACL- and tendon reconstruction*  
*Entwicklung Stammzell-basierter Konstrukte für den Kreuzband- und Sehnenersatz*. 2010.
95. *Workshop Infektionssicherheit von Knochentransplantaten*. 2008; Available from: <http://www.pei.de/DE/infos/pu/genehmigungen/gewebe-21-a-amg/workshop-knochen/ws-knochen-node.html>.
96. Simionescu, D.T., et al., *Biocompatibility and remodeling potential of pure arterial elastin and collagen scaffolds*. Biomaterials, 2006. **27**(5): p. 702-713.

97. Lynn, A.K., I.V. Yannas, and W. Bonfield, *Antigenicity and immunogenicity of collagen*. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2004. **71B**(2): p. 343-354.
98. Sigma-Aldrich.com. 2015.
99. Pearce, A.I., et al., *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. Eur Cell Mater, 2007. **13**: p. 1-10.
100. Weiler, A., 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): p. 751-61.
101. Carpenter, J.E. and K.D. Hankenson, *Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2004. **25**(9): p. 1715-1722.
102. Martinek, V., et al., *Enhancement of Tendon-Bone Integration of Anterior Cruciate Ligament Grafts with Bone Morphogenetic Protein-2 Gene Transfer A Histological and Biomechanical Study*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2002. **84**(7): p. 1123-1131.
103. Proffen, B.L., et al., *A comparative anatomical study of the human knee and six animal species*. The Knee, 2012. **19**(4): p. 493-499.
104. Murray, M.M., A. Weiler, and K.P. Spindler, *Interspecies Variation in the Fibroblast Distribution of the Anterior Cruciate Ligament*. The American Journal of Sports Medicine, 2004. **32**(6): p. 1484-1491.
105. Laiblin, C. and G. Jaeschke, *Klinisch-chemische Untersuchungen des Knochen- und Muskelstoffwechsels unter Belastung beim Gottinger Miniaturschwein--eine experimentelle Studie*. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 1979. **92**(6): p. 124-8.
106. Xerogeanes, J.W., et al., *A functional comparison of animal anterior cruciate ligament models to the human anterior cruciate ligament*. Annals of Biomedical Engineering, 1998. **26**(3): p. 345-52.
107. KÄÄB, M.J., I. Ap Gwynn, and H.P. NÖTzli, *Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species*. Journal of Anatomy, 1998. **193**(1): p. 23-34.
108. Walsh, M.P., et al., *A Comparison Between a Retrograde Interference Screw, Suture Button, and Combined Fixation on the Tibial Side in an All-Inside*

- Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Biomechanical Study in a Porcine Model.* The American Journal of Sports Medicine, 2009. **37**(1): p. 160-167.
109. Aga, C., et al., *Biomechanical Comparison of Interference Screws and Combination Screw and Sheath Devices for Soft Tissue Anterior Cruciate Ligament Reconstruction on the Tibial Side.* The American Journal of Sports Medicine, 2013. **41**(4): p. 841-848.
110. Nakano, H., et al., *Interference screw fixation of doubled flexor tendon graft in anterior cruciate ligament reconstruction – biomechanical evaluation with cyclic elongation.* Clinical Biomechanics, 2000. **15**(3): p. 188-195.
111. Tovar, N., et al., *ACL reconstruction using a novel hybrid scaffold composed of polyarylate fibers and collagen fibers.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. **100A**(11): p. 2913-2920.
112. Goldstein, J.D., et al., *Development of a reconstituted collagen tendon prosthesis. A preliminary implantation study.* J Bone Joint Surg Am, 1989. **71**(8): p. 1183-91.
113. Scheffler, S.U., 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): p. 448-58.
114. Balcarek, P., et al., *Einfluss des Zyklops-Syndroms nach vorderer Kreuzbandplastik auf das klinische Ergebnis.* Sportverletz Sportschaden, 2008. **22**(04): p. 220-224.
115. Jackson, D.W. and R.K. Schaefer, *Cyclops syndrome: loss of extension following intra-articular anterior cruciate ligament reconstruction.* Arthroscopy, 1990. **6**(3): p. 171-8.
116. Marzo, J.M., et al., *Intraarticular fibrous nodule as a cause of loss of extension following anterior cruciate ligament reconstruction.* Arthroscopy, 1992. **8**(1): p. 10-8.
117. Sonnery-Cottet, B., et al., *Clinical and Operative Characteristics of Cyclops Syndrome After Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction.* Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2010. **26**(11): p. 1483-1488.

118. Delcogliano, A., et al., *Light and scan electron microscopic analysis of cyclops syndrome: etiopathogenic hypothesis and technical solutions*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 1996. **4**(4): p. 194-199.
119. Scheffler, S., et al., *Remodeling of ACL Allografts is Inhibited by Peracetic Acid Sterilization*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2008. **466**(8): p. 1810-1818.
120. Hunt, P., O. Rehm, and A. Weiler, *Soft tissue graft interference fit fixation: observations on graft insertion site healing and tunnel remodeling 2 years after ACL reconstruction in sheep*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2006. **14**(12): p. 1245-1251.
121. Weiler, A., et al., *Tendon healing in a bone tunnel. Part II*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2002. **18**(2): p. 124-135.
122. Ma, C.B., et al., *Hamstring anterior cruciate ligament reconstruction: a comparison of bioabsorbable interference screw and endobutton-post fixation*. Arthroscopy, 2004. **20**(2): p. 122-8.
123. Blickenstaff, K.R., W.A. Grana, and D. Egle, *Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model*. Am J Sports Med, 1997. **25**(4): p. 554-9.
124. Grana, W.A., et al., *An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model*. Am J Sports Med, 1994. **22**(3): p. 344-51.
125. Goradia, V.K., et al., *Strength of ACL reconstructions using semitendinosus tendon grafts*. J Okla State Med Assoc, 1998. **91**(5): p. 275-7.
126. Shino, K., et al., *Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog*. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume, 1984. **66-B**(5): p. 672-681.
127. Scheffler, S., et al., *The Impact of Radiofrequency Shrinkage on the Mechanical and Histologic Properties of the Elongated Anterior Cruciate Ligament in a Sheep Model*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2005. **21**(8): p. 923-933.
128. Petersen, W., et al., *The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep*. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2003. **123**(4): p. 168-174.

129. Shrive, N., et al., *Soft-tissue "flaws" are associated with the material properties of the healing rabbit medial collateral ligament.* Journal of Orthopaedic Research, 1995. **13**(6): p. 923-9.
130. Weiler, A., et al.,  *$\alpha$ -Smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling.* Journal of Orthopaedic Research, 2002. **20**(2): p. 310-317.
131. Murray, M.M. and M. Spector, *Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells.* Journal of Orthopaedic Research, 1999. **17**(1): p. 18-27.
132. Melrose, J., et al., *Spatial and temporal localization of transforming growth factor-beta, fibroblast growth factor-2, and osteonectin, and identification of cells expressing alpha-smooth muscle actin in the injured annulus fibrosus: implications for extracellular matrix repair.* Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(16): p. 1756-64.
133. Rodeo, S.A., et al., *Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog.* J Bone Joint Surg Am, 1993. **75**(12): p. 1795-803.
134. Park, M.J., M.C. Lee, and S.C. Seong, *A comparative study of the healing of tendon autograft and tendon-bone autograft using patellar tendon in rabbits.* Int Orthop, 2001. **25**(1): p. 35-9.
135. Wilcke, A., *Vordere Kreuzbandläsion: Anatomie, Pathophysiologie, Diagnose, Therapie, Trainingslehre, Rehabilitation ; mit 106 Tabellen.* 2004: Springer Singapore Pte. Limited.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ansicht eines gebeugten linken Kniegelenks von vorn.....	3
Abbildung 2: Längsschnitt durch ein VKB.....	4
Abbildung 3: Isolation der Kollagenfasern aus einem Rattenschwanz.....	19
Abbildung 4: Konstrukt bei der biomechanischen Messung.....	20
Abbildung 5: Intraoperativer Blick auf die eröffnete Kniegelenkshöhle eines Minipig. .....	31
Abbildung 6: Konstrukt vor Implantation in das Minipig.....	31
Abbildung 7: Freipräpariertes Konstrukt.....	33
Abbildung 8: Ergebnisse der Proliferationsmessung nach 48 h.....	37
Abbildung 9: Ergebnisse der Proliferationsmessung nach 72 h.....	38
Abbildung 10: Ergebnisse der Proteinbestimmung.....	39
Abbildung 11: Ergebnisse der Zellzählung.....	40
Abbildung 12: Ergebnisse der Zellproliferation nach 48 h im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.....	41
Abbildung 13: Ergebnisse der Zellproliferation nach 72 h im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.....	42
Abbildung 14: Ergebnisse der Proteinbestimmung im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.....	42
Abbildung 15: Ergebnisse der Zellzählung im Zeitverlauf von 1 bis 24 Wochen.....	43
Abbildung 16: Implantat 6 Monate post OP.....	45
Abbildung 17: Masson-Goldner-Färbung einer Übersichtsaufnahme eines Implantats (b) 6 Wochen post OP.....	46
Abbildung 18: Masson-Goldner-Färbung einer Detailaufnahme eines Implantats 6 Wochen post OP.....	47
Abbildung 19: Masson-Goldner-Färbung eines Implantats (b) mit angrenzender Synovia 6 Wochen post OP.....	47
Abbildung 20: Movat-Pentachrom-Färbung der Übergangszone Knochen zu Implantat 6 Wochen post OP.....	48
Abbildung 21: Movat-Pentachrom-Färbung der Bandinsertion 6 Wochen post OP.....	48
Abbildung 22: Faktor-VIII-Gefäßdarstellung eines Implantats 6 Wochen post OP.....	49
Abbildung 23: Kollagen-I-Nachweis in einem Implantat 6 Wochen post OP.....	50

Abbildung 24: Kollagen-I-Nachweis mit Detailaufnahme eines Implantats 6 Wochen post OP.....	50
Abbildung 25: Masson-Goldner-Färbung einer Detailaufnahme eines Implantats 6 Monate post OP.....	51
Abbildung 26: Masson-Goldner-Färbung eines Implantats mit Synovia 6 Monate post OP. ....	51
Abbildung 27: Movat-Pentachromfärbung der Übergangszone Knochen zu Implantat 6 Monate post OP.....	52
Abbildung 28: Masson-Goldner-Färbung eines Implantats mit Sharpey´schen Fasern 6 Monate post OP.....	52
Abbildung 29: Faktor-VIII-Gefäßdarstellung eines Implantats 6 Monate post OP.....	53
Abbildung 30: Kollagen-I-Nachweis im Tunnelausgangsbereich eines Implantats 6 Monate post OP.....	53
Abbildung 31: Kollagen-I-Nachweis im Implantat 6 Monate post OP. ....	54
Abbildung 32: Masson-Goldner-Färbung eines Implantats nativ.....	54
Abbildung 33: Masson-Goldner-Färbung eines nativen VKB. ....	55

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ACL	Vorderes Kreuzband
AMG	Arzneimittelgesetz
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d	Tag
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
F <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Eisen(III)-oxid
FGF	Fibroblast growth factor
FIZ	Fibrous interzone
g	Gramm
GDF	Growth and differentiation factor
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser
IGF	Insulin-like growth factor
IL-1	Interleukin 1
kg	Kilogramm
kGy	Kilogray
LB	Lysogeny broth
li.	Links
Lig.	Ligamentum
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MG	Masson-Goldner-Färbung
mg	Milligramm



min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MP	Movat-Pentachrom
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale Stammzelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
neg	Negativ
nm	Nanometer
OP	Operation
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglycolsäure
PLLA	Poly-L-lactide
re.	Rechts
ROI	Region of interest
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
TGF	Transforming growth factor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TPP	Mikrotiterplatte
TSA	Trypticase Soja Agar
UV	Ultraviolett
VKB	Vorderes Kreuzband
ZEMM	Zentrum für experimentelle molekulare Medizin
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## 9 Anhang

### Entwässerungsprotokoll Paraffinschnitte

Wasser	0,5 h
EDTA	48 h
Wasser	0,5 h
Ethylalkohol 70%	24 h
Ethylalkohol 80%	24 h
Ethylalkohol 80%	24 h
Ethylalkohol 96%	24 h
Ethylalkohol 96%	4 d
Ethylalkohol 100%	7 d
Xylol	24 h

### Entwässerungsprotokoll der Paraffinschnitte im Entwässerungsautomaten

Ethylalkohol 70%	8 h
Ethylalkohol 80%	4 h
Ethylalkohol 80%	4 h
Ethylalkohol 96%	8 h
Ethylalkohol 96%	10 h
Ethylalkohol 100%	10 h
Ethylalkohol 100%	10 h
Ethylalkohol 100%	10 h
Xylol	1 h
Xylol	1,5 h
Paraffin	2,5 h
Paraffin	2 h

### Entwässerungsprotokoll Kunststoffeinbettung

Ethylalkohol 70%	für 7 d
Ethylalkohol 80%	für 7 d
Ethylalkohol 80%	für 7 d
Ethylalkohol 96%	für 7 d
Ethylalkohol 96%	für 7 d

Ethylalkohol 100 %	für 7 d
Ethylalkohol 100 %	für 7 d
Ethylalkohol 100 %	für 7 d
Xylol 100%	2 x 0,5 h zur Entfettung

### **Färbeprotokoll HE-Färbung**

entplasten in MEA	3 x 30 min
absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %)	je 2 min
Aqua dest.	2 min
Alcianblau	10 min
Leitungswasser	spülen
Alkalischer Ethylalkohol	1 h
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest.	eintauchen
Weigert´s Eisenhämatoxylin	10 min
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest.	2 min
Brillant Crocein-Säurefuchsin	10 – 15 min
Essigsäure 0,5 %ig	kurz spülen
PWS (Phosphorwolframsäure) 5 %	20 min
Essigsäure 0,5%ig	kurz spülen
Ethylalkohol 100%	3 x 5 min
Saffron du Gatinais	1 h
Ethylalkohol 100%	3 x spülen
Ethylalkohol 100%	2 min
Xylol	2 x 5 min

### **Färbeprotokoll Movat Pentachrom-Färbung**

entplasten in MEA	3 x 30 min
oder entparaffinieren in Xylol	3 x 5 min
absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 80%)	je 2 min
Aqua dest.	2 min
Alcianblau	10 min
Leitungswasser	spülen

Alkalischer Ethylalkohol	1 h
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest.	Eintauchen
Weigert´s Eisenhämatoxylin	10 min
Leitungswasser, fließend	10 min
Aqua dest.	Eintauchen
Weigert´s Eisenhämatoxylin	10 min
Leitungswasser fließend	10 min
Aqua dest.	2 min
Brillant Crocein-Säurefuchsin	10-15 min
Essigsäure 0,5%	Kurz spülen
Phosphorwolframsäure 5%	20 min
Essigsäure 0,5%	Kurz spülen
Ethylalkohol 100%	3 x 5 min
Saffron du Gatinais	1 h
Ethylalkohol 100%	3 x spülen
Ethylalkohol 100%	2 min
Xylol	2 x 5 min

### **Färbeprotokoll Masson-Goldner-Färbung**

entparaffinieren in Xylol	3 x 5 min
absteigende Alkoholreihe (Ethylalkohol 100%, Ethylalkohol 96%, Ethylalkohol 80%)	je 2 min
Aqua dest.	2 min
Weigert´s Eisenhämatoxylin	4 min
Leitungswasser	10 min
Säurefuchsin-Ponceau	5 min
Essigsäure 1%ig	abspülen
Differenzieren unter Sichtkontrolle in PMS-Orange-G	15 s – 30 min
Essigsäure 1%ig	abspülen
Aqua dest.	Spülen
Lichtgrün	5 – 10 min
Essigsäure 1%ig	abspülen
Ethylalkohol 100%	3 x kurz spülen

Xylol 2 x 5 min

### **Färbeprotokoll Faktor VIII Färbung**

Xylol 2 x 10 min

absteigende Alkoholreihe bis 70%

Aqua dest 2 min

100 ml Phosphatpufferlösung (PBS) pH 7,2 gemischt mit 900 ml Aqua dest 5 min

frische Phosphatpufferlösung 5 min

Lagerung in Feuchtekammer

400 µl 0,1%ige Pepsinlösung in 0,01 N HCL 36 °C 30 min

2 x PBS 5 min

400 µl 2%ige Normalserum in PBS in Feuchtkammer 30 min

300 µl 0,1%ige primäre Antikörperlösung (Faktor VIII-AK) 4 °C 12 h

2x in PBS 5 min

2%ig sekundärer Antikörper + 2%ig Normalserum in PBS RT 30 min

2x in PBS 5 min

300 µl AB Komplex aus 5 ml PBS + 5µl Reagenz A + 5 µl Reagenz B RT 50 min

2x PBS 2x5 min

Chromagenpuffer 2x5 min

Alkalische Phosphatase Substrat in 5 ml auftragen

Chromogenpuffer

PBS 1 min

Aqua dest 1 min

### **Färbeprotokoll Kollagen I-Färbung**

Xylol 2 x 10 min

Absteigende Alkoholreihe von 100% bis 70% je 2 min

Aqua dest. Spülen

PBS 5 min

Fettstift Umranden

0,2%ige Hyaluronidaselösung 250 µl	15 min im Wärmeschrank
PBS	2 x 5 min spülen
Normalserum 5% in PBS 250 µl	30 min
Anti Schwein/Ratte Antikörper in Antikörperlösung 250 µl	12 h
PBS	2 x 5 min
Zweitantikörper 250 µl	30 min
PBS	2 x 5 min spülen
AB-Komplex aus VECTASTAIN ABC Kit	50 min
PBS	2 x 5 min
Chromogenpuffer	2 x 5 min
Alkaline Phosphatase Standard Substrat Kit	Unter mikroskopischer Kontrolle einwirken lassen
PBS	Abbremsen der Reaktion

### **Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer**

Aqua dest.	5 min
Hämatoxylin nach Meyer	3 min
Leitungswasser	10 min