

Technische Universität München  
Fakultät für Medizin  
Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum Rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

**Biomechanische Untersuchungen  
zum Einfluß der Hydrostatischen Hochdruck-Behandlung  
auf Zugfestigkeit und E-Modul  
von Sehnen des Schweins**

**Cornelia Heister**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät  
für Medizin der  
Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation  
1. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger  
2. apl. Prof. Dr. Dr. H. P. Rechl

Die Dissertation wurde am 10.01.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2007 angenommen.

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>4</b>
1.1. Einleitung	4
1.2. Zielsetzung	4
<b>2. Material / Methode</b>	<b>10</b>
2.1. Auswahl der Sehnen	10
2.2. Prüfprotokoll	12
2.3. Vorversuche: Bestimmung des Sehnenquerschnittes	15
2.3.1. Vorgehen bei der Messung des Sehnenquerschnitts mittels manueller Messung	16
2.3.2. Vorgehen bei der MRT-Messung und Berechnung des Sehnenquerschnitts durch die Bestimmung der Anzahl der Pixel	18
2.3.3. MRT-Berechnung der große und kleinen Achse und Bestimmung des Sehnenquerschnitts mittels Ellipsen-Formel	21
2.4. Hydrostatische Hochdruck-Behandlung	22
2.5. Testung der Sehnen im biomechanischen Zugversuch	24
2.5.1. Biomechanische Parameter	24
2.5.2. Prüfverfahren	25
2.5.3. Einspanntechnik	27
2.6. Immunhistochemischer Kollagen- und Proteoglykannachweis	29
2.6.1. Vorgehen	29
2.6.2. Auswahl der Kollagene und Proteoglykane	29
2.6.3. Vorbehandlung der Präparate	29
2.6.4. Anfertigen der Kryomikrotomschnitte	30
2.6.5. Immunhistochemischer Nachweis	30
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1. Vorversuche: Vergleich der Querschnittsmessungen	31
3.2. Ergebnisse der Querschnittsmessungen	33
3.3. Ergebnisse der biomechanischen Prüfungen und statistische Auswertung	34
3.3.1. E-Modul	36
3.3.2. Zugfestigkeit	38

3.3.3.	Auswertung des Tiefgefrierens auf die Sehnen	40
3.4.	Auswertung der Hysteresekurven	42
3.5.	Ergebnisse der immunhistochemische Markierung	45
3.5.1.	Kollagen 1	45
3.5.2.	Versican	45
<b>4.</b>	<b>Diskussion der eigenen Prüfmethode und Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>77</b>
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	77
7.2.	Tabellenverzeichnis	77
7.3.	Abbildungsverzeichnis	77
7.4.	Immunhistochemisches Protokoll	78
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>80</b>

## 1. Einleitung und Zielsetzung

### 1.1. Eineitung

In der operativen Orthopädie spielt die Deckung von Knochendefekten an Wirbelsäule und Extremitäten eine wichtige Rolle. Als therapeutische Herausforderung, sowohl eine komplikationsfreie und dauerhafte Defektdeckung, als auch eine für den Patienten hochgradige Wiederherstellung der Funktionalität des betreffenden Organs zu erzielen und somit eine Verbesserung der Lebensqualität des Patienten zu garantieren, sind bisher verschiedene Therapieoptionen – mit entsprechenden Ergebniseinschränkungen – im klinischen Alltag gebräuchlich.

Um hier eine wegweisende Verbesserung zu erzielen, wurden im Rahmen des **Forschungsprojektes FORTEPRO** experimentelle Untersuchungen zur Auswirkungen des **hydrostatischen Hochdrucks (HHD)** auf Knochen, Knorpel, Sehnen und Zellen durchgeführt. Ziel ist es eine alternative Methode zu beschreiben und definieren, die hier hoffnungsvolle therapeutische Aspekte eröffnet.

Speziell bezog sich diese Arbeit auf die Situation, daß bei der Defektdeckung an Extremitäten Sehngewebe insofern eine Rolle spielt, da es bei en bloc Resektionen und Reimplantationen von Knochensegmenten mit dem Knochen verbunden ist. Es sollte geklärt werden, ob die Behandlung mit hydrostatischen Hochdruck (HHD-Behandlung) Sehngewebe bezüglich der biomechanischen und strukturellen Eigenschaften verändert.

Besonders problematisch sind **große segmentale Knochendefekte lasttragender Areale**, z.B. der Extremitäten, die oft nach Resektionen bei Tumorerkrankungen, wie dem Ewing- oder Osteosarkom, entstehen.

Bisherige Möglichkeiten der Rekonstruktion bestehen in der Implatation von:

- Endoprothesen , bzw. Knochenersatzmaterialien
- Allografts
- und Autograft.

Werden jüngeren Patienten **Endoprothesen** implantiert, so stellen Lockerungen des Implantates auf Grund der noch höheren sportlichen Aktivität der Altersgruppe oft ein großes Problem dar (Böhm et al., 2003, S. 355; Sys et al., S. 175). Auch treten Komplikationen, wie aseptische Lockerungen und mangelnder Einbau der Endoprothese in den bestehenden Knochenverbund auf (Böhm et al., 1998, S. 61; Böhm et al., 2003, S. 355, 356). Endoprothesen sind zwar mechanisch belastungsstabil, besitzen aber keine osteoinduktiven oder osteokonduktiven Eigenschaften.

**Knochenersatzmaterialien**, wie beispielsweise Pyrost wirken zwar osteokonduktiv, haben sich jedoch nur für die Therapie nicht lasttragender Knochenareale bewährt, da es eine mangelhafte mechanische Belastungsstabilität besitzt. Üblicherweise wird es z.B. zur Rekonstruktion nach Tumorausräumung primärer Knochentumore, Spondylodesen und Defektdeckung nach granulomatöser Knochenzerstörung herangezogen (Mittelmeier et al., 1998, S. 126-135).

Mit Hilfe von **Allografts** lassen sich größere Knochendefektareale vor allem nach Tumorresektionen wieder auffüllen (Mittelmeier et al., 1996, S. 1091; Wuismann et al., S. 994-1002). Unerwünschte Komplikationen hierbei sind das Infektionsrisiko und immunologische Reaktionen, die zur Transplantatabstoßung und Gewebsnekrose mit Stabilitätsverlust führen können (Mittelmeier et al., 1996, S. 1091; Enneking et al., 1991, S. 1123-1142; Asada et al., 1997, S. 392-395; Chen et al., 2002, 1156-1161, Refior et al., S. 71). Diese Transplantate müssen in einer Transplantatbank verwaltet werden, für die spezielle Richtlinien eingehalten werden müssen (Sys et al., S. 177; Knaepler et al., 1991, Chirurg 62, S. 763). Um das Infektionsrisiko zu senken werden diese allogenen Transplantate autoklaviert oder Gamma-bestrahlt (Kühne et al., S. 314).

Die Nachteile einer **Autoklavierung** bei Temperaturen von 121° bzw. 134° sind eine Schädigung der biomechanischen Eigenschaften und der osteoinduktiven Proteinstrukturen (Knaepler et al., 1992, S. 477-484).

Auch die **Gamma-Bestrahlung** mit 15 bis 25 kGy mit dem Ziel der Senkung des HIV-Infektionsrisikos allogener Transplantate, die von den meisten Knochenbanken verwendet werden, (Fideler et al., S. 645, 646) führen schon ab einer Bestrahlungsdosis von 25 kGy zu einer Festigkeitsabnahme des Knochens auf Werte zwischen 61 und 69% (Knaepler et al., 1991, Unfallchirurg 17, S. 197).

Die Alternative zu den vorgestellten Verfahren ist die Verwendung **autogener Transplantate**, mit denen das Infektionsrisiko, immunologische Reaktionen und die Organisation einer Knochenbank vermieden werden kann. Als autogenes Transplantat kann beispielsweise die Fibula langstreckige Knochendefekte bis zu 20 cm überbrücken. (Mittelmeier et al., 1996, S. 1090). Bei diesen autogenen Transplantaten, die an anderer Stelle entnommen wurden und somit auch einen zweiten Entnahmeort und ein zweites Operationsgebiet notwendig machten, ist ebenfalls mit einer verminderten Belastbarkeit in einer Zeit von 6-24 Monaten im Rahmen des funktionellen Remodellings zu rechnen (Mittelmeier et al., 1996, S. 1090).

Zudem weisen sie oft eine Forminkongruenz auf und ergänzen den zu behandelten Knochendefekt oft nur unzulänglich, um zusätzlich eine bessere Paßgenauigkeit zu gewährleisten, werden in einigen Fällen tumorbefallene Knochensegmente en-bloc reseziert, bestrahlt oder autoklaviert und orthotop reimplantiert.

Seit einigen Jahren wird daher in ausgesuchten Fällen, die z.B. die Möglichkeit einer onkologisch sicheren Tumorresektion mit weiten Resektionsgrenzen erfüllen, eine **intraoperative extrakorporale Irradiation und Replantation (IEIR)** durchgeführt. Das tumortragende Knochen- oder Gelenksegment wird onkologisch korrekt reseziert, extrakorporal von makroskopischem Tumor debridiert, mittels Radiatio devitalisiert und zur Defektrekonstruktion orthotop replantiert (Sabo et al., 2003, 1003-1012; Sabo et al., 1999, S. 580-588; Hong et al., S. 441-447; Uttendaele et al., S. 348-353). Dabei wurden ähnlich hohe Komplikationsraten, wie Frakturen und Infektionen, von bis zu 85% wie unter der Verwendung von allogenen Transplantaten verzeichnet (Sabo et al., 2003, 1003-1012; Sabo et al., 1999, S. 580-588). Es zeigte sich zudem eine Abnahme der biomechanischen Eigenschaften, wie z.B. Zunahme der kortikalen Knochenporosität und Auftreten von aseptischen Knochennekrosen, und der biologischen Eigenschaften, wie eine Reduktion der Osteoinduktivität, (Voggenreiter et al., S. 583-585; Sugimoto et al., 1991, S. 494; Uttendaele et al., S. 348). und ein Verlust des Gelenkknorpels, der nach einer Bestrahlung mit 300 Gy beschrieben wurde (Chen et al., S. 1156ff).

Die Resektion eines Gelenkes mit nachfolgender Bestrahlung oder Autoklavierung bei erhaltenen Sehnenansätzen, ist nicht zu empfehlen.

**Sehnen**, die Gamma-bestrahlt wurden, erfuhren in experimentellen Untersuchungen eine statistisch signifikante Abnahme der Zugfestigkeit und des E-Moduls ab einer Dosis von 20 kGy (20 000 Gy) (Rasmussen et al., S. 195; Salehpour et al., S. 898-906; Fideler et al., S. 643-646; Deyne et al., S. 51, Curran et al., S. 1131-1135).

Auch die **Autoklavierung** mit 130°C über 10 min. vermindert die biomechanischen und biologischen Eigenschaften der Sehnen (Sugiura et al., S. 293ff). Somit wäre die Stabilität und damit die Funktionalität der Gelenke nicht gewährleistet.

Diese hohen Komplikationsraten machen es notwendig, ein Verfahren zur Devitalisierung von tumorbefallenen Knochensegmenten zu entwickeln, das möglichst keinen negativen Einfluß auf die biomechanischen und biologischen Eigenschaften sowohl von Knochen, Knorpel und Sehnen besitzt, um den Funktionserhalt der Gelenke, der ein wichtiger Baustein für die Lebensqualität ist, zu garantieren. Wünschenswert bei Tumoren im gelenknahen Bereich wäre ein Resektion des tumorbefallenen Knochensegmentes mit vollständig erhaltenen Sehneninsertionen, um nach der Devitalisation und Replantation die Funktion des Gelenkes so gut wie möglich zu erhalten.

Das Forschungsprojekt **FORTEPRO** setzt sich mit der Entwicklung biologischer Implantate aus körpereigenen Zellen und Geweben auseinander.

Diese Forschungsprojekt prüft, ob die HHD-Behandlung eine Alternative in der Therapie großer tumorbedingter oder durch chronische Knocheninfektionen verursachte Defekte lasttragender Knochenareale zur den oben genannten Therapieoptionen ist.

Das Ziel ist es, zukünftig tumorbefallene Knochensegmente mit erhaltenen Sehneninsertionen, v.a. im Gelenkbereich, zu resezieren, eine Devitalisierung mittels HHD-Behandlung durchzuführen und zu reimplantieren.

In verschiedenen Arbeiten wurde untersucht, ob eine **Devitalisierung befallener Knochensegmente** mittels HHD-Behandlung durchgeführt werden kann, ohne daß sich die biomechanischen und biologischen Eigenschaften des Knochen und Knorpel verschlechtern.

Auch die Auswirkungen der Zellviabilität nach einer HHD-Behandlung wurde dargestellt.

Seit Jahren wird der hydrostatischen Hochdruck in der **Lebensmittelindustrie** im Bereich zwischen 100 und 600 MPa zur Haltbarmachung von Nahrungsmitteln durch **Inaktivierung von Mikroorganismen** verwendet (Meyer-Pitroff et al., 2003, 2<sup>nd</sup> International Conference; S. 295-305). In experimentellen Arbeiten starben Bakterien und Viren durch ein Behandlung mit hydrostatischen Hochdruck verschiedener Druckstufen ab (Jurkiewicz et al., S. 6935-6937; Wuytack et a., S. 205-212; Arroyo et al., S. 735-742).

Auswirkungen des HHD auf Moleküle blieben auf die Beeinflussung **nicht-kovalente Bindungen** zwischen und innerhalb von Makromolekülen beschränkt, insofern, daß sich die dreidimensionale Struktur (Konformation) verändern kann (Masson et al., 2001, S. 85, Masson et al., 1999, S. 50, 51). In der Lebensmittelindustrie kann dadurch eine Reduktion der Antigenität von Nahrungsmitteln erreicht werden.

Dies war ein Anreiz in Untersuchungen die Auswirkung einer HHD-Behandlung auf humane Knochen-, Knorpel- und Tumorzellen verschiedenen Ursprungs durchzuführen.

Der **hydrostatischen Hochdruck** wirkt, wie im Namen schon enthalten, in Flüssigkeiten und breitet sich, sofern Druck auf ein eingeschlossene Fläche ausgeübt wird, nach allen Richtungen durch die ganze Flüssigkeit hindurch aus. Das bedeutet, daß **der Druck an jedem Ort gleich groß ist** (Hammer et al., S. 56, 57).

Behandelt man Gewebe, die in Flüssigkeiten eingelegt sind und selbst einen hohen Wassergehalt aufweisen, wie dies bei Knochen, Knorpel und Sehnen der Falle ist, mit HHD, so wird eine gleichmäßige Durchdringung des Druckes erzielt. Für ein Devitalisierungsverfahren, das Tumorzellen im Gewebeverbund abtöten soll, ist das sehr vorteilhaft.

Die **in vitro Studien** des Forschungsprojektes untersuchten bisher die Auswirkungen einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung mit 300 bzw. 600 MPa auf Knochen, Knorpel und pro- bzw. eukaryontischen Zellen.

Bezüglich der biomechanischen Parameter für **osteochondrale Segmente** aus *bovinen* Femurkondylen nach einer HHD-Behandlung mit 300 bzw. 600 MPa, die mittels einem speziell entwickeltem repetitivem Kugeleindrückversuch getestet wurden, konnten keine statistisch signifikanten Änderungen bezüglich des Relaxations- und Steifigkeitsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Die immunhistochemische Markierung von Aggrecan und Link-Protein ergab keinen Unterschied im Verteilungsmuster zur unbehandelten Kontrolle (Diehl et al., 2006, S. 8-14).

Ebenso wurden *humane Knochensegmente* aus der Kortikalis und der Spongiosa entnommen und mit 300 bzw. 600 MPa behandelt. Für die HHD-Behandlung mit 300 MPa ergab sich für die Kortikalis- und Spongiosa-Segmente keine signifikante Änderung der biomechanischen Parameter, wie E-Modul, Festigkeit und Bruchdehnung. Unter einer 600 MPa-Behandlung der Kortikalis verminderten sich signifikant der Elastizitätsmodul um 15% und die Festigkeit um 8% (Steinhauser et al., S. 130-135).

Im Hinblick auf die Zellviabilität wurden *humane Osteoblasten und Fibroblasten, sowie verschiedene Tumorzelllinien*, wie Osteosarkomzellen, histiozytische Leukämiezellen und ovarale Tumorzellen, mit HHD behandelt. Ab einer Druckstufe von 350 MPa waren alle Zelllinien abgetötet (Diehl et al., 2003, S. 1851-1855).

Diese Wirkung des HHD auf Zellen bestätigte eine weitere Studie, die zeigte, daß *humane Chondrozyten und Chondrosarkomzellen im Gewebeverbund* ab einem hydrostatischen Hochdruck von 300 MPa über 10 min. irreversibel geschädigt wurden und Chondrosarkomzellen ab einer Druckstufe von 350 MPa abstarben (Naal et al., 1977-1982).

Für Knochenzellen im segmentale Gewebeverbund war das Zellwachstum ab einer Druckstufe von 200 MPa vollkommen inhibiert (Schauwecker et al., S. 3-7).

Damit ist die HHD-Behandlung ein reproduzierbares Verfahren, das nur geringe Änderungen der mechanischen Eigenschaften hervorruft und Knochen devitalisiert.

In dieser Studie wurden **Sehnen** des *Schweines* nach einer HHD-Behandlung mit 300 bzw. 600 MPa im Zugversuch biomechanisch getestet.

Eine immunhistochemische Markierung sehnespezifischer Protein unterstützte das biomechanische Ergebnis.

## 1.2. Zielsetzung

Diese Studie untersuchte die biomechanischen und strukturellen Auswirkungen einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung mit 300 bzw. 600 MPa auf Achillessehnen des Schweines.

Es wurde geprüft, ob es zukünftig möglich wäre Knochensegmente im Gelenkbereich mit erhaltenen Sehnenansätzen zu resezieren, mit HHD zu behandeln und zu reimplantieren, ohne daß die Stabilität der Gelenke vermindert ist.

Es wurden 2 Gruppen gebildet. Gruppe 1 wurde mit 300 MPa, Gruppe 2 mit 600 MPa hochdruckbehandelt. Die Sehnen wurden im **Zugversuch** bis zum Versagen getestet und die **biomechanischen Parameter**, Elastizitätsmoduls (E-modul) und Zugfestigkeit, gemessen bzw. errechnet. Zu jeder Gruppe wurde eigens eine unbehandelte Kontrolle gebildet und untersucht.

Die **statistische Auswertung** stellte die biomechanischen Parameter der hochdruckbehandelten Gruppe den biomechanischen Parametern ihrer unbehandelten Kontrolle gegenüber und prüfte, ob statistisch signifikante Abweichungen bezüglich der Werte der Zugfestigkeit und des E-Moduls vorliegen.

Um strukturelle Veränderungen, wie Konformationsänderungen zu erfassen, wurden das Kollagen I und Versican der beiden hochdruckbehandelten Gruppen sowie ihrer unbehandelten Kontrollen **immunhistochemisch** markiert

Im Rahmen des Forschungsprojektes FORTEPRO prüfte diese Arbeit die Veränderungen des HHD auf Sehnen. Das Ziel des Forschungsprojektes ist es nach Zusammenführen der Ergebnisse aller Teilprojekte in vitro Versuche an Groß- oder Kleintier zu durchzuführen.

## **2. Methodik der eigenen Untersuchungen**

### **2.1. Auswahl der Sehnen**

Bei der Auswahl des Untersuchungsgutes stellte sich Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse tierischer Präparate auf den Menschen.

In dieser Studie sollen die biomechanischen Eigenschaften, sowie eventuelle histologische Veränderungen kollagener Fasern von Sehnen des Schweines erfaßt werden.

Das wichtigste Strukturelement von weichen und harten Geweben in Menschen und Tieren ist das Kollagen. Eine Sehne besteht zu 90% aus Kollagen (Franke et al., S. 3) (Schlüter et al., S. 51). Die kleinste Einheit ist das Tropokollagen, das zusammengelagert eine Kollagenfibrille bildet. Der Durchmesser der Kollagenfibrillen schwankt von Tier zu Tier und hängt außerdem von der Gewebeart ab. Bündel von Kollagenfibrillen ergeben Fasern.

In Bändern und Sehnen sind Einzelfasern parallel angeordnet und zu Faszikeln zusammengefaßt, die durch eine Retikularmembran umschlossen sind. Mehrere Faszikel, zwischen denen sich Bindegewebe, Blutgefäße und Nerven befinden, ergeben eine Sehne (Siebels et al., S. 14, 15).

Um die biomechanischen Veränderungen von Sehnen nach einer HHD-Behandlung zu erfassen, eignen sich deshalb Tiersehnen, da sie ebenfalls, wie bei humanen Sehnen auch, als wichtigstes Strukturelement das Kollagen besitzen.

Bänder und Sehnen enthalten zwischen 60-80% Wasser, das mit Glykosaminoglykanen eine geleeartige Verbindung eingeht und als Gleitmittel, Füllstoff und Abstandshalter zwischen den kollagenen Fasern liegt. Kollagen ist für die Zugfestigkeit verantwortlich und macht 70-80% des Trockengewichts aus. Mehr als 90% dieses Trockenanteils besteht aus Kollagen vom Typ I (Siebels et al. S. 16). In der immunhistochemischen Markierung wurde neben dem Kollagen Typ I das Versican ausgewählt, das ein großes Chondroitin-Sulfat-Proteoglycan ist und von den Fibroblasten sezerniert wird. (Schlüter et al., S. 56)

Für diese Studie wurde sich für die gut beschaffbaren Achillessehnen vom Schwein entschieden. Die Übertragbarkeit ist gegeben, da diese Sehnen ebenfalls zu über 80% aus Kollagen bestehen und davon zu über 90% aus Kollagen I (Yin et al., S. 713). E-Modul-Werte der Ziegen liegen um 410 MPa, die der Menschen um 520 MPa. Untersuchungen zeigten, daß sich die mechanischen Eigenschaften der kollagenen Faserbündel von Ziegen und Menschen kaum unterschieden (Siebels et al., S. 23).

In der Literatur wurden Schweinesehnen von 4 bis 5 Monate alten Schweinen bereits in biomechanischen Versuchen getestet. Dabei zeigte sich in Abhängigkeit von der Funktion der Sehnen, ob es Flexor- oder Extensorsehnen waren, eine unterschiedliche Elastizität. Für digitale Extensorsehnen werden Mittelwerte des E-Moduls mit 760 MPa (Schadwick et al., S.

1035) und 850 MPa (Kitamura et al., S 908). Die Mittelwerte der E-Module für digitale Flexorsehnen liegen mit Mittelwerten für den E-Modul von 1600 MPa viel höher (Shadwick et al., S. 1035). Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der Zugfestigkeit wider. Die digitalen Extensorsehnen besaßen eine Zugfestigkeit von 40 bis 50 MPa, wohingegen die digitalen Flexorsehnen eine Zugfestigkeit von 80 bis 90 MPa aufwiesen (Shadwick et al., S. 1035).

Für diese Studie wurden Achillessehnen der Hinterläufe von 4 Monate alten Schweinen der Rasse Deutsches Hybridschwein verwendet.

## 2.2. Prüfprotokoll

**Am Tag 1** der Versuchsreihe wurden 20 paarige Hinterläufe von 20 Schweinen frisch vom Schlachthof abgeholt. Es wurde darauf geachtet, daß jeweils die beiden Hinterläufe des gleichen Tieres im Schlachthof in einer Tüte verpackt wurden. Dann wurden die Sehnen sorgfältig vom Peritendineum freipräpariert und bei 4°C in mit Ringer-Lösung getränkten Tüchern paarweise und vom gleichen Tier stammend aufbewahrt, um einer Dehydratation vorzubeugen (Racce et al., S. 1208). Am selben Tag erfolgte die Querschnittsbestimmung mittels MRT. Die 20 Sehnenpaare wurden auf zwei Versuchsgruppen zufällig verteilt.

Ein Sehnenpaar stammt von einem Tier, die Unterscheidung rechts und links wurde hier nicht getroffen.

Die Zuteilung zur hydrostatischen Hochdruckbehandlung einer Sehne des Sehnenpaares geschah zufällig. Die andere Sehne des Sehnenpaares der unbehandelten Kontrollgruppe zugeteilt. Es wurde kein Randomisierungsverfahren verwendet.

Für jedes Sehnenpaar bzw. für jedes Tier wurde eine Nummer vergeben.

Es wurden für die hydrostatische Hochdruckbehandlung der Sehnen zwei Druckstufen ausgewählt. Deshalb wurden zwei Gruppen gebildet.

Die **Gruppe 1** wurde mit **300 MPa**, die **Gruppe 2** wurde mit **600 MPa** hochdruckbehandelt.

Die Sehnen der Gruppe 1 erhielten die Nummern 1 bis 9, die Sehnen der Gruppe 2 wurden von 10 bis 19 durchnummeriert. Für die hochdruckbehandelten Sehnen wurde der Nummer ein „a“ beigegeben, (z.B. 10 a). Die unbehandelte Referenzgruppe wurde mit einem „b“ versehen.

Für die Durchführung der hydrostatischen Hochdruckbehandlung **am Tag 2** wurden die Sehnen mit dem Buchstaben „a“ der Gruppen 1 und 2 in Plastiktüten mit Ringer-Lösung frei von Luftblasen eingeschweißt. Erst dann wurden sie in den Druckbehälter gegeben. Die zugehörigen unbehandelten Kontrollen mit dem Buchstaben „b“ der Gruppen 1 und 2 blieben unbehandelt.

### **Gruppe 1: Hochdruckbehandlung mit 300 MPa**

Am Tag 2 nach ihrer Gewinnung wurde jeweils die 2. Sehne des Sehnenpaares mit 300 MPa über 20 min. bei 20°C hochdruckbehandelt. Dazu wurden die Sehnen einzeln in Ringer-Lösung eingelegt und vakuumverschweißt. Die Druckaufbauzeit und Druckabbauzeit betragen jeweils 3 min., sodaß 100 MPa pro min. auf- bzw. abgebaut wurden.

Am Tag 3 wurde jede **frisch** Sehne zweimal bis 400 N vorbelastet, und erst beim dritten Mal erfolgte die Belastung bis zum Versagen.

Eine wiederholte Dehnung im Hook'schen Bereich bietet dann das Bild eines viskoelastischen Verhaltens in Form einer unveränderten Kraft-Längenänderungs-Kurve.

In diesem Bereich nimmt die Welligkeit der Fibrillen ab, kehrt aber vollständig zurück, solange der Bereich der Verformung in der Kraft-Längenänderungs-Kurve noch nicht erreicht ist. Durch Dehnung im Hook'schen Bereich lassen sich die Kollagenfasern zu größerer Regelmäßigkeit ausrichten, ohne daß eine irreversible Verformung, die durch zunehmende Fibrillenabrisse gekennzeichnet ist, eintritt. Diese Ausrichtung der Kollagenfaserbündel läßt sich besonders nach dem 1. Vordehnen an der größer werdenden Steigung der Kraft-Längenänderungs-Kurve darstellen. Dies bedeutet biomechanisch eine Zunahme des E-Moduls, bzw. eine Zunahme der Steifigkeit der Sehne (Siebels et al., S. 18, 19).

Das Vordehnen wird üblicherweise als „precondition“ z. B. mit 10 Zyklen im Rahmen von zyklischen Testverfahren angewandt (Kitamura et al., S. 910) oder mit 200 Zyklen als „precondition“ eines Zugversuches (Stäubli et al., S.27).

### **Gruppe 2: Hochdruckbehandlung mit 600 MPa**

Am 2. Tag erfolgte die Hochdruckbehandlung jeweils einer Sehne des Sehnenpaares mit 600 MPa über 20 min. bei 20°C. Für die Hochdruckbehandlung wurden sie wieder einzeln in Ringer-Lösung gelegt. Die Auf- bzw. Abbaupzeit betrug 6 min., d.h. es wurden wieder 100 MPa pro min. auf- bzw. abgebaut.

Im Unterschied zur Gruppe 1 wurden die Sehnen nun 5 Tage bei -20°C **eingefroren** (Racce et al., S. 1208).

Am 7. Tag nach der Gewinnung wurden sie biomechanisch getestet, indem die Sehnen bis zum Versagen im Zugversuch belastet wurden. Hierbei erfolgte keine Vorbelastung der Sehnen im Gegensatz zur Gruppe 1.

Graphisch ist der Versuchsablauf in der folgenden Abb. 1 dargestellt.

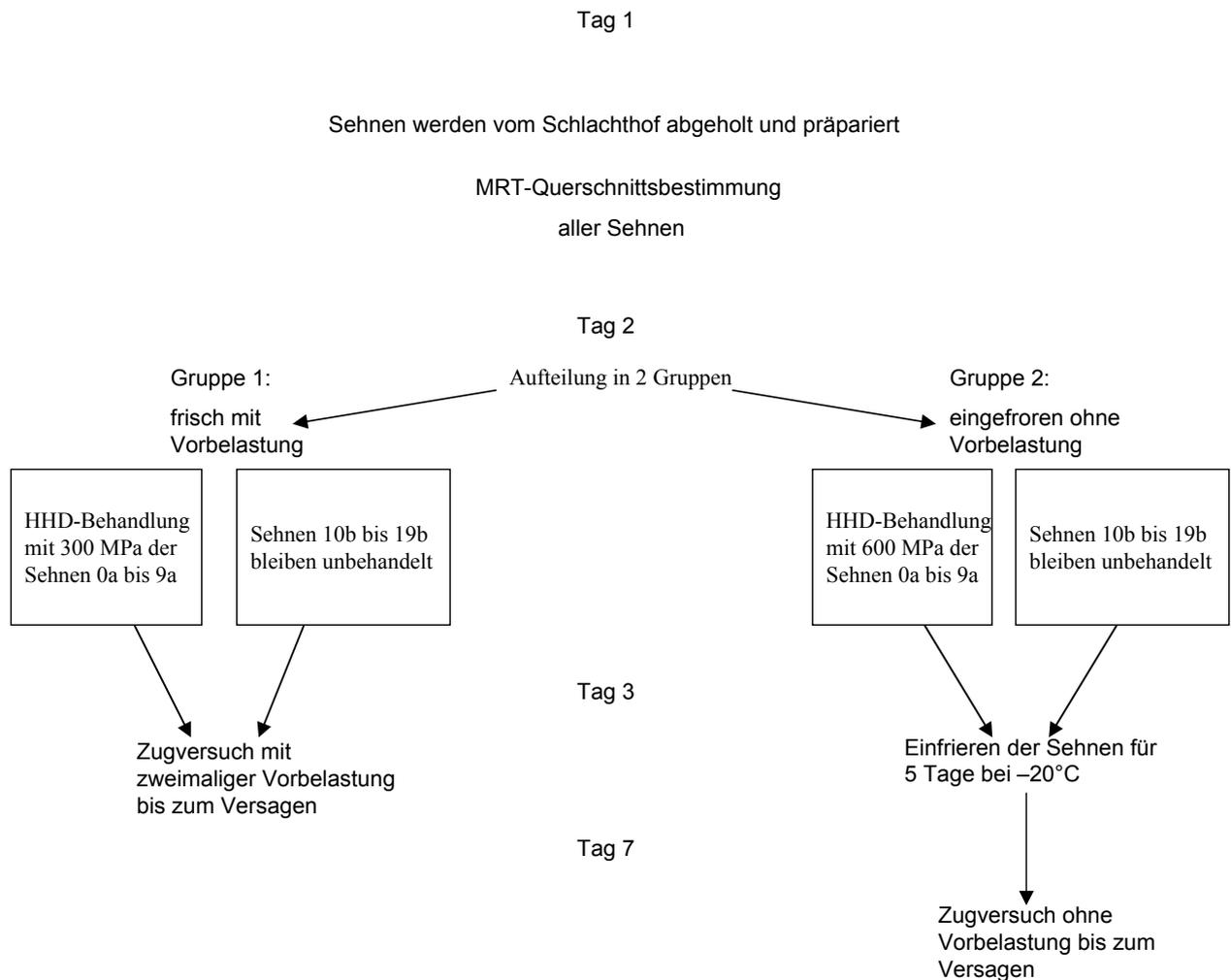


Abb. 1: Prüfprotokoll

Folgende Fragestellungen wurden erarbeitet:

- 1) Auswirkung einer HHD-Behandlung mit 300 MPa auf die biomechanischen und strukturellen Eigenschaften von Sehnen
- 2) Auswirkung einer HHD-Behandlung mit 600 MPa auf die biomechanischen und strukturellen Eigenschaften von Sehnen
- 3) Auswirkungen der Tiefgefrierens bei  $-20^{\circ}\text{C}$  auf die biomechanischen Eigenschaften der Sehnen in der Gruppe 2.
- 4) Auswirkungen der zweimaligen Vorbelastung auf die biomechanischen Eigenschaften der Sehnen in der Gruppe 1.

Die biomechanischen Eigenschaften wurden mit der Durchführung eines Zugversuches bis zum Versagen erfaßt, für die Darstellung etwaiger struktureller Veränderungen wurden Kollagen 1 und Versican immunhistochemisch markiert.

### 2.3. Vorversuche: Bestimmung des Sehnenquerschnitts

Es stellte sich die Notwendigkeit einer **exakten Querschnittmessung** der Sehnen, da dieser Wert für eine Berechnung der Materialparameter, wie z.B. der Reißfestigkeit, nötig ist. Im Gegensatz zur Ultrasonographie bot sich das MRT als genauere Meßmöglichkeit an, mit der sich Querschnittsbilder in guter Auflösung anfertigen ließen, da es einen besseren Weichteilkontrast besitzt.

In Anlehnung an eine Studie von Noguchi et al., in der die Sehnen in ein Wasserbad mit Kontrastmittel gelegt und unter definierten Zug von 0,29 N (30 g) gebracht wurden, konnte der Querschnitt mittels Sonographie dargestellt und schließlich über die Summe der Pixels ermittelt (Noguchi et al., S.248).

Die Vorrichtung dieser Studie zur Vordehnung orientierte sich an der oben genannten Arbeit, doch zur Bildgebung wurde das MRT angewendet. Hier konnte die Sehningrenze, die sich in mehreren Graustufen darstellte, sehr gut vom umgebenden mit Kontrastmittel versetztem Wasser abgegrenzt werden. Das Peritendineum wurde zuvor sorgfältig durch Präparation entfernt.

In den Vorversuchen wurden mehrere Methoden der Querschnittsmessung gegenübergestellt.

Zum einen die Methode der **manuellen Messung** (Stäubli et al., S. 29) gegenüber der Darstellung des Querschnitts durch das **MRT** und Berechnung des Sehnenquerschnitts einerseits als Anzahl der **Pixel**, andererseits durch Anwendung der **Ellipsen-Formel**.

Verfahren, die den Sehnenquerschnitt nach Anfertigung von Silikonabdrücken ermitteln sind zum einen sehr aufwendig und beinhalten auch die Möglichkeit einer Schrumpfung des Silikonabdruckes. (Racce et al., S. 1209)

Für die Vorversuche wurden 3 Sehnen für den Vergleich der Methoden, manueller Messung versus MRT-Messung, Berechnung über Auszählung der Pixel und unter Annahme einer Ellipsen-Form des Sehnenquerschnitts, präpariert und jeweils an 5 Stellen der Sehnenquerschnitt berechnet.

#### **Vorgehen:**

Der Sehnenquerschnitt wurde an 5 verschiedenen Stellen einer Sehne auf 3 Arten berechnet.

- 1) manuelle Messung, Kap. 2.3.1.
- 2) MRT-Messung und Bestimmung der Pixel
- 3) MRT-Messung mit Bestimmung der großen und kleinen Achse mittels Adobe Photoshop und Berechnung des Querschnitts unter der Annahme einer Ellipsen-Form, Kap. 2.3.2.

### 2.3.1. Vorgehen der Messung des Sehnenquerschnittes mittels manueller Messung

- Die Sehnen wurden zwischen zwei **Glasplatten** gelegt und mit einer definierten Federkraft durch Klemmen **zusammengepreßt**.
- An **n=5 Stellen**, die im Bereich der freien Einspannlänge des späteren Zugversuchs liegen, wurden mit der **Bügelmeßschraube**, siehe Abb. 3, (Meßgenauigkeit von 0,01mm, Nr. 102-101 N, Serien Nr. 6283401, Mitutoyo, Japan) die Dicken der Sehnen samt Glasplatten gemessen, wobei die Dicken der Glasplatten später subtrahiert wurden. Der Vorteil der Bügelmeßschraube bestand darin, daß der Untersucher solange zuschraubt, bis der Druckpunkt der Bügelmeßschraube erreicht ist und ein weiteres Zuschrauben in einen Leerlauf mündet. Erst dann wurde der Meßwert abgelesen. Somit ließen sich Fehler durch unterschiedlich kräftiges Zudrehen vermeiden.
- An den selben Stellen, an denen mit der Bügelmeßschraube zuvor die Dicke gemessen wurde, wurde mit dem **Meßschieber**, siehe Abb. 4, (Meßgenauigkeit 0,05 mm, Code Nr. 500-123U, Model Nr. CD-15B, Serien Nr. 307971, Mitutoyo, Japan) die Breite durch die Glasplatten abgegriffen
- Die Berechnung des **ovalen Querschnittes** erfolgt durch die **Formel**:

$$\text{Gesamtfläche } A = A_r + A_k$$

$A_r$ : Rechteckfläche

$A_k$ : Kreisfläche

$$A_r = l_2 \cdot b$$

$l$ : gemessene große Achse der Sehne

$b$ : gemessene kleine Achse

$$l_2 = l - b$$

$$A_k = (b/2)^{2\pi}$$

Die Abbildung 2 zeigt wie sich die Gesamtfläche aus  $A_r$  und  $A_k$  zusammensetzt.

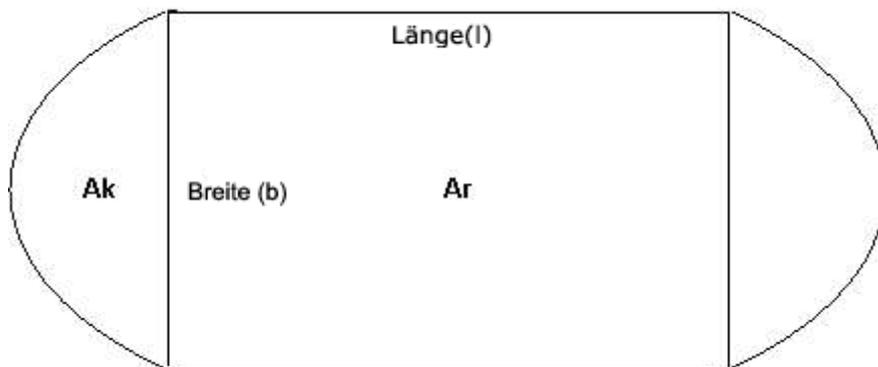


Abb.2: Berechnung der Gesamtfläche aus Ar und Ak

Die Abbildung 3 zeigt das Vorgehen bei der Manuellen Messung. Hier wird die Sehne zwischen 2 Glasplatten geklemmt und bei immer gleichem Anpreßdruck werden mit Hilfe eines Meßschiebers und einer Bügelmeßschraube die Länge und die Breite abgemessen.

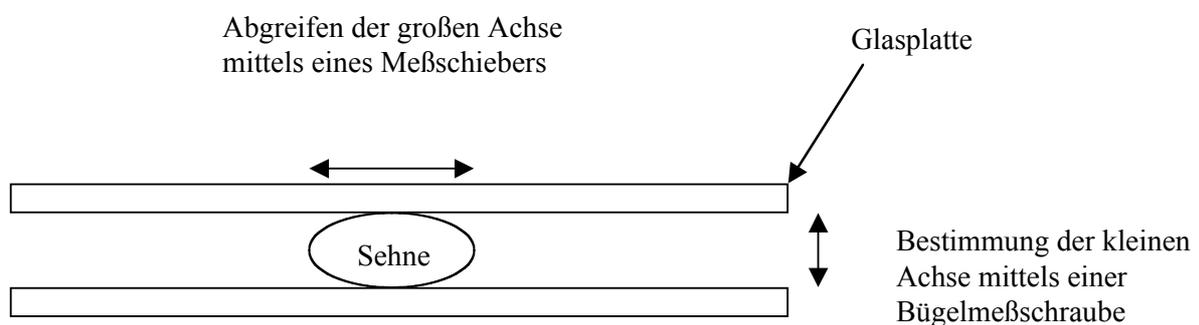


Abb. 3: Manuelle Messung mittels Bügelmeßschraube und digitalem Meßschieber

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die verwendeten Meßgeräte, die Bügelmeßschraube in Abb. 4 und den Meßschieber in Abb. 5.



Abb. 4: Bügelmeßschraube

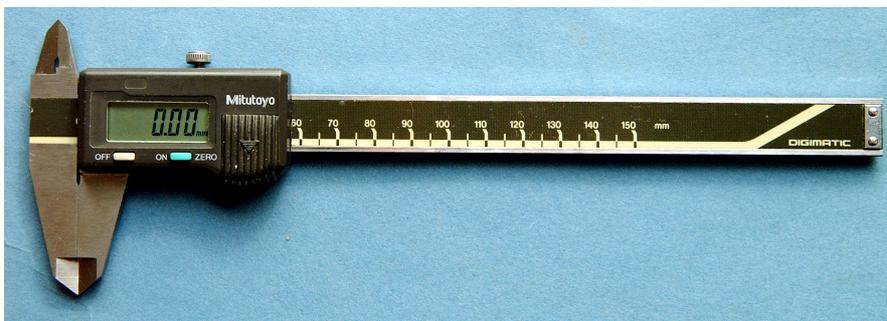


Abb. 5: digitaler Meßschieber

### **2.3.2. Vorgehen bei der MRT-Messung und Berechnung des Sehnenquerschnitts durch die Bestimmung der Anzahl der Pixel**

Für die Messung der Sehnenquerschnitte mit dem MRT (ASCNT 1,5 Tesla, Philips, Best Niederlande), die unter einem **definiertem Zug** (Noguchi et al., S. 248) stattfinden sollte, wurde eigens eine Kunststoffvorrichtung zum Aufbringen der Spannung angefertigt, siehe Abb. 5, Metallgegenstände wurden vermieden, da durch diese Messung ein Magnetfeld aufgebaut wird und somit durch metallene Gegenstände die Messung gestört werden könnte. Auch die Einspannung der Sehne war aus Kunststoff, siehe Abb. 6.

- Die Sehnen wurden in einem mit destilliertem Wasser und **Kontrastmittel** gefüllten Behälter mit einer Kraft von ca. 2,943 N (300 g) vorgespannt. Das Mischungsverhältnis des Kontrastmittels Magnevist® (Fa. Schering) zu Wasser war 1:100. Die Signale wurden von einer Kniequadraturspule (Fa. Philipps, Best Niederlande) mit 17 cm Innendurchmesser und 22 cm Länge aufgenommen.
- Die MRT-Schnitte, T1-gewichtet, wurden an die gleiche Stelle gelegt, an der auch vorher die Messung mit der Bügelmeßschraube durchgeführt wurde.

- Einstellungen des MRT
  - Auflösung: 0,2 mm
  - Schichtdicke: 3mm
  - FOV: 100 mm
  - Matrix: 512
  - Flippwinkel: 90°
  - TE: 40
  - TR: 580
  - Meßdauer: 3 min. 10 sek.
- Die Auswertung erfolgte mit Adope Photoshop (Version 7.0.1), indem die Querschnittsfläche markiert wurde und die **Anzahl der Pixel** in [mm<sup>2</sup>] umgerechnet wurde.

In der folgenden Abbildung ist die Kunststoffkonstruktion zu sehen, die für die MRT-Darstellung entwickelt wurde. Die Abb. 6 zeigt die Vorspannvorrichtung, in der die Sehnen mit 300 g gespannt und in ein Gemisch aus Wasser und Kontrastmittel gegeben wurden.

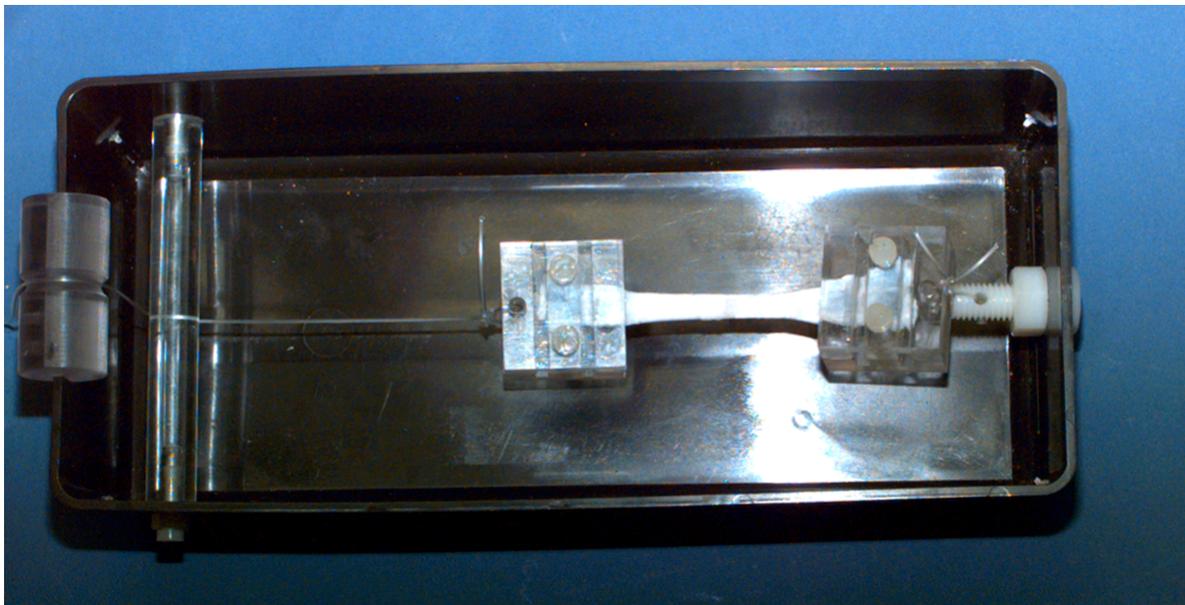


Abb 6.: Einspannvorrichtung aus Kunststoff zur Vorspannung der Sehnen mit 300 g für die MRT-Messung

Auch die Klammern für die MRT-Messung waren aus Kunststoff, siehe Abb. 7.



Abb. 7: Kunststoffklemmbaken für die MRT-Messung

### 2.3.3. MRT-Berechnung der große und kleinen Achse und Bestimmung des Sehnenquerschnitts mittels Ellipsen-Formel

Nachdem die MRT-Aufnahme wie in Kap. 2.3.2 beschrieben erfolgte und ausgewertet wurde, wurde anhand des MRT-Bildes des Sehnenquerschnitts mit Adobe Photoshop (Version 7.0.1.) unter der Annahme einer Ellipsenform des Sehnenquerschnitts, die große Achse und kleine Achse des Sehnenquerschnitts ausgemessen und der Sehnenquerschnitt mit folgender Formel berechnet.:

- $A_e = \pi \cdot a \cdot b$

$A_e$ : Fläche der Ellipse

$a$ : große Achse der Ellipse

$b$ : kleine Achse der Ellipse

$\pi$ : Kreiszahl

Die folgende Abbildung zeigt eine beschriftete Ellipse.

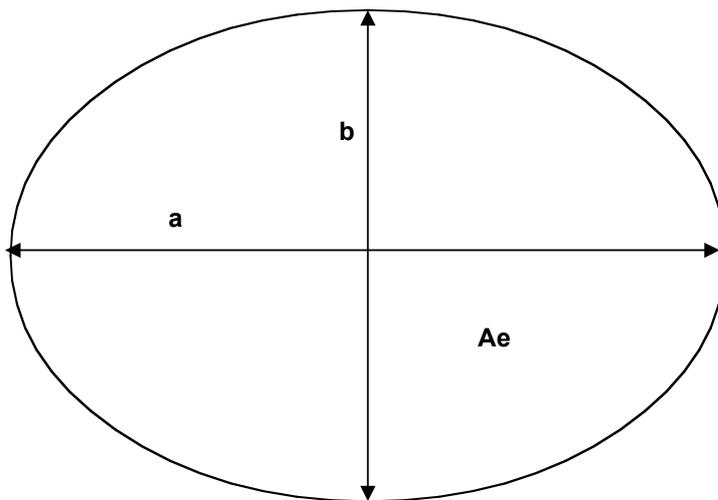


Abb. 8: Modell für die Berechnung des Sehnenquerschnitts unter der Annahme einer Ellipsen-Form

## **2.4. Hydrostatische Hochdruck-Behandlung**

Zur Hochdruckbehandlung diente eine Anlage mit externer Druckerzeugung (Fa. Dunze AAD – Hochdrucktechnik, Bad Homburg). Die Gesamtanlage gliedert sich in zwei verschiedene Baugruppen, dem eigentlichen Druckerzeuger und dem zum Behandeln der Probe dienenden Druckbehälter, dem Autoklaven.

Das Nutzvolumen des Hochdruckautoklaven beträgt 1,3 l bei einem Innendurchmesser von 65 mm. Der maximal erreichbare Druck liegt bei 800 MPa.

Das zur Kompression verwendete, druckübertragende Medium ist ein Gemisch aus Glykol, Wasser, Ethanol und Additiven (Schmierstoffen). Es wird mit Hilfe einer pneumatischen Vorfüllpumpe auf einen Vordruck von ca. 30 bis 40 MPa gebracht. Die Vorfüllpumpe, die mit Druckluft von 1 MPa betrieben wird, dient gleichfalls zum Entlüften des Autoklaven.

Im eigentlichen Hochdruckprozess wird dann ein Hydrauliköl, das sich in einem zweiten Leitungssystem befindet, mit einer Hydraulikpumpe auf den gewünschten Druck komprimiert. Mit Hilfe eines Druckübersetzers, der mit einem Übersetzungsverhältnis von 1:50 arbeitet, wird dann der Druck über das druckübertragende Medium auf die Sehne übertragen.

Die Regelung des Druckniveaus, der Druckauf- bzw. -abbauzeit und der Haltezeit erfolgt rechnergesteuert.

In Abbildung 9 ist die Hochdruckanlage schematisch abgebildet.

Autoklav Druckübersetzer Hydraulikaggregat Pneumatische Vorfl

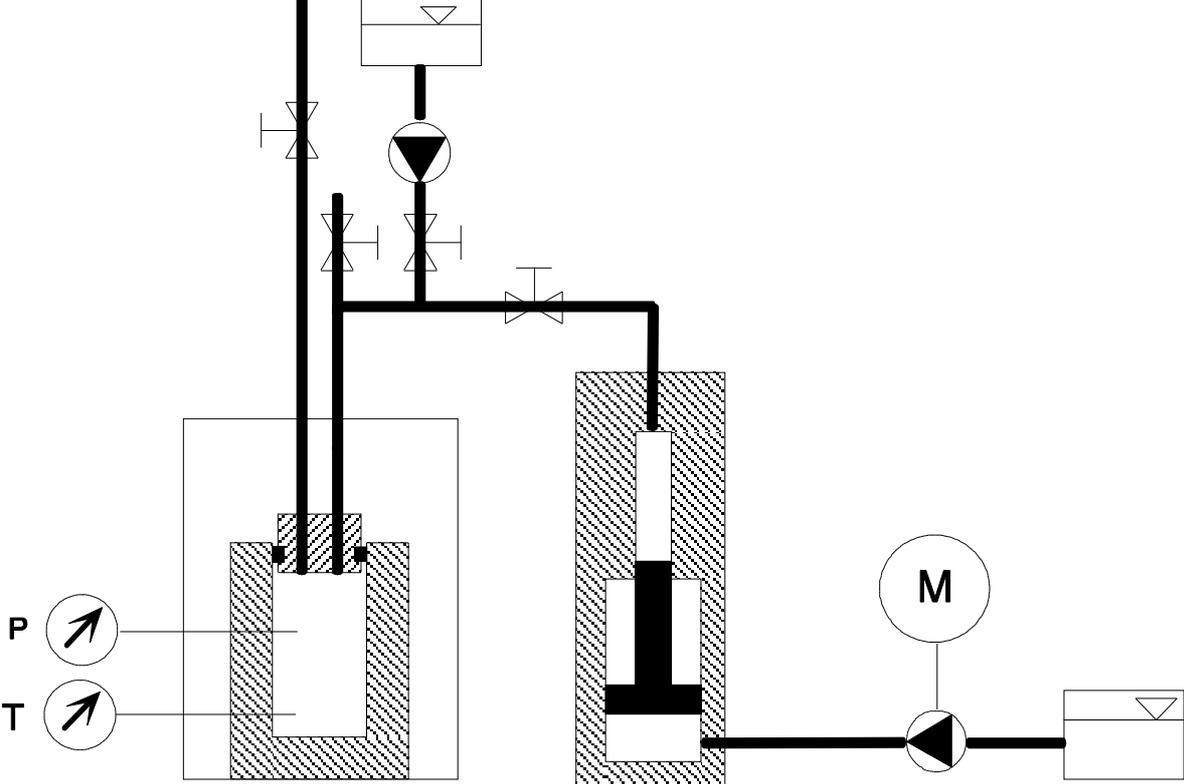


Abb. 9: schematische Darstellung der Hochdruckanlage

## 2.5. Testung der Sehnen im Zugversuch

### 2.5.1. Biomechanische Parameter

Um eventuelle Einflüsse der Hochdruckbehandlung auf die mechanische Belastbarkeit der Sehnenpräparate objektiv meßbar zu machen, wurden die Sehnen nachdem sie einem Druck von 300 MPa bzw. 600 MPa ausgesetzt wurden, in einem biomechanischem Zugversuch getestet. Dazu wurden sie mittels Halterungen eingespannt und mit einer **Universalprüfmaschine** getestet. Hierbei wurden die **biomechanischen Eigenschaften** unter reproduzierbaren Bedingung untersucht.

Während der Prüfung werden stets die Prüfkraft, sowie die Position der Maschinentraverse gemessen und in Form eines Kraft-Weg-Diagramm dargestellt.

Aus diesem Diagramm sind folgende Kennwerte und **Meßgrößen** bestimmbar:

- Längenänderung  $\Delta L$  [mm]: Differenz zwischen der freien Einspannlänge  $L_0$  und der Länge, welche die Sehne beim Beginn des Versagens hat.
- Maximale Kraft:  $F_{\max}$  [N] : die Kraft, die im Augenblick des Risses auf die Sehnenprobe einwirkt.
- Kraft  $F$  [N] am Ende (linearen Abschnitt der Kraft-Weg-Kurve)

Mit den gemessenen Größen wurden folgende **Materialparameter** berechnet:

- Zugfestigkeit: Widerstand gegen den Riss bei statischer Beanspruchung unter der Berücksichtigung des Probenquerschnitte  $A$ . Sie entspricht der maximalen Spannung.  
Zugfestigkeit =  $F_{\max} / A$  [N/mm<sup>2</sup>]  
 $A$ : berechneter Sehnenquerschnitt [mm<sup>2</sup>]  
 $F_{\max}$  : maximale Kraft
- Elastizitätsmodul: Maß für die Elastizität der Proben im Hook'schen Bereich. Die Dehnbarkeit eines elastischen Körpers drückt sich durch den E-Modul aus. Dehnt sich die Sehne, so steigt auch die Spannung proportional in ihrem Inneren an. Dieser Proportionalitätsfaktor ist der E-Modul und gilt nur für den Hook'schen Bereich der Reißkurve (Hook'sches Gesetz).

E-Modul = Steifigkeit x  $L_0/A$  [N/mm<sup>2</sup>]

Steifigkeit:  $F/\Delta L$  [N/mm]

$L_0$ : Einspannlänge [mm]

A: berechneter Sehnenquerschnitt [mm<sup>2</sup>]

oder

E-Modul= Spannung/Dehnung

Spannung (Festigkeit) =  $F/A$  [N/mm<sup>2</sup>]

Dehnung =  $(\text{aktuelle Länge} - L_0)/L_0$  [%]

Werden nun die E-Modul-Werte größer, so bedeutet das eine Zunahme der Steifigkeit bzw. eine Abnahme der Elastizität der Sehnen.

Zur statistischen Auswertung wurden die biomechanischen Parameter Zugfestigkeit und E-Modul gewählt, da diese Parameter die Sehneneigenschaften am besten beschreiben.

### **2.5.2. Prüfverfahren**

Durchgeführt wurden die **Zugversuche** mit einer Universalprüfmaschine (Typ 1120, Fa. Zwick, Ulm), siehe Abb. 8. Dabei wurde ein Kraftaufnehmer (Typ KAP-S/2kN Zwick, Ulm) verwendet. TestXpert (Version 8.1) war die verwendete Software, mit der die Maschinensteuerung sowie die Erfassung und Bearbeitung der Meßdaten durchgeführt wurde. Einzustellende Prüfparameter waren die freie Einspannlänge mit 40 mm, die Vorkraft mit 20 N, die Prüfgeschwindigkeit mit 200 mm/min. und die Kraftabschaltswelle mit 80% von  $F_{\max}$ .

Die Errechnung des E-Moduls erfolgte im Bereich zwischen 300 und 400 N, einem Bereich, der sich in den Vorversuchen als linear darstellte und in dem deshalb die Hook'schen Gesetze zur Berechnung des E-Moduls gelten.

Die Abbildung 10 zeigt eine Sehne, die für den Zugversuch in der Universalprüfmaschine eingespannt ist.

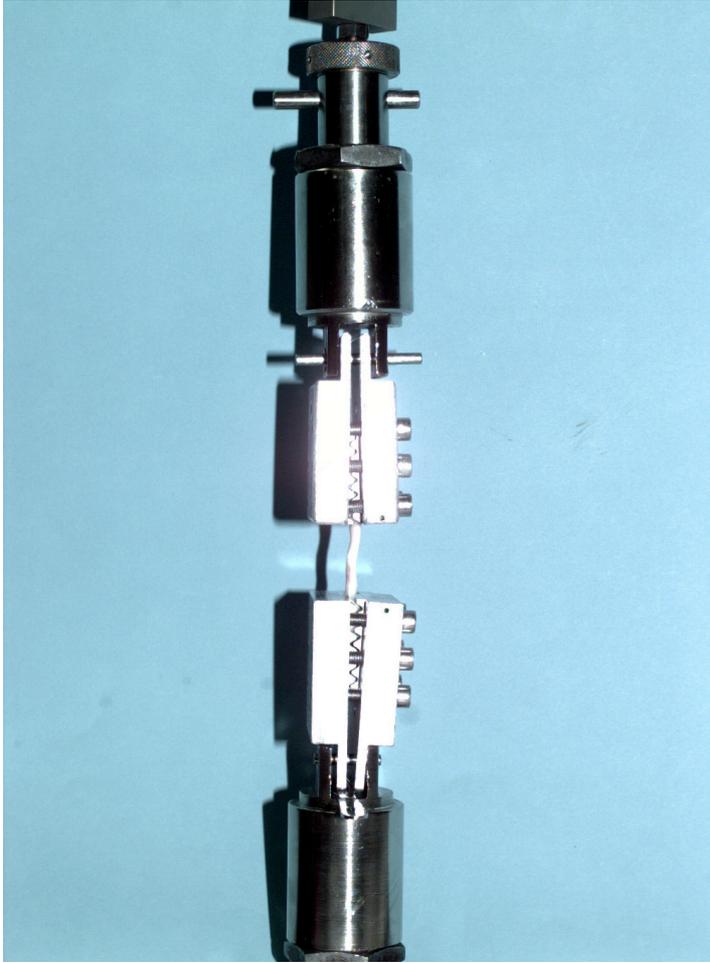


Abb. 10: Einspannung der Sehne in die Universalprüfmaschine vor dem Zugversuch

### **2.5.3. Einspanntechnik**

Die Kraftübertragung auf die Sehnen erfolgte durch zwei Klemmbacken. Ähnlich der Vorrichtung, die sich in Versuchen für humane Achillessehnen bewährte (Franke et al., S. 24ff). Für die Schweinesehnen wurden ebenfalls Klemmbacken verwendet, doch in etwas kleinerer Ausführung, da hier die zu erwartenden maximalen Kräfte nicht so groß waren, siehe Abb. 9 und 10. Die Auflagefläche der Halterungen war 4 cm lang und 3 cm breit. Insgesamt betrug die Länge der Halterungen 8 cm und die Breite 5,5 cm. Die Sehnen wurden mit 6 Schrauben pro Halterungsvorrichtung verspannt und mit einem Drehmomentschlüssel wurden die Schrauben bis auf 5 N/m angezogen. Durch die 3 Schraubenpaare soll sich der Druck gleichmäßiger auf den fixierten Anteil der Sehne verteilen und eine übermäßige Krafteinleitung am Übergang der Einspannung zur freien Sehne verhindert werden. Einem Entstehen einer Sollbruchstelle soll dadurch entgegengewirkt werden.

In der Abbildung 11 und 12 sind die Klemmbacken abgebildet, die für den Zugversuch verwendet wurden.

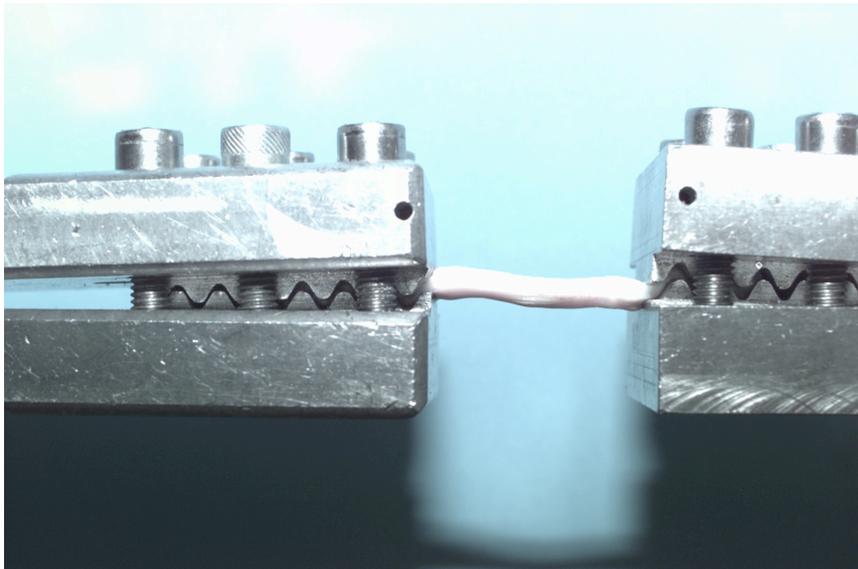


Abb. 11: Klemmbacken für den Zugversuch mit 6 Schrauben pro Halterungsvorrichtung

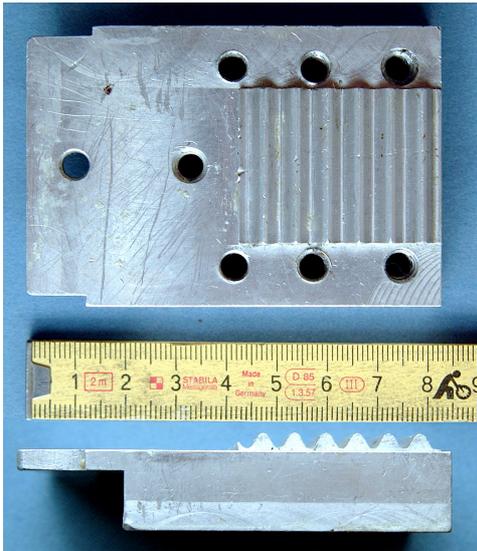


Abb. 12: Klemmbacken

## **2.6. Histologischer Kollagen- und Proteoglykannachweis**

Die Proben für die **immunhistochemische Untersuchung** wurden nach der Hochdruckbehandlung direkt aus der Kammer entnommen und in 90%igem Methanol fixiert, bzw. die Proben der nicht hochdruckbehandelten Kontrolle sofort nach der Präparation in 90%igem Methanol fixiert und zunächst bei 4°C im Kühlschrank über Nacht und am nächsten Tag bei –20°C aufbewahrt.

Ziel der Untersuchung war es, mögliche Unterschiede bezüglich der immunhistochemische Markierung zwischen der hochdruckbehandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrollsehne aufzudecken. Ursachen hierfür könnte z. B. eine Änderung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine sein.

### **2.6.1. Vorgehen:**

- Vorbereitung der eingefrorenen Sehnen für das Kryomikrotom:  
⇒ Einlegen der Proben in 5%ige Glukoselösung in PBS für 2 h
- Anfertigen der Gefrierschnitte mit dem Kryomikrotom und anschließendes Einfrieren der geschnittenen Präparate
- Auftauen der Präparate und immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I und Versican mit anschließender Kernfärbung mit Hämatoxylin

Siehe Kap. 8.3. immunhistochemisches Protokoll.

### **2.6.2. Auswahl der Kollagene und Proteoglykane**

Ein typisches Merkmal der faserreichen Bindegewebe ist das Vorkommen von Kollagen Typ I. Kollagen Typ I ermöglicht es den Sehnen und Bändern großen Zugspannungskräften zu widerstehen (Schlüter et al., S.51).

Weiter ist ein charakteristisches Proteoglykan der Zugsehnen vor allem das Versican. Es ist ein großes chondroitinsulfathaltiges Proteoglykan der extrazellulären Matrix, das von Fibroblasten sezerniert wird und vermutlich an der Interaktion zwischen Zelloberflächen-Glykoproteinen und Bestandteilen des Extrazellularraums beteiligt ist (Schlüter et al., S.56).

### **2.6.3. Vorbehandlung der Präparate**

Nachdem die Proben aus dem Gefrierschrank genommen wurden, wurden sie für 2 h in 5% Glukoselösung eingelegt.

#### **2.6.4. Anfertigen der Schnitte mit dem Kryomikrotom**

Das Schneiden der Präparate wurde mit dem Kryomikrotom (Microm Kryomikrotom, HM500 OMV, Microm, Walldorf, Germany) durchgeführt.

Zuerst wurden die Präparate auf Objektischchen aufgebracht und mit Hilfe eines Einbettmediums, dem „Tissue freezing medium®“ der Firma Jung, auf den Schnellgefrierplatten im Kühlraum des Gerätes auf die Objekthalter aufgefroren. Wichtig war es, daß der ganze Block vor dem Schneidevorgang eine Bearbeitungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  bis  $-22^{\circ}\text{C}$  erreicht hatte.

Danach wurden die Objekthalter mit den Präparaten in Schneideposition gebracht.

Nachdem zuerst einige Schnitte mit der Schnittstärke von 55-65  $\mu\text{m}$  (Trimschnitt) in Längsrichtung der Sehne abgetragen wurden, konnten in der Tiefe der Sehne Schnitte von einer Stärke mit 12  $\mu\text{m}$  gewonnen und auf Objektträger aufgezogen werden.

Diese Objektträger wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **2.6.5. Immunhistochemischer Nachweis**

Kollagen Typ I und Versican wurden mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen.

Zur Demaskierung der Epitope wurden die Präparate mit Enzymen vorbehandelt. Für Kollagen 1 kam die Kombination von Hyaluronidase (1,5U/ml, Sigma) + Chondroitinase ABC (0,25U/ml, Sigma) mit einer 30-minütigen Inkubation der Schnitte bei  $37^{\circ}\text{C}$  zur Anwendung. Der Nachweis für Versican erforderte nur die Vorbehandlung mit Chondroitinase ABC (0,25U/ml). Alle spezifischen Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer.

Der Nachweis der Primärantikörper erfolgte mit Hilfe des „Vectastain ABC – „Elite“ – Avidin – Biotin – Peroxidase Kit“ der Firma Vector (Burlingame CA 94010, USA). Das zugrundeliegende Funktionsprinzip beruht auf der Bindung eines biotinylierten Sekundärantikörpers am Primärantikörper. Durch die hohe Affinität des Glykoproteins Avidin zum Vitamin Biotin ist es nun möglich, ein ebenfalls biotinyliertes Peroxidasmolekül über die vier Bindungsstellen des Avidins an den Antikörperkomplex zu binden. Nach Zugabe eines geeigneten Chromogens (DAB) erkennt man lichtmikroskopisch einen graubraunen Farbniederschlag.

Zum Schluss wurde die Gegenfärbung (Kernfärbung) mit Mayer`schem Hämatoxylin durchgeführt. Danach wurde mit Leitungswasser differenziert und über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%-80%-90%-100%) entwässert und nach 2 Fraktionen mit Xylol mit Eukit eingedeckt. (Schlüter et al., S. 14) (Boszczyk et al., 2001, S. E 338ff) (Milz et al., 1998, S. 264)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vorversuche: Vergleich der Querschnittsmessungen

Wie im Kapitel 2.3. beschrieben, wurden Vorversuche durchgeführt, in denen Methoden der Querschnittsbestimmungen gegenübergestellt wurden.

- **Manuelle Messung:** mit Abmessen der großen und kleinen Achse der Ellipse mittels Bügelmeßschraube und Schieblehre
- Anfertigung eines **MRT-Bildes des Sehnenquerschnitts:**
  - a) **MRT (Ellipse):** Abmessen der großen und kleinen Achse mit Adope Photoshop und Berechnung der Sehnenfläche mit der Ellipsen-Formel
  - b) **MRT (Pixel):** Auszählen der Pixel im Adope Photoshop mit nachfolgender Berechnung der Sehnenfläche

Die Tabelle 3 stellt die Querschnittsberechnungen der 3 Methoden gegenüber. An den drei Sehnen V1, V2 und V3 wurden an fünf Stellen der Querschnitt mit den drei vorher beschriebenen Methoden MRT (Pixel), MRT (Ellipse) und Manueller Messung berechnet.

Tab. 1: Ergebnisse der Berechnungen der Sehnenquerschnitte

	Querschnitt [mm]		
	MRT (Pixel)	MRT (Ellipse)	Manuelle Messung
Sehne V1	13,9	13,6	17,4
	13,7	13,6	19,6
	14,1	11,7	18,1
	14,5	13,6	16,9
	14,4	13,7	13,5
Sehne V2	13,4	11,9	13,2
	13,2	11,7	12,9
	12,9	11,4	12,7
	13,5	12,0	10,5
	15,1	17,9	14,8
Sehne V3	19,5	17,9	20,4
	20,4	18,9	19,8
	18,4	16,6	18,3
	18,6	17,4	18,3
	17,4	14,7	18,6
Mittelwert	15,5	14,4	16,3

Vergleicht man die Mittelwerte der unterschiedlichen Querschnittsberechnungen miteinander so ergeben sich folgende Abweichungen in [%] der Berechnung mit MRT (Ellipse) bzw. Manueller Messung von Berechnung mit MRT (Pixel):

- Vergleich der Messungen: MRT (Ellipse) vs. MRT (Pixel): Abweichung: 10%
- Vergleich der Manuellen Messung vs. MRT (Pixel): Abweichung: 12%

Durch die Zugabe von Kontrastmittel bei der MRT-Darstellung wurde der Weichteilkontrast erhöht. Dies sollte die Genauigkeit bei der Auswahl der Pixel, die zum Sehngewebe gehören, erhöhen.

### 3.2. Ergebnisse der Querschnittsmessungen

Aus der nachfolgenden Tabelle 2 lassen sich die **Querschnitte der Sehnenpaare** beider Versuchsgruppen (300 und 600 MPa) entnehmen. Die Querschnitte wurden, wie in Kapitel 2.3. beschrieben, mit der Methode **MRT (Pixel)** berechnet. Die Sehnen aus der 300 MPa-Gruppe sind von 0 bis 9 durchnummeriert. Der Median liegt bei 23,4 mm<sub>l</sub> (Streuung 17,9 mm<sub>l</sub> bis 25,1 mm<sub>l</sub>). Der Median der zugehörigen Kontrolle liegt bei 21,8 mm<sub>l</sub> (Streuung 18,7 mm<sub>l</sub> bis 25,8 mm<sub>l</sub>). In der 600 MPa-Gruppe lag der Median des Querschnitts bei 19,2 mm<sub>l</sub> (Streuung 15,9 mm<sub>l</sub> bis 26,1 mm<sub>l</sub>). Die zugehörigen unbehandelten Kontrolle wiesen einen Median von 18,5 mm<sub>l</sub> (Streuung 12,1 mm<sub>l</sub> bis 21,6 mm<sub>l</sub>). Der hohe Querschnittswert der Sehne 0b kam insofern zustande, daß sich die Achillessehne bei der Präparation nicht von den tiefen Flexoren trennen ließ. Aus diesem Grund ist der Querschnitt doppelt so groß, wie bei den übrigen präparierten Sehnen, wo dieses Problem nicht auftrat. Daher wurde das Sehnenpaar 0a und 0b aus der statistischen Auswertung genommen.

Tab. 2: Querschnittsflächen der Sehnenpräparate berechnet aus der Summe der Pixel

Querschnitte [mm <sub>l</sub> ]					
Proben	300 MPa	Kontrollen	Proben	600 MPa	Kontrollen
(0	25,3	48,5)	10	15,9	17,2
1	23,4	18,7	11	20,1	19,3
2	24,1	25,4	12	19,5	20,6
3	24,9	19,0	13	17,1	17,8
4	23,7	25,8	14	26,1	19,4
5	17,9	22,1	15	17,5	16,7
6	22,1	23,2	16	19,0	20,0
7	25,1	20,4	17	18,5	17,4
8	20,6	18,7	18	19,5	21,6
9	18,4	21,8	19	21,1	12,1
Median	23,4	21,8	Median	19,2	18,5
Max	25,1	25,8	Max	26,1	21,6
Min	17,9	18,7	Min	15,9	12,1
Mittelwert	22,2	21,7	Mittelwert	19,4	18,2
Standardabw.	2,7	2,7	Standardabw.	2,8	2,7

### 3.3. Ergebnisse der biomechanischen Prüfung

Um Sehnen miteinander zu vergleichen und eine Aussage über ihre mechanischen Eigenschaften treffen zu können, müssen **charakteristische Materialparameter** im Zugversuch ermittelt und gegenübergestellt werden. Der **E-Modul** sagt etwas über das Dehnungsverhalten der Sehne aus. D.h. je größer der E-Modul, desto steifer ist die Sehne. Der E-Modul wurde aus dem Bereich zwischen 300 und 400 N der Belastungskurve ermittelt. Ein anderer wichtiger Kennwert ist die **Zugfestigkeit**. Die Zugfestigkeit ist die maximale Spannung während einer einmaligen zerstörenden Belastung, bevor die Sehne in großen Arealen reißt, siehe Abb. 11. (Siebels et al., S19)

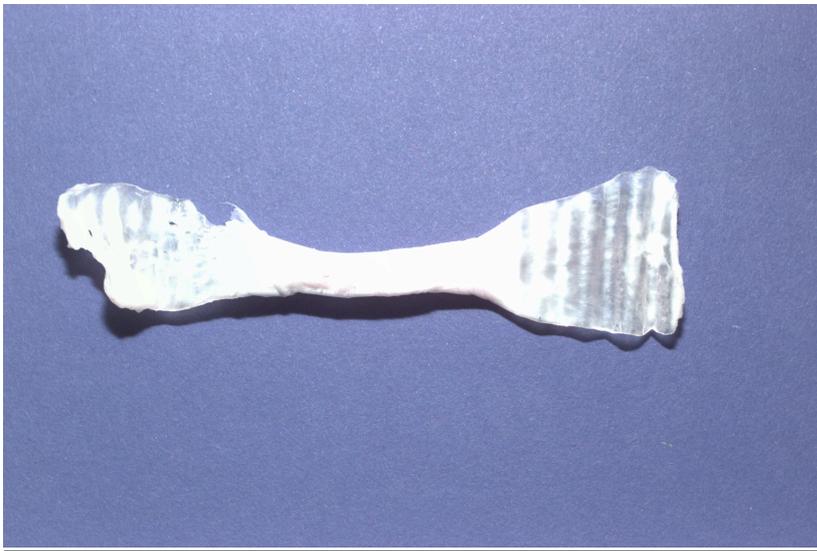


Abb. 13: Gerissene Sehne nach dem Zugversuch

Die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung wurden einer statistischen Analyse unterzogen, die mit dem Programm SPSS für Windows Version 10.0 durchgeführt wurde. Für die Testung der Ergebnisse wurde der **Wilcoxon-Test** für abhängige Stichproben angewandt.

Gemäß der HHD-Behandlung der Sehnen wurden folgende Gruppen festgelegt.

- Gruppe 1: 300 MPa
- Gruppe 2: 600 MPa

Die Gruppe 1 beinhaltete 9 Sehnen mit zugehöriger unbehandelter Kontrolle des gleichen Tieres, die Gruppe 2 beinhaltete 10 Sehnen mit zugehöriger unbehandelter Kontrolle des gleichen Tieres.

Die beiden HHD-Gruppen wurden getrennt statistisch analysiert.

Ein Tier war eine Beobachtungseinheit.

Die Sehne a eines Tieres wurde hochdruckbehandelt, die Sehne b des gleichen Tieres blieb unbehandelt.

In der statistischen Auswertung waren die biomechanischen Ergebnisse der behandelten Gruppe den Sehnen der unbehandelten Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Die **Variablen**, auf die eine Beobachtungseinheit hin untersucht wurde, waren:

- der E-Modul
- die Zugfestigkeit

Die **statistische Charakterisierung** erfolgte durch die Angabe bzw. Ermittlung:

- der Fallzahl
- des Mittelwerts
- der Standardabweichung
- des Medians
- des Maximums und des Minimums.

Die Auswahl des Tests erfolgte unter folgenden Gesichtspunkten:

Da die Ergebnisse nicht normalverteilt waren, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben gewählt. Abhängig sind die Proben deshalb, da sich die Variablen, die einander gegenübergestellt wurden, auf eine Beobachtungseinheit, ein Tier, bezogen.

Die statistische Fragestellung war zweiseitig, da nur getestet wurde, ob ein Unterschied besteht.

Formulierung der Hypothesen:

- H<sub>0</sub> (Nullhypothese): Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der hochdruckbehandelten Sehnen und den unbehandelten Sehnen.
- H<sub>1</sub> (Alternativhypothese): Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den hochdruckbehandelten Sehnen und den unbehandelten Sehnen.

Das Signifikanzniveau wurde mit  $\lambda = 0,05$  festgelegt.

### 3.3.1. E-Modul

Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt die ermittelten E-Modul-Werte, die für die statistische Analyse verwendet wurden. Von der statischen Untersuchung ausgeschlossen wurde das Sehnenpaar 0a/b, da bei der Präparation sich die Sehnen der Flexoren nicht von der Achillessehne trennen ließen und aus diesem Grund auch der E-Modul der Sehne 0b mit 163 N/mm<sub>2</sub> deutlich vom Mittelwert abwich. Die Sehnen 0a/b wurden auch nicht zur Berechnung der statistischen Werte miteinbezogen.

Tab. 3: E-Modul [N/mm<sub>2</sub>] hochdruckbehandelter Sehnen und deren Kontrollen

			E-Modul [N/mm <sub>2</sub> ]		
Proben	300 MPa	Kontrolle	Proben	600 MPa	Kontrolle
0	348	163)	10	456	338
1	333	369	11	266	280
2	358	284	12	314	279
3	287	386	13	328	248
4	340	237	14	256	263
5	424	256	15	329	339
6	328	318	16	313	327
7	369	321	17	323	303
8	333	371	18	300	285
9	357	381	19	273	409
Median	340	321	Median	314	294
Max	424	386	Max	456	409
Min	287	237	Min	256	248
Mittelwert	348	324	Mittelwert	316	307
Standardabw.	37	56	Standardabw.	56	47

Der Median des E-Moduls der **300 MPa-Gruppe** liegt bei 340 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 287 N/mm<sub>2</sub> bis 424 N/mm<sub>2</sub>). Der Median der zugehörigen unbehandelten Kontrolle liegt bei 321 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 237 N/mm<sub>2</sub> bis 386 N/mm<sub>2</sub>).

Der Median der **600 MPa-Gruppe** liegt bei 313 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 256 N/mm<sub>2</sub> bis 456 N/mm<sub>2</sub>). Die zugehörige unbehandelte Kontrolle weist einen Median von 294 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 248 N/mm<sub>2</sub> bis 409 N/mm<sub>2</sub>) auf.

Für die **statistische Analyse** wurden die mit 300 bzw. 600 MPa behandelten Sehnen mit der jeweils unbehandelten Kontrolle verglichen.

Für die Sehnen der **300 MPa** Gruppe erhält man kein signifikantes Ergebnis. Der p-Wert liegt bei 0,44 und ist größer als das Signifikanzniveau 0,05.

Stellt man die mit **600 MPa** hochdruckbehandelten Sehnen der Kontrollgruppe gegenüber, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Der p-Wert liegt mit 0,44 ebenfalls über dem Signifikanzniveau von 0,05.

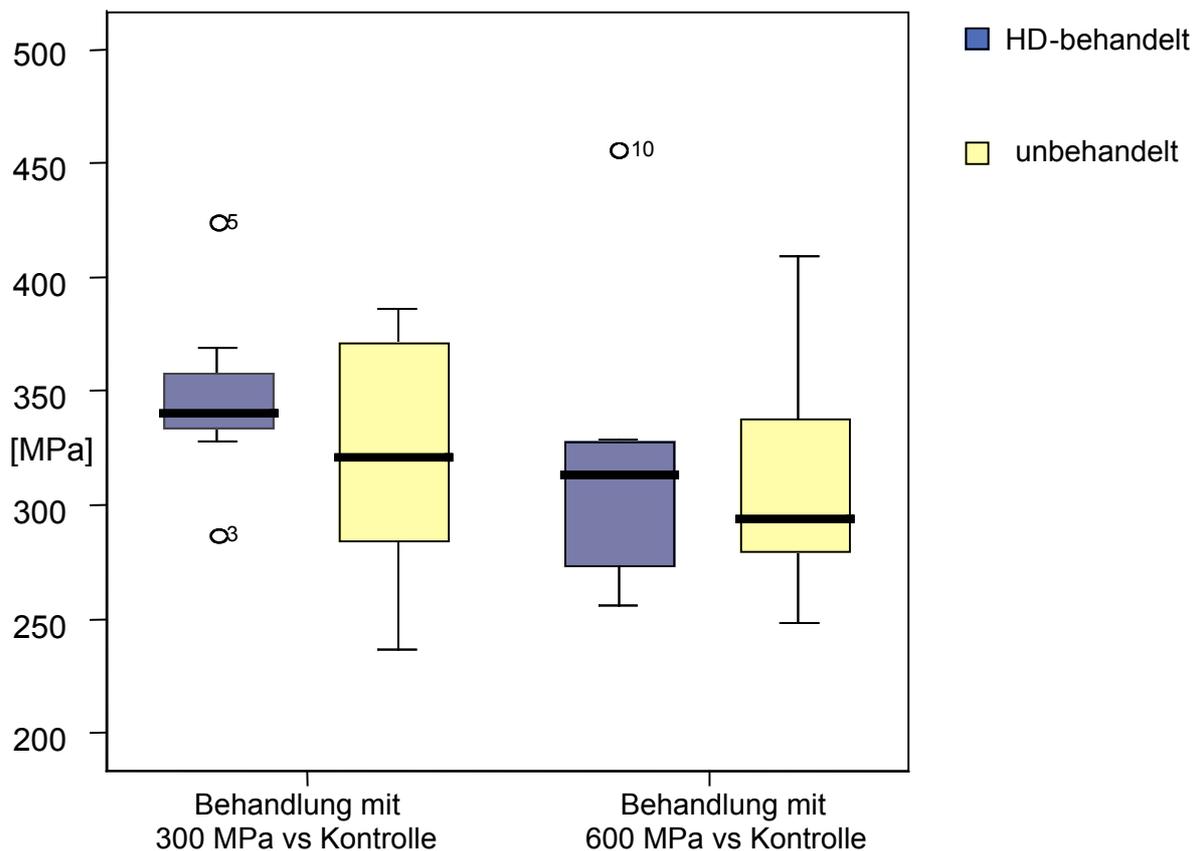


Abb. 14: Boxplot des E-Moduls der beiden Versuchsgruppen

### 3.3.2. Zugfestigkeit

Die nachfolgende Tabelle 4 zeigt die ermittelten Werte der Zugfestigkeit, die für die statistische Analyse verwendet wurden.

Tab. 4: Zugfestigkeit [N/mm<sub>2</sub>] hochdruckbehandelter Sehnen und deren Kontrollen

Zugfestigkeit [N/mm <sub>2</sub> ]					
Proben	300 MPa	Kontrolle	Proben	600 MPa	Kontrolle
(0	76	28)	10	80	58
1	43	54	11	33	47
2	65	56	12	64	67
3	46	61	13	62	60
4	62	45	14	49	42
5	68	29	15	73	63
6	65	58	16	66	68
7	64	38	17	60	67
8	51	63	18	61	47
9	63	61	19	45	76
Median	63	56	Median	62	62
Max	68	63	Max	80	76
Min	43	29	Min	33	42
Mittelwert	59	52	Mittelwert	59	60
Standardabw.	9	12	Standardabw.	14	11

In der **300 MPa-Gruppe** war der Median 63 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 43 N/mm<sub>2</sub> bis 68 N/mm<sub>2</sub>). Für die zugehörige unbehandelte Kontrolle lag der Median bei 56 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 29 N/mm<sub>2</sub> bis 63 N/mm<sub>2</sub>).

Bei der **600 MPa-Gruppe** lag der Median bei 62 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 33 N/mm<sub>2</sub> bis 80 N/mm<sub>2</sub>). Für die zugehörigen unbehandelte Kontrollgruppe lag der Median ebenfalls bei 62 N/mm<sub>2</sub> (Streuung 42 N/mm<sub>2</sub> bis 76 N/mm<sub>2</sub>).

In der **statistischen Analyse** wurden die mit 300 bzw. 600 MPa behandelten Sehnen mit der jeweils unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Auch in der **300 MPa** Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der Zugfestigkeit festgestellt werden. Der p-Wert liegt bei 0,374 und ist größer als das Signifikanzniveau.

Der p-Wert der **600 MPa** Gruppe bezüglich der Zugfestigkeit erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Mit  $p = 0,919$  liegt er über dem Signifikanzniveau von  $\lambda = 0,05$ .

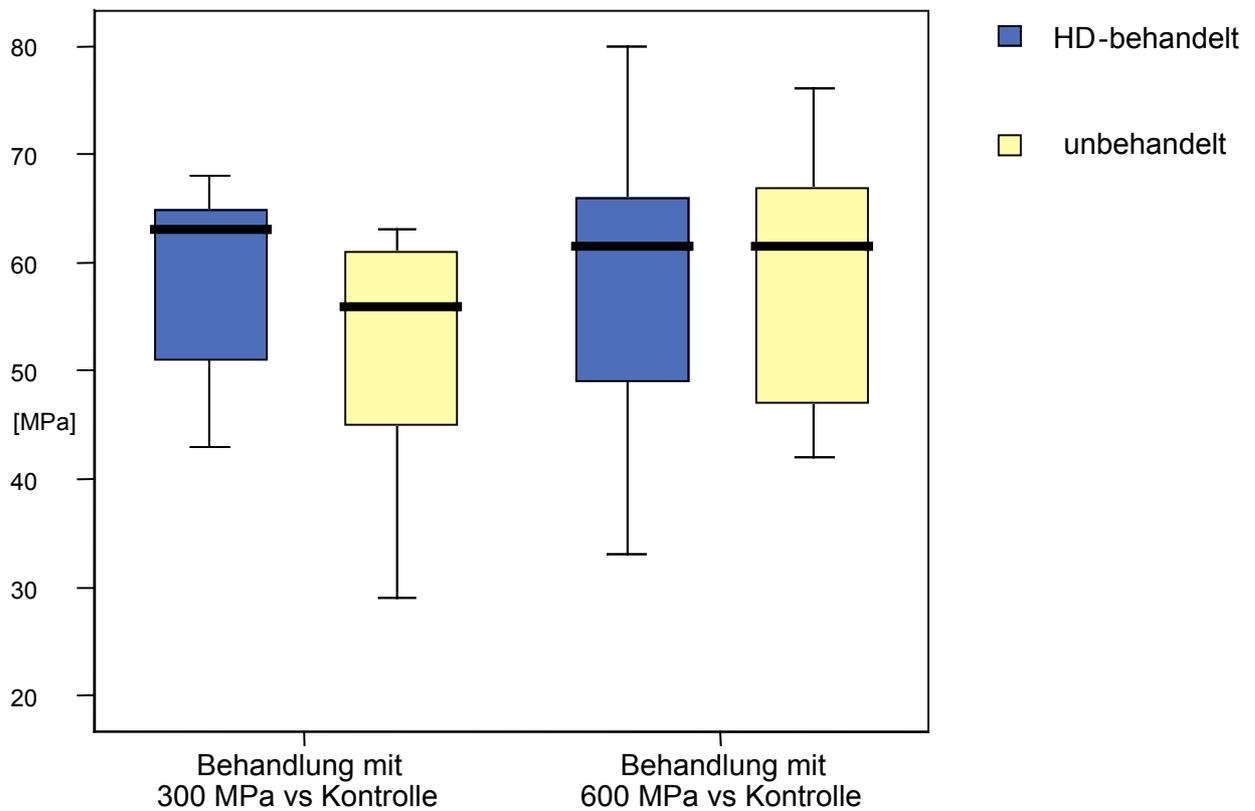


Abb. 15: Boxplot der Zugfestigkeit der beiden Versuchsgruppen

### 3.3.3. Einfluß des Tiefgefrierens auf die mechanischen Eigenschaften von Sehnen

Um eventuelle Einflüsse des Tiefgefrierens auf die mechanischen Eigenschaften nachzuweisen, wurden der E-Modul und die Zugfestigkeit der unbehandelten Kontrollen in statistischen Tests miteinander verglichen. Es wurde der Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gewählt. Verglichen wurden die **unbehandelten eingefrorenen Kontrollen der 600 MPa – Gruppe** mit den **unbehandelten frischen Kontrollen der 300 MPa – Gruppe**. Wie aus der Abb. 16 hervorgeht, wurden in der Kontroll-Gruppe der 300 MPa Behandlung nur 9 Sehnen (N=9) ausgewertet, da die Sehne Nr. 1 vollständig aus der statistischen Auswertung genommen wurde, Begründung siehe Kap. 3.2.

Der p-Wert des Vergleichs des E-Moduls beträgt 0,035. Da der p-Wert unter dem Signifikanzniveau von 0,05 liegt, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den eingefrorenen Sehnen und den nicht eingefrorenen Sehnen bezüglich des E-Moduls. Die Abbildung 16 veranschaulicht dies graphisch.

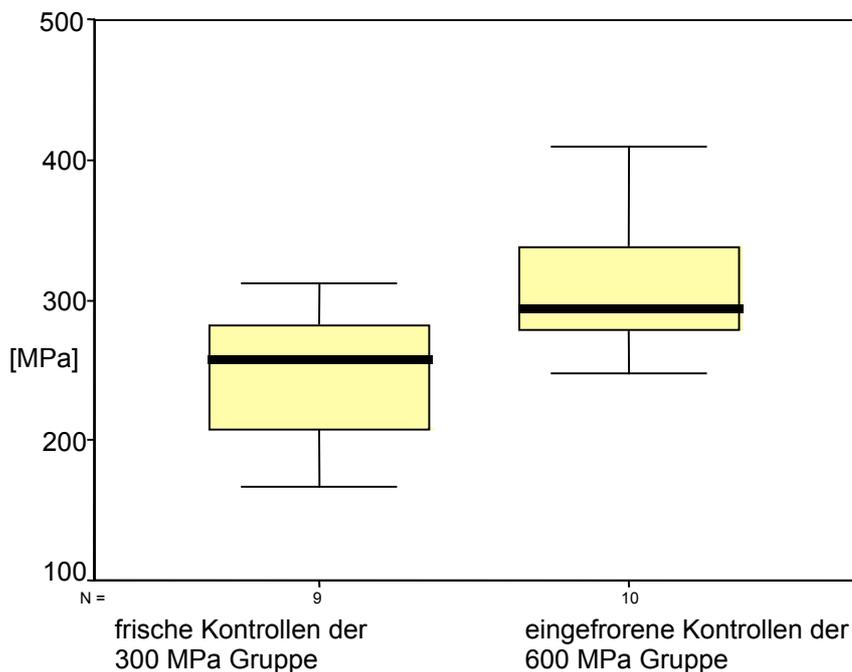


Abb. 16: Boxplot: Statistische Auswertung der E-Modul-Werte der Kontroll-Gruppen

Der p-Wert des Vergleichs der Zugfestigkeit beträgt 0,133. Da der p-Wert über dem Signifikanzniveau liegt läßt sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den

eingefrorenen und den frischen Sehnen feststellen. Die Abbildung 17 stellt dies graphisch dar.

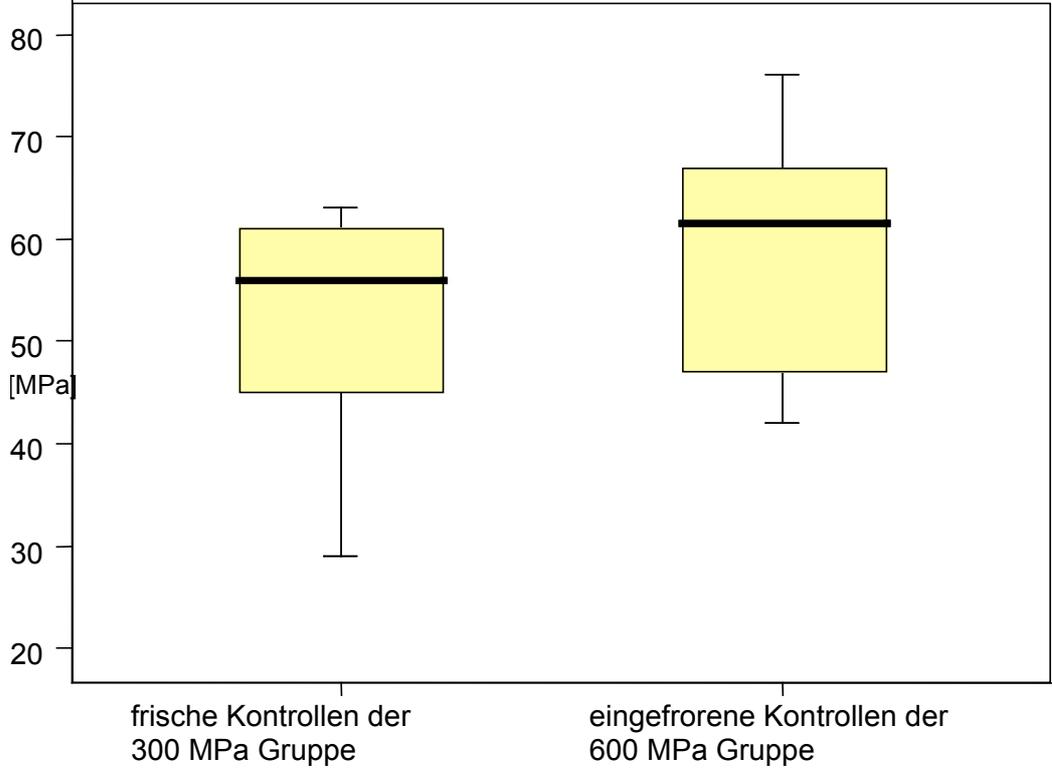


Abb. 17: Boxplot: Statistische Auswertung der Zugfestigkeits-Werte der Kontroll-Gruppen

### 3.4. Auswertung der Hysteresekurven

Wie in der Literatur beschrieben, bewirkt das Vordehnen von Sehnen eine Ausrichtung der Kollagenfasern zu größerer Regelmäßigkeit und eine Abnahme der Welligkeit der Fibrillen, was zu einer Erhöhung der intermolekularen Kräfte, wie den Van-der-Waals-Kräften führt. Wiederholte Belastungen verändern jedoch nicht die Kraft-Längenänderungs-Kurve, sofern im Hookschen Bereich vorgedehnt wird. (Siebels et al., S. 18 ff) Dieses viskoelastische Verhalten ist von der Belastungsgeschwindigkeit und Belastungsdauer abhängig und bewirkt eine Zunahme der Steifigkeit, des E-Moduls und Reißfestigkeit, sowie eine Abnahme der Dehnung, aufgrund der verstärkten intermolekularen Kräfte. (Siebels et al., S. 21 ff) Auch unter physiologischen Bedingungen werden Sehnen während einer Bewegung angespannt und wieder entspannt.

Deshalb wurde in dieser Studie zweimal nacheinander belastet und entlastet und danach erst der Zugversuch bis zum Versagen durchgeführt.

Die **statistische Auswertung** wird mit den Werten der unbehandelten Kontrollen der 300 MPa-Gruppe durchgeführt. Dafür wurde der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben gewählt. Das Signifikanzniveau lag bei 0,05.

- Nullhypothese (H0): Es gibt keinen signifikanten Unterschied der beiden Differenzen 1 und 2.
- Alternativhypothese (H1): es lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Differenzen 1 und 2 nachweisen.

Die Tabelle 5 zeigt die analysierten Werte der 300 MPa-Gruppe.

Tab. 5: E-Modul-Werte der unbehandelten Kontrollen zu der 300MPa Gruppe

	E-Modul [N/mm <sup>2</sup> ]		
	1. Vordehnen	2. Vordehnen	Zugversuch
(0a	228	342	348)
(0b	119	165	163)
1a	255	328	333
1b	300	359	369
2a	303	366	358
2b	207	276	284
3a	214	280	287
3b	282	377	386
4a	263	329	340
4b	167	229	237
5a	339	416	424
5b	189	249	256
6a	242	314	328
6b	258	312	318
7a	267	361	369
7b	252	321	321
8a	261	325	333
8b	272	365	371
9a	268	356	357
9b	312	380	381

Für die statistische Auswertung wurden Differenzen berechnet. Zum einen eine Differenz 1 und eine Differenz 2.

- Diff. 1 = E-Modul-Wert des 2. Vordehnens minus Wert des 1. Vordehnens
- Diff. 2 = E-Modul-Wert des zerstörenden Zugversuchs minus Wert des 2. Vordehnens

Dabei zeigt sich in der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon-Test zwischen der Differenz 1 und der Differenz 2 ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Werten, da der p – Wert mit 0,008 kleiner dem Signifikanzniveau ist. Dies bedeutet, daß sich der E-Modul durch das Vordehnen statistisch signifikant ändert.

Die Information aus dem Vorzeichentest des Wilcoxon – Test, dass auch die Vorzeichen aller Subtraktionen aus Differenz 2 minus Differenz 1 negativ sind, erlaubt die Aussage, daß sich alle E-Modul-Werte durch das Vordehnen Werte sich in eine Richtung ändern.

Die Differenz 2 ist kleiner als die Differenz 1, was bedeutet, dass Unterschiede in der Steifigkeit durch das Ausrichten der Sehnenfasern und Entstehen größerer intermolekularer Kräfte kleiner werden.

Die Abbildung 18 zeigt die statistische Darstellung.

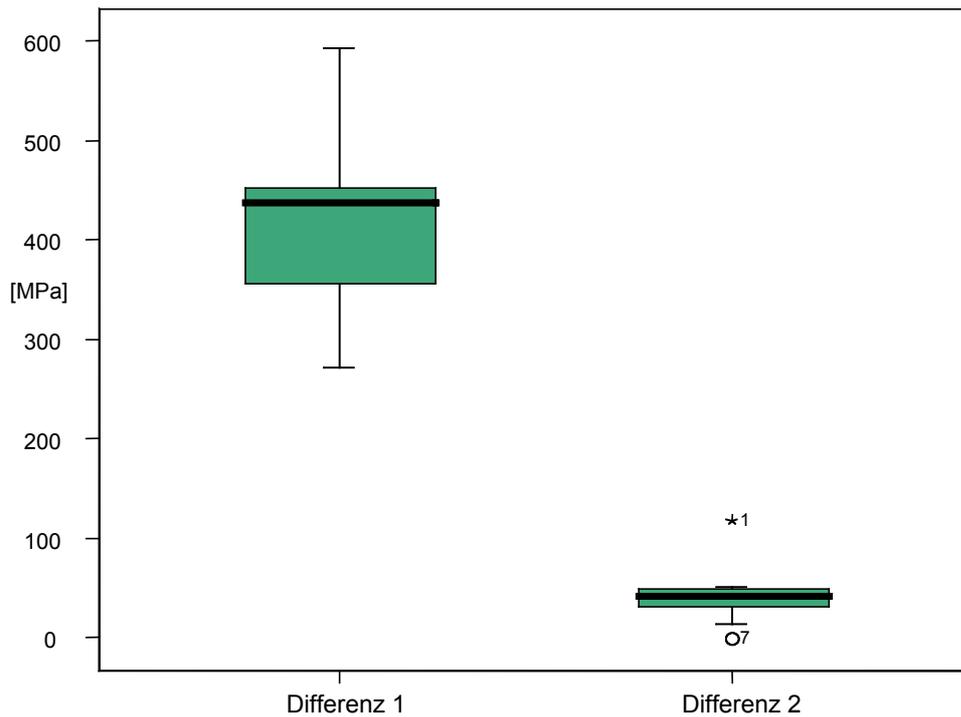


Abb. 18: Boxplot der Differenzen der E-Modul-Werte unbehandelter Sehnen

## **3.5. Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung**

### **3.5.1. Kollagen I**

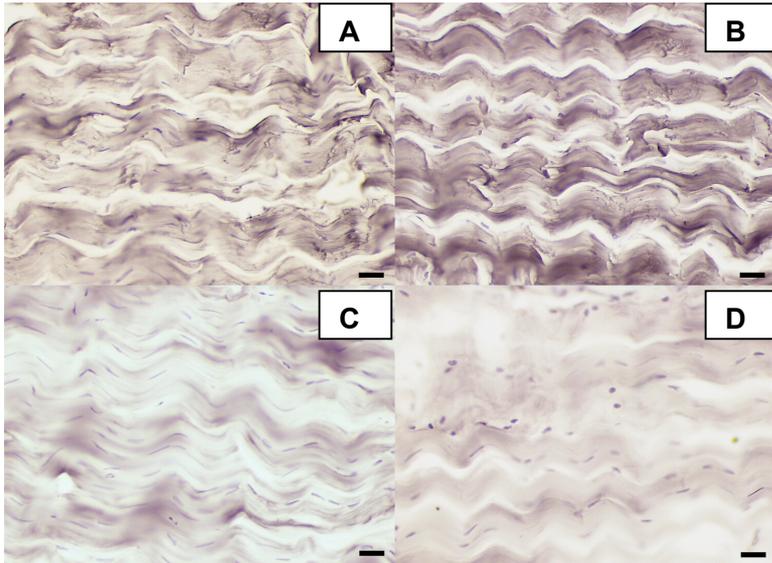
Die immunhistochemische Markierung zeigt sowohl für die beiden hochdruckbehandelten Gruppen mit 300 bzw. 600 MPa wie auch für deren unbehandelte Kontrollen in allen untersuchten Proben eine gleichmäßige extrazelluläre Markierung für Kollagen Typ I. Wie aus der nachfolgenden Abbildung ersichtlich, wird das Kollagen der extrazellulären Matrix in breiteren bräunlich erscheinenden Faserbündeln innerhalb der Sehnen markiert. Es kommt nach HDD zu keiner Veränderung der Antikörpermarkierung.

Kontrollmarkierungen welche anstelle des Primärantikörpers nur mit PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) inkubiert wurden, zeigten keine derartige Markierung. Damit ist sichergestellt, dass die Markierung mit dem gewählten Primärantikörper tatsächlich nur Kollagen I nachweist und nicht etwa unspezifische an andere Sehnenstrukturen bindet.

### **3.5.2. Versican**

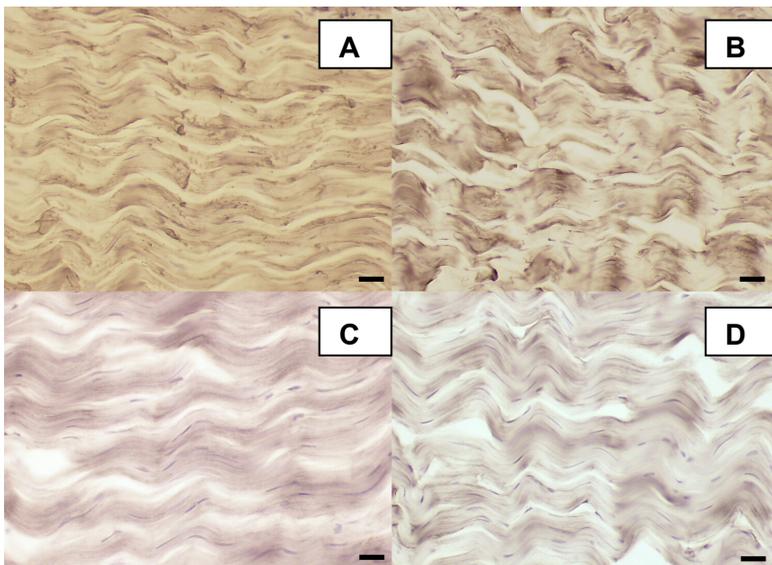
Versican läßt sich ebenfalls in den hochdruckbehandelten Gruppen mit 300 bzw. 600 MPa wie auch in den unbehandelten Kontrollen in allen untersuchten Proben gleichmäßig nachweisen. Die dünne, streifenförmige Markierung für Versican findet sich bevorzugt extrazellulär zwischen den Kollagenfaserbündeln (Abb. 19, 20 ). Es kommt nach HDD zu keiner Veränderung der Antikörpermarkierung.

Kontrollmarkierungen welche anstelle des Primärantikörpers nur mit PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) inkubiert wurden, zeigten keine derartige Markierung und lassen den Schluß zu, daß die Markierung mit dem gewählten Primärantikörper spezifisch nur Versican nachweist und nicht etwa unspezifische an andere Sehnenbestandteile bindet.



- A) Oben links: unbehandelt, Kol. 1
- C) Unten links: unbehandelt, Versican
- B) Oben rechts: 300 MPa, Kol. 1
- D) Unten rechts: 300 MPa, Versican

Abb. 19: Sehne 9



- A) Oben links: unbehandelt, Kol. 1
- C) Unten links: unbehandelt, Versican
- B) Oben rechts: 600 MPa, Kol. 1
- D) Unten rechts: 600 MPa, Versican

Abb. 20: Sehne 19

#### 4. Diskussion

Eine große Problematik und Herausforderung in der orthopädischen Chirurgie stellt die Versorgung von Knochendefekten nach Resektionen größerer Knochensegmenten im Rahmen von Tumorerkrankungen oder chronischen Infektionen dar.

Bisher werden im klinischen Alltag verschiedene Verfahren angewandt, die jedoch mit hohen Komplikationsraten behaftet sind. Bei der Auswahl der therapeutischen Optionen spielt die Größe des Defektes, die anatomische Lage, aber auch das Alter des Patienten eine Rolle.

Besonders schwierig ist die **Rekonstruktion großer Knochendefekte** junger Patienten, die beispielsweise nach onkologischer Resektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand entstehen. Etablierte Verfahren sind die Versorgung der Defekte mit Endoprothesen, Allo- oder Autografts.

Für junge heranwachsender Patienten mit hoher sportlicher Aktivität ist eine Implantation von **Prothesen** oft problematisch, da wiederholte Revisionseingriffe auf Grund von Lockerungen, entzündlichen, durch Abrieb hervorgerufenen, Reaktionen oder Wachstum des Patienten erforderlich werden (Elke et al., S. 258-265; Natarajan et al., S. 175-179; Morris et al., S. 293-299). Nachteilig ist zudem die fehlende Osteokonduktivität und Osteoinduktivität der Prothesen gegenüber biologischen Transplantaten, die für den Einheilungsprozeß und somit für eine mechanische Belastbarkeit förderlich wären.

Demgegenüber stehen biologischen Materialien, wie Allograft und Autografts zur Verfügung.

Die Verwendung von **allogene Knochentransplantaten** wird vor allem wegen des Infektionsrisikos und immunologischen Abstoßungsreaktionen eher umgangen und nicht mehr empfohlen. Zudem ist das Führen einer Transplantatbank sehr kostenintensiv (Knaepler et al., 1991, S. 763-765). Auf Grund der möglichen Erregerübertragung müssen die Allografts zur Senkung des potentiellen Infektionsrisikos behandelt werden. Methoden, die zur Erregerinaktivierung verwandt werden, sind die thermische Behandlung und die Gamma-Bestrahlung. Beide Verfahren senken allerdings die biomechanischen und biologischen Eigenschaften des Knochens, wie im nachfolgenden Absatz noch genauer ausgeführt wird (Knaepler et a., 1992, S. 477-484; Knaepler et al., 1991, S. 194-199).

Daher werden **Autografts**, sofern es die Indikation erlaubt, bevorzugt eingesetzt, da das frische autogene Transplantat eine sehr hohe osteogenetische Potenz bei idealer Verträglichkeit besitzt. Für die Therapie kleinerer Knochendefekte nicht lasttragender Areale

steht hier der Einsatz von Beckenkammsegmenten zur Verfügung. Größere lasttragende Knochendefekte der Röhrenknochen können mit einem Fibulatransplantat überbrückt werden, doch ist auf Grund des Remodellings mit einer verminderten Belastbarkeit von ca. 6-24 Monate zu rechnen (Mittelmeier et al., 1996, S. 1087-1092). Nachteilig ist auch die Notwendigkeit einer Zweitoperation mit entsprechenden biologischen Belastungen und Risiken, wie z.B. die langsame unzureichende Regeneration der Entnahmestelle und die Gefahr von Spontanfrakturen. Daher kann auch nur eine begrenzte Knochenmenge entnommen werden.

Ein weiteres Knochenersatzmaterial ist das mineralische, keramisierte, spongiöse **Pyrost**. Es wird durch Verbrennung aus Rinderknochen hergestellt und hat den Vorteil einer problemlosen Vorhaltung bei normaler Schrankfachlagerung. Jedoch ist die Druckfestigkeit zu gering, als daß es für die Rekonstruktion lasttragender Knochenareale eingesetzt werden kann, für die eine ausreichende mechanische Belastungsstabilität für die im Körper auftretenden Belastungskräfte gefordert ist (Mittelmeier et al., 1998, S. 126-135).

Für die Therapie langstreckiger, lasttragender Knochendefekte werden im Falle von tumorbefallenem Knochen daher seit einigen Jahren in ausgesuchten Fällen rekonstruktive Therapieformen wie die **intraoperative extrakorporale Gamma-Bestrahlung** oder **Autoklavierung** mit dem Ziel die Tumorzellen abzutöten durchgeführt und anschließend das resezierte Knochensegment orthotoper reimplantiert. Dadurch wird zwar eine **bessere Paßgenauigkeit** im betroffenen Abschnitt erreicht, es entstanden jedoch Komplikationen, wie ein erhöhtes Frakturrisiko, da die biomechanischen und biologischen Eigenschaften der Knochensegmente stark vermindert waren (Böhm et al., 2003, S. 356; Chen et al., S. 1156-1161; Sabo et.al., 2003, S. 1003-1012). Auch ein Einsatz im Gelenkbereich ist nicht zu empfehlen, da die biomechanischen Eigenschaften von Sehnen nach einer Gamma-Bestrahlung oder Autoklavierung ebenfalls reduziert werden (Curran et al., S. 1131-1135; Sugiura et al., S. 289-294). Besonders aber im Bereich des Kniegelenks ist der Erhalt der Bandstrukturen und Sehnenansätze für die Funktionalität des Gelenks essentiell (Siebels et al., S. 132).

Hier wird deutlich, daß es notwendig ist ein **alternatives Devitalisierungsverfahren** autogener tumorbefallener Knochensegmente zu finden.

Als mögliche Alternative wurde im Rahmen des **Forschungsprojektes FORTEPRO** untersucht, ob der **hydrostatische Hochdruck (HHD)** für eine medizinische Anwendung im Bereich der Sterilisation von **autologem tumorbefallenem Knochengewebe** mit anschließender Reimplantation geeignet ist.

Seit Jahren werden in der **Lebensmittelindustrie** Nahrungsmittel durch eine HHD-Behandlung erfolgreich pasteurisiert, indem Mikroorganismen inaktiviert werden. Es werden Druckstufen im Bereich von 50 bis 600 MPa angewandt (Meyer-Pittroff, 2001; Meyer-Pittroff, 2003, 2<sup>nd</sup> International Conference, S. 296, 301). Die einzelnen Bakterien sind unterschiedlich druckempfindlich. Gramnegative Bakterien sind wegen ihres Aufbaus der Bakterienwand drucksensibler als grampositive Bakterien. Beispielsweise überlebt E. coli Druckstufen von 350 MPa über 10 min. bei 10°C nicht. Sporen dagegen erfordern Druckstufen von mindestens 600 MPa um eine Inaktivierung hervorzurufen (Arroyo et. al., S. 735-742).

Der Gedanke ist es nicht nur Bakterien abzutöten, sondern auch Tumorzellen durch eine HHD-Behandlung absterben zu lassen.

In den Studien des Forschungsprojektes wurden **verschiedenste Zelllinien** normaler humaner Zellen und Tumorzellen mit hydrostatischem Hochdruck behandelt. Zunächst wird der Frage nachgegangen, ob es möglich ist Tumorzellen abzutöten und eine sichere Devitalisierung zu gewährleisten. Dabei ist es auch wichtig zu wissen, wie sich körpereigene Zellen unter diesen Druckstufen verhalten.

So wurden normale Zellen, wie humane Osteoblasten, humane Fibroblasten und Tumorzellen (humane Osteosarkom-, Ovarialtumor-, histiozytische Leukämiezellen) Druckstufen von 50 bis 400 MPa ausgesetzt. Nach einer HHD-Behandlung mit 350 MPa gab es keine überlebenden Zellen dieser Zelllinien (Diehl et al., Oncol. Rep. 2003, S. 1851-1855). Weiterhin konnten Unterschiede bezüglich der Viabilität von Zellen in Suspensionen oder adhärent auf beschichteten Oberflächen wachsend aufgezeigt werden.

Eine andere Studie behandelte Fibrosarkom-, Osteosarkom-, Ovarialtumor- und Brustkrebszellen mit HHD, die einerseits in einer Suspension, andererseits adhärent wachsend auf einer Fibronectin-Platte, vorlagen.

Nach einer HHD-Behandlung von 250 MPa waren die adhärent wachsenden Tumorzellen abgestorben. Im Gegensatz dazu werden Tumorzellen in einer Suspension erst bei einer Druckstufe von 350 MPa abgetötet (Diehl et al., Oncol. Rep. 2004, S. 369-373).

Adhärent wachsende Chondrosarkomzellen und Chondrozyten ließen sich schon unter einer HHD-Behandlung von 200 MPa abtöten. Chondrosarkomzellen und Chondrozyten in einer Suspension waren ebenfalls druckresistenter und gingen erst unter 350 MPa zugrunde (Naal et al., S. 1977-1982).

In einem weiteren Schritt konnte mit einer HHD-Behandlung eine **Devitalisierung** für humanen mit Chondrosarkom- und Osteosarkomzellen befallener Knochensegmente, sowie für humanen tumorfreien Knochen erreicht werden. Schon ab einer Druckstufe von 300 MPa waren die Zellen der behandelten Knochensegmente abgestorben (Schauwecker et al., S. 3-7).

Nachdem gezeigt wurde, daß eine Devitalisierung des Knochens durch eine HHD-Behandlung möglich ist, folgten Studien zur Auswirkung des HHD auf die **biomechanischen Eigenschaften** von Knochen, Knorpel und Sehnen.

Hierbei wurden **Knochensegmente** der Kortikalis und Spongiosa mit 300 bzw. 600 MPa behandelt.

Bei 300 MPa ergaben sich für Spongiosa keine signifikanten Änderungen von Elastizitätsmodul, Festigkeit und Bruchdehnung. Bei gleicher Druckanwendung zeigte Kortikalis keine signifikante Veränderung ihres Elastizitätsmoduls bei allerdings signifikanter Zunahme ihrer Festigkeit.

Ein HHD-Behandlung mit 600 MPa bewirkte bei Spongiosa keine signifikante Änderung von Elastizitätsmodul und Festigkeit, aber eine Verminderung des Elastizitätsmoduls und der Festigkeit der Kortikalis-Segmente um 15% (Steinhauser et al., S., 130-135).

Gegenüber den im klinischen Alltag verwendeten Devitalisierungsverfahren, wie **thermische Verfahren** und die **Gamma-Bestrahlung**, die eine Verminderung der biomechanischen Eigenschaften verursachen und hohen klinischen Komplikationsraten zur Folge haben, konnte ein Vorteil der HHD-Behandlung für die Behandlung von Knochensegmenten unter präklinischen Bedingungen herausgestellt werden.

Für die thermische Behandlung sind drei Arten zu nennen.

Zum einen die **Autoklavierung** (d.h. Behandlung mit Temperaturen über 100°C), die sich für die Sterilisation der Operationsgeräte bei 121°C für 20 min. oder 134°C für 5 min. bewährt hat, die **Pasteurisierung** 80°C für 10 min. und die **Kryokonservierung** bei -80°C. Für die Kryokonservierung wird jedoch eine eingeschränkte virale und bakterielle Sicherheit beschrieben und ist als Devitalisierungsverfahren deshalb uninteressant (Knaepler et al., 1999, Kongreßband, S. 96, 97).

Zur klinischen Umsetzung der Pasteurisierung ergab eine Studie, daß sich über 43°C der zellenabtötenden Effekte exponentiell erhöht. Hier wurden Ratten-Sarkom-Zellen bei 44°C über 30 min. sicher abgetötet. Unerwünscht ist aber auch eine lange Zeitdauer, da diese negative Wirkungen auf die osteoinduktiven und biomechanische Eigenschaften hat. Um die Zeitdauer verkürzen zu können muß man die Temperatur erhöhen.

In Anbetracht der Transplantatgrößen, wie Bereiche der Femurkondylen, ist oft eine längere Behandlungszeit notwendig. Die kürzeste Zeitdauer mit ausreichendem zellabtötenden Effekt wurde mit 15 min. bei 134°C bzw. mit 20 min. bei 120°C ermittelt (Böhm et al., 1998, S. 62). Daher ist eine Autoklavierung mit höheren Temperaturen zu bevorzugen, um die Zeitdauer der thermischen Behandlung zu verkürzen und den negativen Effekt auf die biomechanischen und biologischen Eigenschaften zu vermindern.

Diese zellenabtötende Eigenschaft der **Autoklavierung** fand Anwendung in der Behandlung allogener Transplantate oder tumorbefallener Autografts. Ein Vorteil der Autoklavierung ist die exakte Steuerbarkeit, die Wärmeanwendung und das Fehlen toxischer oder mutagener Nebenwirkungen (Knaepler et al., Unfallchirurg, 1992, S. 477).

In **klinischen Studien** ergaben sich durch die **Autoklavierung** hohe mechanische Versagensraten der Transplantate auf Grund der Reduktion der biomechanischen und biologischen Parameter mit ernstzunehmenden klinischen Komplikationen für die behandelten Patienten (Böhm et al., 2003, S. 356).

Ursachen sind eine Verminderung der osteoinduktiven Eigenschaften autoklavierter (120°C über 20 min.) Knochensegmente mit deutlich verlangsamtem Einheilungsprozeß und verminderter Osteoblastenzahl (Zoricic et al., S. 121).

Für die klinischen Studien ergeben sich hohe Versagensraten, wie eine klinische Studie mit 15 Patienten auf, denen autoklavierten Autografts (135°C für 10 min.) reimplantiert wurden zeigte. Von 15 Autografts versagten 7 Transplantate. In weiteren 8 Fällen gab es Komplikationen, wie Infektion, Tumorrezidiv, Frakturen, Dislokationen und Lockerungen (Asada et al., S. 394, 395).

Bessere klinische Ergebnisse erzielte Böhm et al. in einer Studie. Die Transplantate wurden bei 120°C 20 min. lang autoklaviert. Als Hauptproblem wird hier die Pseudarthrosenbildung aufgeführt. Dies läßt sich radiologisch durch die langsame erst nach 10 bis 12 Monaten einsetzende Inkorporation des devitalisierten autoklavierten und reimplantierten Transplantates erklären. Nach einem Jahr konnte mit einer Biopsieentnahme eine Revaskularisation, jedoch keine lebenden Osteone, nachgewiesen werden. Schlußfolgernd wurde eine osteosynthetische Versorgung der Transplantate mittels Marknagel empfohlen. Denn eine mangelhafte Osteosynthese wirkt sich gravierender in devitalisiertem Gewebe aus als unter „normalen“ Bedingungen und der Knochenheilungsprozeß zwischen vitalem, unbehandeltem und avitalem, autoklavierten Knochen kann unter Verhältnissen einer mechanisch optimierten Osteosynthese verbessert werden (Böhm et al., 1998, S. 57-65).

Dies wird auch in einer Studie von Sanjay et al. bestätigt. Bei 7 Patienten wurden tumorbefallener Knochen mit 132°C für 5 min. autoklaviert und reimplantiert. Zusätzlich zum autogenen Transplantat wurden autogene Fibulatransplantate oder Endoprothesen verwendet. Bei 5 Patienten lag der Tumor im Kniegelenkbereich. Der Funktionserhalt des

Gelenks war nicht möglich, sodaß eine Arthrodesse des Kniegelenks mit einem Nagel durchgeführt wurde. Bei insgesamt 4 Patienten wurde eine weitere Operation aufgrund von Implantatversagen und Knochenheilungsstörungen notwendig (Sanjay et al., S. 294).

Knorpeldegenerationen werden schon ab einer Behandlung mit 65°C für 30 min beschrieben (Ahmed et al., S. 170-179).

Dies erklärt die Reduktion der Stabilität auf ca. 60% bei der Autoklavierung ab 100°C. Eine Behandlung mit 134°C führte sogar zu einem Stabilitätsverlust auf Werte zwischen 13 und 25% (Knaepler et al., 1991, S. 194).

Zusätzlich nachteilig ist eine fehlende homogene Hitzedurchdringung bei der Autoklavierung größerer Transplantaten, wie Hüftköpfen. (Knaepler et al., 1999, Kongreßband, S. 96; Knaepler et al., Unfallchirurg, 1992, S. 479; Asada et al., S 395; Sugiura et al., S. 293), sodaß eine Devitalisierung nicht gewährleistet werden kann.

Dagegen bietet die (intraoperative extrakorporale Irradiation und Reimplantation) eine sichere **Gamma-Bestrahlung** Durchdringung der Transplantate (Knaepler et al., 1994, Unfallchirurg, S. 9). Bisher wurden tumorbefallene Knochensegmente en bloc reseziert, einer intraoperativen Bestrahlung mit unterschiedlichsten Bestrahlungsdosen behandelt und wieder reimplantiert. Vor allem warf postoperativ die mechanische Stabilität Probleme auf, wie eine intraoperative Bestrahlung mit 50 Gy tumorbefallener Knochensegmente von 16 Patienten zeigte. Sie Belastung war erst dann erlaubt, wenn sich röntgenologisch eine Knochenheilung abzeichnete. Die Stabilisierung der resezierten Knochensegmentes erfolgte durch Nägel und Schrauben. In nur 7 Fällen wurde ein vollständiges Einwachsen des Resektats erreicht. Lokale Tumorrezidive wurden nicht vermerkt (Hong et al., S. 441-447).

Im Gegensatz dazu traten unter einer Behandlung mit 300 Gy bei 7 von 15 Patienten lokale Rezidive auf, die zum Tode führten. Außerdem war die Implatation einer Totalendoprothese (TEP) in 5 Fällen auf Grund tumoröser Infiltration des Hüftgelenkes, notwendig. Eine Rekonstruktion mit autologem Knochen war nicht möglich (Sys et al., S. 174-178).

Ähnlich hohe Komplikationsraten wurden in einer weiteren Studie mit 17 Patienten beschrieben, wobei tumorbefallene Knochensegment intraoperativ mit 300 Gy bestrahlt und reimplantiert wurden. Auch kam es in 15 Fällen zu schwerwiegenden Komplikationen, wie Pseudarthrosen, aseptische Knochennekrosen auf, die zu massiven Defekten führten. Lag der Tumor im Bereich der proximalen Tibia oder distalen Femur, sodaß der Gelenkbereich im Resektionsgebiet lag, so führte dies immer zur Instabilität des Kniegelenkes. Zudem starben 5 Patienten an systemischer Metastasierung und lokale Rezidive wiesen 3 Patienten auf (Uttendaele et al., S. 348).

Auch unter einer strengen Indikationsstellung ist die Anwendung einer **intraoperativen Irradiation und Replantation (IEIR)** mit hohen Komplikationsraten verbunden. Voraussetzungen sind eine lokale Beschränkung des Tumors mit der Möglichkeit der sicheren onkologischen Resektion, sowie Fehlen größerer osteolytischer Herde, die die Belastungsstabilität beeinträchtigen könnten. Vor allem Frakturen und Verlust des Gelenkknorpels, sowie fehlende Einbau des Transplantates werden nach einer Bestrahlung mit 300 Gy beschrieben. Im Gelenkbereich mußten daher Gelenkprothesen im Bereich der Hüfte und des Kniegelenks implantiert werden (Chen et al., S. 1156- 1161). Bis zu einem Zeitraum von 2 Jahren kann die Belastung bestrahlter Knochensegmente postoperativ herabgesetzt sein, sodaß bei Überbelastung Frakturen auftreten können (Böhm et al., 2003, S. 355-365).

Auch in Studien mit niedrigeren Bestrahlungsdosen von 45 bis 120 Gy wurden hohe Komplikationsraten verzeichnet. Schwere Infektionen, Frakturen und vor allem Fehlende Fusion der Osteotomieflächen machten oft Revisionen notwendig (Sabo et.al., 2003, S. 1003-1012; Sabo et. al., 1999, S. 580-588; Araki et al., S. 196-206).

Die intraoperative extrakorporale Irradiation und Replantation (IEIR) bleibt ein Verfahren, das für spezielle Indikationen angewandt werden kann, wenn etablierte Rekonstruktionsverfahren wie Endoprothetik, biologische Defektrekonstruktion oder Umkehrplastiken aufgrund der Tumorlokalisation oder aufgrund des Patientenwunsches nicht sinnvoll eingesetzt werden können. Die Voraussetzung sind eine onkologisch sichere Resektion des tumorbehafteten Knochensegments, keine systemische Streuung der Tumorzellen und ausreichende Stabilität des tumorbehafteten Knochensegments (Sabo et al., 2003, S. 1003-1012; Böhm et al., 2003 S., 355, 356). Empfohlen wird die Anwendung der IEIR im multidisziplinären Rahmen, da hier die Betreuung der Patienten im Rahmen von Langzeitstudien gegeben ist (Hong et al. S. 441).

Histologische Veränderungen nach einer Gamma-Bestrahlung wurden in einem Tierexperiment mit 20 Kaninchen dargestellt. Es wurden die Auswirkungen auf die Knochenfestigkeit untersucht. Dabei wurden Tibiasegmente entnommen, mit 50 Gy in einer Einzeldosis bestrahlt und anschließend reimplantiert. Nach 12 Wochen konnte eine mechanische Schwäche des bestrahlten kortikalen Knochens festgestellt werden. Erklären ließ sich das durch eine erhöhte endostale Knochenresorption, eine signifikante Zunahme der intrakortikalen Knochenporosität mit einer Zunahme der Resorptionslakunen bzw. Knochenporosität und einer fast gänzlich unterdrückten Knochenneubildung (Sugimoto et al., 1991, S. 494). Untersuchungen mit wesentlich höheren Bestrahlungsdosen zeigten bezüglich der Knocheneinheilung autogener extrakorporal bestrahlter Knochentransplantate erst ab einer Dosis von 25 kGy eine verspätete Einheilung. Bezüglich der Knocheneinheilung verhielten sich die mit 1 und 5 kGy bestrahlten Knochensegmenten wie frische

Transplantate. Die Revaskularisierung, sowie die appositionelle Knochenneubildung war nicht beeinträchtigt. Dagegen zeigte die Gruppe der 25 kGy bestrahlten Transplantate eine fehlende Revaskularisierung, welche sich vermutlich negativ auf die Einheilung auswirkte. Die Versuchsgruppe der mit 50 kGy bestrahlten Knochensegmente mußte aufgrund von Frakturen im bestrahlten Bereich abgebrochen werden. In allen bestrahlten Gruppen war die Revitalisierung der Transplantate durch Osteozyten, d.h. die Osteoinduktivität des Knochens, signifikant reduziert (Voggenreiter et al., S. 583, 585).

Bezüglich der Beeinflussung der biologischen Eigenschaften ist die HHD-Behandlung diesen Verfahren ebenso überlegen.

Ein Projekt zeigte keinerlei Auswirkungen einer HHD-Behandlung auf die Eigenschaften extrazellulärer Matrixproteine des Knochens. Die Matrixproteine Vitronectin, Fibronectin und Kollagen I zeigten bezüglich ihren fördernden Eigenschaften auf Zell-Adhärenz, „Spreading“ und Prolifation humaner Osteoblasten und Tumorzellen nach der HHD-Behandlung mit 300 bzw. 600 MPa keinen Unterschied (Diehl et al., Int J Mol Med 2005 285 – 289).

Auch der Einsatz des HHD im Gelenkbereich wurde geprüft, indem osteochondrale Segmente mit 300 und 600 MPa behandelt wurden. Dabei konnten keine signifikante Änderung der Steifigkeit und des Relaxationsverhaltens nach einer HHD-Behandlung dieser osteochondralen Segmente gefunden werden (Diehl et al., Biomed Tech 2006, 8-14). Dagegen bleibt ein großes Problem die Verminderung des Knorpels bis zu 21% durch eine Gamm-Bestrahlung von 300 Gy. Unvermeidbar ist oft die Implantation von Prothesen (Chen et al., S. 1156).

Vor dem Hintergrund der präklinischen Testung des HHD kann es zukünftig möglich sein bei Tumoren im Gelenkbereich, dieses Gelenk zu resezieren, mit HHD zu behandeln und wieder zu reimplantieren ohne, daß dabei der Knorpel durch den HHD beschädigt wird und der Einsatz von Prothesen nicht notwendig wäre. Grundlegend wichtig für ein funktionierendes Gelenk sind die Sehnen und Bänder (Araki et al., S. 196-206). Daher ist der Sehnen-Bänderhalt essentiell.

Im klinischen Alltag wird eine **Devitalisierung der Sehne** oder **Sehnenersatz** bei Tumordinfiltration notwendig.

Bisherige Möglichkeiten des Sehnen- oder Bändersatzes sind **autogene** oder **allogene Transplantate** und **artifizielle Materialien**, wie Trevira-Bänder, Gore-Tex- oder Dacron-Kunstbänder (Siebels et al., S. 93, Grewe et al., S. 246, Dunn et al., S. 506).

Für den **artificialen Kreuzbändersatz** wurden in den 80er Jahren unter anderem Dacron-Prothesen verwendet. Obwohl die funktionellen postoperativen Ergebnisse bis zu 6 Monaten

für über 75 % der Patienten sehr gut waren, lag die Versagensrate dennoch höher als bei autogenen oder kombinierten Transplantaten (Andersen et al., S. 20). Sehr schlecht waren die Langzeitergebnisse nach 2 Jahren. Hier rupturierten 37% der Transplantate (Andersen et al., S. 24ff). Die Erklärung dafür ist eine unzureichende Funktionsanpassung der synthetischen Sehnen. Sie besitzen zwar eine hohe Maximalkraft von 1130 N, doch ist ihre Scheuerbeständigkeit sehr gering, besonders durch abrasive Belastungen an Knochen-Knorpel-Kanten (Siebels et al., S. 137). Zusätzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, daß die Verwendung Dacron, sei es zur Sehnenverstärkung oder als reine Prothese, die Revaskularisierung nachteilig beeinflusst (Yoshiya et al., S. 475-485).

Auch für Gore-Tex-Prothesen konnten keine besseren Langzeitergebnisse erreicht werden. Hier wurden gute bis exzellente Ergebnisse in nur 44% erreicht. Bei dem Rest der Patienten traten Komplikationen in Form von Ruptur oder Dehnung der Prothese, Kniegelenkergüsse und Infektionen auf (Grewe et al., S. 249). Bezüglich der biomechanischen Anforderung ist das Trevira-Band eine favorisierte Methode des artifiziellen Bandersatzes (Siebels et al., S. 138).

Doch ist das Hauptproblem der synthetischen Bänder nach wie vor das Durchscheuern mit reduzierter Langzeitfestigkeit. Damit verbunden ist ein Abriß der Prothese, sowie das Entstehen von Abriebpartikeln besonders an Scheuerstellen mit Knorpel oder Knochen und nachfolgender Fremdkörperreaktion. Außerdem ist die Verankerung der Prothesen im Knochen mit nachfolgendem Einwachsen nicht immer gewährleistet. Dazu verändern Verankerungstechniken und Wendelungen die Reißkraft von solchen artifiziellen Implantaten zusätzlich und diese ungleichmäßige Krafteinleitung stört den Kraftfluß im Band selbst (Siebels et al., S 127, 138, 151). Neuere Studien verglichen eine unterschiedliche Fixation von transplantierten Bändern. Die Verankerung der hinteren Kreuzbandes mittels Schrauben war wesentlich fester als die Verwendung von Nähten. Bei der Verwendung von Nähten war der Grund für das Transplantatversagen oft eine Ruptur der Nähte (Kitamura et al., S. 909, 912).

**Biologische Sehnentransplantate** dagegen besitzen wie biologische Knochentransplantate auch, den Vorteil, daß sie vom Empfänger um- und eingebaut werden. Mit biologischen Sehnentransplantaten könnten somit bessere funktionelle Ergebnisse erreicht werden, da hier eine Revitalisierung des Transplantates stattfindet, wodurch langfristig eine größere Stabilität erreicht wird und der Verschleiß artifizieller Transplantate mit nachfolgender Fremdkörperreaktionen durch Abriebpartikel als Komplikationen umgangen wird (Siebels et al., S. 140).

An biologischen Transplantate können Allografts oder Autografts verwendet werden.

**Allografts** sind hinsichtlich des Infektionsrisikos, der Abstoßungsreaktion und der Unterhaltung einer Transplantatbank problematisch und aufwendig (Sys et al., S., 177; Knaepler et al., 1991, S. 763; Knaepler et al., 1999 Kongreßband, S. 93). Auch die Versagensrate von implantierten Sehnenallografts scheint besonders von der Zeit zwischen der Beschaffung des Transplantates und der Implantation abhängig zu sein. Eine Studie ergab eine signifikant größere Zeitspanne zwischen Beschaffung und Implantation von fehlgeschlagenen Transplantationen gegenüber einer kürzeren Zeitspanne von Beschaffung bis zur Implantation der Allografts erfolgreicher Transplantationen (Sterling et al., S. 173-178).

Bei der Gewinnung von **Autografts** gibt 2 Möglichkeiten. Entweder werden sie an anderer Stelle entnommen, wofür ein Zweiteingriff notwendig ist, oder es wird die tumorbefallene Sehne devitalisiert und reimplantiert.

Für die Sterilisation potentiell infizierte allogener Sehnentransplantate und die Devitalisierung tumorbefallener autogener Transplantate werden entweder die Gamma-Bestrahlung oder die Autoklavierung bzw. Pasteurisierung verwandt.

Bei der Anwendung dieser Verfahren ergeben sich Auswirkungen auf die biologischen und biomechanischen Eigenschaften von Sehnen und beeinflussen deren Verwertbarkeit.

Werden Sehnen mit 130°C über 10 min. **autoklaviert** oder **thermisch** bei 70°C über 10 min. behandelt, so reduziert sich deren Zugfestigkeit gegenüber der unbehandelten Gruppe auf ca. 50%. Diese Reduktion zeigte sich 12 Wochen nach Reimplantation und läßt sich histologisch durch eine starke Verminderung aktivierter mesenchymaler Zellen und fibrösem Umbau erklären (Sugiura et al., S. 289-294).

Komplikationen entstehen besonders bei Resektion von Gelenken mit inserierenden Sehnen. In einer Studie wurden bei zwei Patienten Kniegelenke reseziert und mit 70°C über 60 min. thermisch behandelt. Das Kniegelenk wurde mit inserierender Patellarsehne entnommen. Der Fall 1 sah eine Durchtrennung der Sehne vor. Daher wurde die Adaptation der Sehnenenden im Fall 1 durch eine Sehnennaht erreicht, die postoperativ zu keinem Anwachsen des unbehandelten mit dem autoklavierten Ende der Sehne führte. Im anderen Fall wurde die Patella durchgesägt. Die Osteotomieeränder der Patella-Enden heilten ohne Komplikationen ein (Watanabe et al., S. 180-186). Für Sehnen ist also eine thermische Behandlung auf Grund der Verminderung ihrer biologischen Eigenschaften zu vermeiden.

Ähnliche biomechanische Einschränkungen ergaben sich nach einer **Gamma-Bestrahlung**. In Studien wurden die Sehnen mit Bestrahlungsdosen zwischen 20 und 80 kGy behandelt.

Schon eine Dosis von 20 kGy reduziert die Zugfestigkeit der Sehnen signifikant (Curran et al., S. 1131-1135; Fideler et al., 643-646; Deyne et al., S. 51-62). Zusätzlich führte eine Bestrahlung zur einer Elongation der Sehnen bis zu 27 % und einer Reduktion des Sehnenquerschnitts, was auf strukturelle Veränderung im Kollagen zurückzuführen ist (Curran et al., S. 1131-1135). Durch die Gamma-Bestrahlung wird das Kollagen vernetzt durch Entstehen intermolekularer „Cross-links“ (Deyne et al., S. 51-62; Goertzen et al., S. 211).

Weiterhin zeigt sich, zusätzlich zur signifikanten Reduktion des E-moduls und der Zugfestigkeit nach 20 kGy, bei steigender Bestrahlungsdosis mit 30 und 40 kGy auch eine Reduktion der Steifigkeit (Fideler et al., S. 643-646; Gibbons et a., S. 209-218). Diese dosisabhängige Reduktion der Steifigkeit und Zugfestigkeit konnte in einem Tierversuch dargestellt werden. Es verminderte sich die Steifigkeit bei 40 kGy um 18 %, bei 60 kGy um 40 % und bei 80 kGy um 42 %. Die Zugfestigkeit reduzierte sich bei 40 kGy um 46 %, bei 60 kGy um 70 % und bei 80 kGy um 79 % (Salehpour et al., S. 903). Eine andere Studie zeigte eine Reduktion der Zugfestigkeit nach 40 kGy um 26 % und eine Reduktion der Steifigkeit um 12 % (Rasmussen et al., S. 188-197).

Diese Ergebnisse beschreiben die Insuffizienz der bisherigen Methoden. Für Patienten werden daher oft Reoperationen notwendig.

Als Alternative zu diesen Methoden soll nun die HHD-Behandlung von Sehnen diskutiert werden.

In der **vorliegenden Arbeit** konnte erstmals gezeigt werden, daß eine **HHD-Behandlung mit 300 bzw. 600 MPa von Flexor-Sehnen** des Schweines keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die biomechanischen Eigenschaften der Sehnen hat. In einem Zugversuch wurden der E-modul und die Zugfestigkeit ermittelt. Anschließend wurde eine immunhistochemische Markierung des Versican und Kollagen I durchgeführt. Insofern, daß kein qualitativer Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der hochdruckbehandelten Gruppe festgestellt wurde. In beiden Gruppen war die Markierung der Proteine idem.

Zunächst war ein wesentlicher Aspekt **dieser Arbeit** die Auswahl einer geeigneten Methode zur **Bestimmung des Sehnenquerschnitts**, da dieser die Grundlage zur Berechnung der biomechanischen Parameter, wie des E-Moduls und der Zugfestigkeit, ist.

Deshalb wurden in Vorversuchen die Methode der MRT-Messung mit der Bestimmung der Fläche über die Pixel und der Messung der großen und kleinen Achse der elliptischen Querschnittsform der manuellen Messung gegenübergestellt.

Mit dem MRT läßt sich ein besserer Weichteilkontrast darstellen, den man durch Zugabe von Kontrastmittel, wie es hier geschehen ist, noch erhöhen kann. Die MRT-Bilder wurden mit Adobe Photoshop bearbeitet. Die Errechnung der Querschnittsfläche geschah über eine Markierung des Sehnenquerschnitts mittels Auswahl der Pixels durch den Untersucher (**MRT-Pixel**). Durch eine gute Kontrastierung läßt sich die Sehningrenze viel besser erkennen und die Fehler, die aufgrund einer Unsicherheit in der Auswahl der Pixel im Sehnenrandbereich entstehen, werden minimiert.

Bei einer **manuellen Messung** mittels Bügelmeßschraube und Meßschieber zur Bestimmung der großen und kleinen Achse eines elliptisch angenommenen Sehnenquerschnitts entstehen Fehler durch Unsicherheiten im Abschätzen der Sehningrenze durch das Augenmaß, die etwa 12% betragen.

Auch die Bestimmung der großen und kleinen Ellipsen-Achse im MRT (**MRT-Ellipse**) und Berechnung des Sehnenquerschnitts mit der Formel für **ovale Flächen** ist nur eine ungenaue Annäherung an den Sehnenquerschnitt mit Fehlberechnungen für die Querschnittsflächen von etwa 10%.

In dieser Studie wurde daher der Sehnenquerschnitt durch das MRT dargestellt und anschließender über die Auszählung der Pixel (**MRT-Pixel**) berechnet.

Es ist durch dieses Verfahren am plausibelsten, Fehler auszuschließen, die durch Näherungen mittels Formeln oder visuelle Abschätzung entstehen. Auch kann man durch die Wahl immer derselben Graustufen der Pixel die Fehler umgehen, die durch das Augenmaß bei der Abmessung der großen und kleinen Achse sowohl bei der manuellen Messung als auch bei der Abmessung des MRT-Bildes entstehen. Verfahren, die mit Meßschiebern oder Bügelmeßschrauben arbeiten, wurden für diese Studie aus Gründen der Ungenauigkeit deshalb ausgeschlossen. Im Programm Adobe Photoshop kann man zufällige Fehler vermindern, indem man immer dieselben Graustufen als Sehnenquerschnitt auswählt.

Um die Messungen des Sehnenquerschnitts zu vereinheitlichen und eine reproduzierbare Spannung der Sehnen zu erzielen, wurden die Sehnen unter einen einheitlichen axialen Zug von ca. 5 N (500 g) gebracht. Für die Messung des Sehnenquerschnittes, der zu Berechnung der biomechanischen Parameter wesentlich ist, wurde eine Zugvorrichtung konstruiert. In der Literatur wurden Sehnenquerschnitte von Kaninchensehnen unter einem Zug von 0,3 N untersucht (Noguchi et al., S. 248). Sehnen des M. quadriceps junger männlicher Erwachsener wurden zur Querschnittsmessung unter eine axialen Zugspannung von 40 bis 50 N gesetzt (Stäubli et al., S. 29). In unserem Falle reichten 500 g bzw. 5 N aus, um eine reproduzierbare Vorspannung zu erzielen.

Zur Darstellung des Sehnenquerschnitts wurde nicht die Sonographie (Rauch et al., 1991, S. 394; Noguchi et al., 2002, S. 247 ff), sondern das MRT gewählt, aufgrund des guten Weichteilkontrastes.

In anderen Studien wurden Silikonabdrücke von Sehnen angefertigt. Diese dann in Scheiben geschnitten und mit schwarzer Tinte abgedruckt und fotografiert. Diese Bilder wurden vergrößert und auf Maßstabpapier entwickelt. Der Querschnitt wurde über die ausgezählten Quadrate berechnet. Zum einen ist dieses Verfahren mit der Herstellung von Silikonabdrücken eine individuell steuerbare Tätigkeit, wodurch unsystematische Fehler entstehen können, zum anderen treten aber auch Schrumpfungsprozesse auf, die den Sehnenquerschnitt kleiner darstellen als er in Wirklichkeit ist. Dieser Schrumpfungsprozess ist zwar ein systematischer Fehler, der nicht signifikant ist und herausgerechnet werden könnte, spricht aber nicht für diese Methode. Doch ist ein Zählen der Quadrate auf dem Maßstabpapier auch nicht genauer als die Berechnung des Sehnenquerschnitts über die Auszählung der Pixel und Unschärfe der Sehnenränder lassen sich hierdurch auch nicht vermeiden (Racce et al., S. 1207ff, 1209).

Ebenfalls wichtig bei der **Präparation** war das sorgfältige Entfernen des Peritendineums, um eine genaue Querschnittsbestimmung zu gewährleisten. Für diese Fragestellung wurde die intraindividuelle seitenvergleichende Untersuchung gewählt. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Studie auf menschliche Sehnen ist gegeben, da menschliche und tierische Sehnen gleichermaßen zu 75 bis 80% des Trockengewichtes aus Kollagen I und Versican bestehen (Siebels et al., S. 14 ff).

Um einer Dehydratation der Sehnen vorzubeugen, geschah die **Aufbewahrung** der Sehnen in mit 0,9iger Ringer-Lösung getränkten Tüchern (Racce et al., S.1208; Noyes et al., S. 346). Auch das Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ist für Sehnen eine gängige Aufbewahrungsmethode (Muellner et al., S. 312, S. 1998, Schreiber et al., S. 46). Die Sehnen der 600 MPa-Gruppe wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um den Einfluß des Tiefgefrierens auf die biomechanischen Eigenschaften so gering wie möglich zu halten.

Für andere Studien werden Gewebe bei Temperaturen in Bereichen zwischen  $-70^{\circ}\text{C}$  (Fideler et al., S. 644) und  $-40^{\circ}\text{C}$  (Kitamura et al., S. 908) und  $-30^{\circ}\text{C}$  (Franke et al., S. 17; Noyes et al., S. 346; Yamamoto et al., S. 286) eingefroren.

Dies hat aber Auswirkungen auf die biomechanischen Eigenschaften insofern, dass die Sehnen, die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren waren, eine signifikant reduzierte Steifigkeit gegenüber den frischen Proben aufwiesen (Turner et al., S. 253ff). Eine statistisch signifikante Abnahme des E-modul-Wertes wurde ebenfalls nach einer Aufbewahrung bei  $-30^{\circ}\text{C}$  über 14 Tage auf den E-Modul menschlicher Sehnen beschrieben (Clavert et al., S. 259ff).

Um in unserer Studie einen Einfluß der Tiefkühlagerung auf die biomechanischen Eigenschaften auszuwerten wurden die E-Modul und Zugfestigkeit der tiefgefrorenen

Kontrollen der 600 MPa-Gruppe den frischen Kontrollen der 300 MPa-Gruppe gegenübergestellt.

Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur lag der Mittelwert des E-moduls der eingefrorenen Sehnen mit 306 MPa mit ca. 22 % über dem Mittelwert der frischen Sehnen (250 MPa).

Die Zugfestigkeit der eingefrorenen Sehnen war um 15 % ebenfalls erhöht gegenüber den frischen Sehnen, doch dies war statistisch nicht signifikant.

Diese Zunahme der Steifigkeit und der Zugfestigkeit durch die Tiefkühlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  war signifikant. Ursachen sind das Tiefgefrieren, aber auch die Umgebungsbedingungen, wodurch es zu einem Wasserverlust des Gewebes kommt. Zusätzlich werden die spröden Fasern durch die Belastung im Zugversuch geschädigt. Dennoch bleibt die Tiefkühlkonservierung eine kostengünstige und einfache Art der Aufbewahrung und ist immer noch als probat anzusehen (Schreiber et al., S. 45-47).

Die Grundlage des Versuchsaufbaus der **biomechanischen Untersuchungen** bildeten bereits durchgeführte Dissertationen und Publikationen, die Sehnen biomechanisch testeten (Noyes et al., S. 344; Franke et al., S. 24ff).

Die biomechanische Testung von Sehnen geschah in einem **Zugversuch**, da die Kraft nur im Sehnenverlauf aufgenommen wird. Scher-, Torsions- oder Biegekräfte spielen keine Rolle. Lediglich in der Möglichkeit des Vordehnens kann variiert werden. Hier kommt es zur Ausrichtung der Sehnenfasern (Siebels et al., S. 18), sodass die Sehne steifer wird.

Physiologisch sind Sehnen im Bewegungsablauf permanent unter Spannung, aber in einem Bereich der reversibel ist und in dem keine bleibende Verformung stattfindet, sonst wären alternierende Bewegungen am lebenden Menschen bzw. Tier nicht möglich.

In dieser Studie sind die Sehnen der 600 MPa-Gruppe wurde in einem Zugversuch bis zum Versagen ohne Vorbelastung getestet. Dagegen sind die Sehnen der 300 MPa-Gruppe im linear-viskoelastischen Bereich zweimalig vorbelastet und erst im 3. Zugversuch bis zum Versagen geprüft worden. In der statistischen Auswertung zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme des E-Moduls zwischen dem 1. und 2. Vordehnen für die frischen Kontrollen der 300 MPa-Gruppe.

**Verfahren mit mehrmaligem Vorbelasten** werden zur Präkonditionierung von Sehnen eingesetzt (Kitamura et al., S. 910; Rasmussen et al., S. 190; Stäubli et al., S. 27; Schreiber et al., S. 45ff). Dadurch wird eine Ausrichtung der Sehnenfasern und eine Abnahme der Welligkeit der Kollagenfasern erzeugt. Dies bewirkt eine Erhöhung der intermolekularen Kräfte, wie den Van-der-Waals-Kräften auf molekularer Ebene. Hierdurch kommt es zu einer Zunahme der Steifigkeit bzw. des E-Moduls (Siebels et al., S. 18ff).

Diese Veränderungen durch Vorbelastung konnten wir auch in unserer Studie in einer signifikante Zunahme der Steifigkeit zwischen den Belastungszyklen sehen.

Die Einspannung geschah durch 2 Klemmbacken. Durch die Verteilung der Reibung auf den gesamten Sehnenanteil in den Klemmbacken mittels 6 Schrauben soll das Reißen am Übergang von freier Einspannlängen in die eingespannte Sehnen vermieden werden. Dass ein Reißen der Sehnen während der Testung in diesem Bereich oft nicht ganz vermeidbar ist, wird auch aus der Literatur ersichtlich. Hier stellt sich die Schwachstelle der Sehne an diesem Übergang dar (Stäubli et al., S. 29).

Für die **biomechanische Auswertung der HHD-Behandlung mit 300 und 600 MPa** wurden die HHD-behandelten Flexor-Sehnen ihren zugehörigen unbehandelten Kontrollgruppen der Gegenseite gegenübergestellt.

Für die Auswertung der 300 MPa-Gruppe war der **gemittelte E-Modul-Wert 348 MPa** und somit um ca. **8 %** höher als die zugehörige Kontrollgruppe (**321 MPa**).

Der E-Modul-Werte der **600 MPa-Gruppe** war mit **313 MPa** um ca. **25 %** höher als seine Kontrollgruppe (**249 MPa**). Diese Zunahme um ca. **25 %** war dennoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,05$ ).

Diese Werte für das **E-Modul** liegen in etwa der Größenordnung der E-Modul-Werte für Ziegen (410 MPa) und Menschen (520 MPa) (Siebels et al., S. 23). In der Literatur werden für E-Modul-Werte von Sehnen des Schweines im Bereich zwischen 160 MPa und 1600 MPa angegeben. Dabei spielt zum einen das Alter der Tiere eine Rolle und auch, ob es eine Flexor- oder Extensorsehne ist (Shadwick et al., S. 1035).

Für die **Zugfestigkeit** lag der Mittelwert der **300 MPa-Gruppe** bei **59 MPa** und um ca. **13 %** höher als der Wert der zugehörigen unbehandelten Kontrollgruppe mit **52 MPa**.

Die **600 MPa Gruppe** mit **59 MPa** unterschied sich nur um ca. **1 %** von ihrer Kontrollgruppe (**60 MPa**).

Auch hier liegen die Werte der Zugfestigkeit in der Größenordnung, die für Flexoren 4 Monate alter Schweine angegeben werden, nämlich zwischen 80 und 90 MPa. Für Extensoren liegt sie im Bereich von 40 bis 50 MPa. Menschliche Sehnen besitzen eine Zugfestigkeit bis zu 100 MPa (Shadwick et al., S. 1037ff).

Diese Auswertung ergab keine statistisch signifikanten Auswirkungen der Hochdruckbehandlung mit **Druckstufen von 300 MPa und 600 MPa** auf die biomechanischen Eigenschaften.

Nachdem aber der E-Modul der hochdruckbehandelten Proben in der 600 MPa-Gruppe um ca. 25 % höher lag als der des Kontrollkollektives und im Vergleich dazu die Zunahme des E-modul-Wertes in der 300 MPa Gruppe nur 10 % war, muß zumindest erwogen werden, ob die Zunahme dieses Parameters beispielsweise durch Veränderungen auf molekularer Ebene bedingt ist. Solche könnten in diesem Druckbereich tendenziell eine Erhöhung der Stabilität des Gewebes verursachen im Sinne von Entstehen non-kovalenter Bindungen zwischen Molekülen oder Konformationsänderungen.

Durch die HHD-Behandlung werden vor allem die nicht-kovalenten Bindungen zwischen und innerhalb von Makromolekülen beeinflusst. Die kovalenten Bindungen werden durch den hydrostatischen Hochdruck im wesentlichen nicht verändert (Masson et al., 2001, S. 85), so daß Vitamine, Aromen, Farbstoffe und Alkaloide im wesentlichen nicht beeinflusst werden. Dadurch, daß aber nicht-kovalente Bindungen beeinflusst werden, kann es zu einer Konformationsänderung kommen. Dies wird besonders im Bereich der Haltbarmachung und zur Reduzierung der Antigenität von Nahrungsmitteln benutzt, wo die HHD-Behandlung schon seit Jahren eingesetzt wird (Meyer-Pitroff et al., 2003, 2<sup>nd</sup> International Conference, S. 296, 301). Die drucksensitivsten Bio-Moleküle sind die Proteine. Hier wirkt sich eine HHD-Behandlung auf die schwachen intramolekularen Wechselwirkungen aus, so daß eine Stabilisierung bzw. Destabilisierung resultiert, die beispielsweise die Aktivität oder Spezifität von Enzymen wesentlich verändern kann. Der Einfluß von hohen Drücken kann Proteine auch denaturieren (Meyer-Pitroff et al., 2001, S. 3). Drücke bis 300 MPa verändern vor allem deren dreidimensionale Struktur. Unter steigendem Druck kann durch Störung der hydrophoben Wechselwirkungen und elektrostatischen Kräfte Wasser ins Innere der Proteine penetrieren, so daß diese anschwellen. Den Zustand dieser Volumenzunahme bei Drücken bis 200 MPa nennt man „molten globule“. Gerade diese Volumenzunahme bewirkt eine Konformationsänderung, die wiederum für die Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen verantwortlich ist (Masson et al., 1999, S. 50, 51). Diese Konformationsänderungen kann man sich in der pharmazeutischen Industrie zunutze machen, um Proteine unter höheren Drücken ab 200 MPa zu Falten oder zu Entfalten und die Katalisierung von enzymabhängigen Reaktionen zu verändern (Masson et al., 2001, S. 86; Kharakoz et al., 1997, S. 10276).

Daher war die **immunhistochemische Markierung** des Kollagen I und des Versicans zusätzlich zur Bestimmung der biomechanischen Parameter, wie E-Modul und Zugfestigkeit,

zur Erfassung etwaiger Konformationsänderungen bzw hochdruckinduzierter struktureller Veränderungen wichtig.

Ausgewählt wurde das extrazelluläre Kollagen Typ 1, das ein typischer Bestandteil der faserreichen Bindegewebe ist und Sehnen und Bändern ermöglicht großen Zugspannungskräften zu widerstehen (Schlüter et al., S.51; Siebels et al. S. 16; Yin et al., S. 713).

Ein anderes charakteristisches extrazelluläres Proteoglykan der Zugsehnen ist vor allem das Versican. Es wird wie Kollagen I von den Sehnenfibroblasten sezerniert und soll der Interaktion zwischen den Komponenten des Extrazellularraums und den Zelloberflächen-Glykoproteinen dienen (Schlüter et al., S.56). Die Methode der immunhistochemischen Markierung ist für den Nachweis von Kollagen Typ 1 oder Versican seit Jahren etabliert (Milz et al., 1998, S. 264 ff; Milz et al., 1999, S. 139ff; Milz et al., 2001, S. 1765ff; Milz et al., 2002, S. 1330ff; Tischer et al., 2002, S. 457ff; Boszczyk et al., 2001, E 338ff).

Die immunhistochemische Markierung ergab eine **gleichmäßige Markierung** den mit 300 bzw. 600 MPa hochdruckbehandelten Sehnen und den unbehandelten Kontrollen.

Interpretieren läßt sich das Ergebnis der immunhistochemischen Markierung insofern, daß die Antikörper-Bindungsstelle, an dem der mit dem Farbstoff markierte Antikörper andockt, nicht durch z.B. eine Konformationsänderung verändert wurde und sich somit die Markierung in der behandelten und in der unbehandelten Gruppe gleich darstellte.

Dies ist vereinbar mit dem biomechanischen Ergebnis, da auch strukturell keine Veränderungen nachgewiesen werden konnten.

Festzustellen ist eine Überlegenheit dieser Devitalisierungsmethode, die weder statistisch signifikanten Einfluß auf die biomechanischen Parameter besitzt, noch Änderungen in der Markierung der wesentlichen Sehnenbestandteile (Kollagen I und Versican) hervorruft.

Da diese Studie eine in vitro Untersuchung ist, können wir nicht ausschließen, daß ein signifikante Verminderung der biomechanischen Parameter nach Reimplantation der behandelten autogenen Sehnentransplantate durch Auftreten von Umbauvorgängen, Nekrosen oder Devitalisierung hervorgerufen wird (Butler et al., S. 68-79; Yamamoto et al., 2000, S. 284-291; Kleiner et al., S. 466-474). Biomechanische Untersuchungen zum Kreuzbandersatz durch Transplantation autogener Patellarsehne ergaben eine postoperative Verminderung der biomechanischen Parameter nach Transplantation, die bis zu einem Jahr nach der Operation auftreten kann. Diese Prozesse traten unabhängig von einer HHD-Behandlung auf (Ballock et al., S. 474-485; Cabaud et al., S. 395-401).

In diesem Forschungsprojekt konnte gezeigt werden, daß durch eine HHD-Behandlung Zellen irreversibel geschädigt werden, während strukturelle Bestandteile von Knochen, Knorpel und Sehnen unbeeinflusst bleiben.

Daher bietet die HHD-Behandlung eine innovative Methode in der orthopädischen Chirurgie zur Inaktivierung von Tumorzellen, die eine Behandlung von tumorbehafteten Knochensegmente samt erhaltener Sehnen- und Ligamentansätze erlaubt ohne daß eine Reduktion der biomechanischen und biologischen Eigenschaften zu erwarten wäre. Dies würde für die Patienten in der klinischen Anwendung ein gutes funktionelles Ergebnis bedeuten.

## **5. Zusammenfassung der Arbeit**

Knochendefekte nach Resektion maligner Knochentumore können auf verschiedene Arten rekonstruiert werden. Tumorbefallene Knochensegmente werden beispielsweise durch extrakorporale Gamma-Bestrahlung oder Autoklavierung devitalisiert und anschließend reimplantiert. Beide Methoden haben jedoch unerwünschte Wirkungen auf die Knochensubstanz, indem sie die biomechanischen Eigenschaften vermindern. In dieser Hinsicht ist die Hydrostatische Hochdruck-Behandlung des Knochens eine neue vorteilhafte Technologie, da sie in der präklinischen Testung Tumorzellen inaktivierte, die biomechanischen und biologischen Eigenschaften des Knochens aber nicht veränderte. Das Ziel dieser Pilotstudie war eine Untersuchung der biomechanischen und immunhistochemischen Eigenschaften von Schweinesehnen nach einer Hochdruckbehandlung. Mit dem Ergebnis soll eine Aussage getroffen werden, ob Sehnen und Bänder künftig en Bloc mit dem tumorbefallenen Knochensegment reseziert, hochdruckbehandelt und wieder reimplantiert werden können.

Neunzehn Achilles-Sehnenpaare von 4 Monate alten Schweinen wurden von den Hinterläufen des gleichen Tieres gewonnen. Nach der Präparation wurde der Sehnenquerschnitt im MRT bestimmt. Eine Sehne des Sehnenpaares wurde mit 300 MPa (n=9) oder 600 MPa (n=10) behandelt. Die Auswahl erfolgte zufällig, nicht über ein Randomisierungsverfahren. Die kontralaterale Sehne blieb als Kontrolle unbehandelt.

In einem Zugversuch bis zum Versagen wurden die Zugfestigkeit und der E-Modul ermittelt. Wichtig war in diesem Versuchsaufbau die intraindividuelle Vergleichsmessung. In der Auswertung der E-Modul-Werte der 600 MPa-Gruppe lag der E-Modul-Wert der hochdruckbehandelten Sehnen um 25% über dem E-Modul-Wert der unbehandelten Kontrolle. Diese Abweichung erwies sich in der statistischen Auswertung als nicht signifikant, auch die Zugfestigkeit ergab keine statistische Änderung nach einer HHD-Behandlung mit 600 MPa. Für die biomechanischen Parameter der 300 MPa – Gruppe zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Änderungen.

Die Werte für die gemessenen Parameter Elastizitätsmodul und Zugfestigkeit der Sehnen zeigten sich mit Literaturdaten vergleichbar. Dies gilt ebenso für das Ausmaß von deren Streuung.

Da eine Hochdruckbehandlung auch Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur der Proteine bewirkt wurde auf eine immunhistochemische Markierung des Kollagen Typ 1 und des Versicans wertgelegt. Diese zeigte keinerlei qualitative Unterschiede in der Markierung zwischen den hochdruckbehandelten Sehnen mit 300 bzw. 600 MPa und den unbehandelten Kontrollen.

Zunächst bestätigen die Daten unserer Studie die primäre Stabilität von Sehnen nach einer HHD-Behandlung und geben keine Auskunft über die Langzeitfestigkeit nach einer Reimplantation. Wir können nicht ausschließen, daß es zu einem Festigkeitsverlust der Sehnen nach HHD-Behandlung und Reimplantation kommt, die aufgrund der Devitalisation entsteht.

Diese Ergebnisse lassen es realistisch erscheinen in vivo Versuche am Groß- und Kleintier im Rahmen des Forschungsprojektes durchzuführen.

Zukünftig könnte die HHD-Behandlung in der orthopädischen Chirurgie eine große Rolle spielen, indem tumorbefallenen Knochensegmente devitalisiert werden ohne daß sich die biomechanischen Eigenschaften von Sehne verändern. Somit könnte eine en bloc Resektion zur Devitalisation von Knochensegmenten mit Erhalt der Sehnenansätze erfolgen, wodurch sich ein besseres funktionales Ergebnis erzielen läßt.

## **6. Literaturverzeichnis**

Ahmed A. R., Watanabe H., Takagishi K., Reconstructon with autologous pasteurised whole knee joint I: experimental study in a rabbit model, J Orthop Sci 8 (2003), 170-179

Anderson H. N., Bruun C., Sondergard-Peterson P. E., Rekonstruktion of chronic insufficient anterior cruciate ligament in the knee using a synthetic dacron prothesis, The American Journal of Sports Medicine 20, 1 (1992) 120 – 121

Araki N., Myoui A., Kuratsu S., Hashimoto N., Inoue T., Kudwara I., Ueda T., Yoshikawa H., Masaki N., Uchida A., Intraoperative extracorporeal autogenous irradiated bone grafts in tumor surgery, Clin. Orthop. Relat. Res. Nov 368 (1999) 196-206

Arroyo, G., Sanz, P.D., Préstamo, G.: Effect of High Pressure on the reduction of Microbial Populations in Vegetables Journal of Applied Bacteriology 82 (1997) 735-742

Asada N., Tsuchiya H., Kitaoka K., Mori Y., Tomita K.: Massiv autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery, Acta Orthop Scand 68 (1997) 392 – 395

Ballock R. T., Woo S. L., Lyon R. M., Hollis J. M., Akeson W. H., Use of patellar tendon autograft for cruciate ligament reconstruction in the rabbit: a long term histologic and biomechanical study, j Orthop. Res. 7,4 (1989), 474-485

Butler D. L., Grood E. S., Noyes F. R., Olmstead M. L., Hohn R. B., Arnoczky S. P., Siegel M. G., Mechanical properties of primate vascularised versus nonvascularised patellar tendon grafts; changes over time, J Orthop. Res. 7,1 (1989), 68-79

Böhm P, Springfield R, Springer H.: Re-implantation fo autoclaved bone segments im musculosketal tumor surgery. Clinical experience in 9 patients followed for 1.1 – 8.4 years and review of literature, Arch Orthop Trauma Surg 118 (1998) 57 – 65

Böhm P, Fritz J, Thiede S, Budach W.: Reimplantation of extracorporeal irradiated bone segments in musculoskeletal tumor surgery, Clinical experience im eight patients and review of the literature, Langenbecks Arch Surg 387 (2003) 355 - 356

Boszczyk A. A., Putz R., Büttner A., Benjamin M., Milz S., An immunohistochemical study of the dorsal capsule of the lumbar and thoracic facet joints., Spine 26 (2001), E338-E343 (Electronic publication – [http://www. Spinejournal.com](http://www.Spinejournal.com))

Cabaud H. E., Feagin j. A., Rodkey W. G., Acute anterior cruciate ligament injury and augmented repair, The American Journal of Sports Medicine 8,6 (1980), 395-401

Clavert P., Kempf J.-F., Bonnomet F., Boutemy P., Marcelin L., Kahn J.-L., Effects of freezing/thawing on the biomechanical properties of human tendons, Surg Radiol Anat 23.4 (2001), 259-262

Curran A. R., Adams D. J., Gill J. L., Steiner M. E., Scheller A. D., The biomechanical Effects of low-dose Irradiation on bone-patellar tendon-bone allografts, Am J Sports Med. 32,5 (2004); 1131-1135

Chen W. M., Chen T. H., Huang C. K., Chiang C. C., Lo W. H., Treatment of malignant bone tumors by extracorporeally irradiated autografts – prosthetic composite arthroplasty, J BoneJoint Surg [Br] 84-B (2002), 1156-61

De Deyne P., Haut R. C., Some Effects of gamma irradiation on patellar tendon allografts, Connective Tissue Research 27 (1991), 51-62

Diehl P., Höhn G., Hadaller M., Grebner S., Grading R., Meyer-Pittroff R., Mittelmeier W., Einfluß der hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf die mechanischen Eigenschaften des Knochens, Biomaterialien 2, 2/3 (2001) 121

Diehl P., Schmitt M., Blümelhuber G., Frey B., van Laak S., Fischer S., Muehlenweg B., Meyer-Pittroff R., Gollwitzer H., Mittelmeier W., Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery, Oncology Reports 10 (2003), 1851-1855

Diehl ., Reunion U., Gollwitzer H., Magdolen U., Gerdesmeyer L., Schauwecker J., Tuebel J., Grading R., Mittelmeier W., Schmitt M., Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability, Oncol Rep 12 (2004) 369 – 737

Diehl P., Schmitt M., Gollwitzer H., Grading R., Mittelmeier W., Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure and still maintaining biomechanical properties of tissue

als a novel supporting technique in prthopedic surgery. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society San Francisco, CA, USA (2004)

Diehl P., Schmitt M., Schauwecker J., Eichelberg K., Gollwitzer H., Gradinger R., Goebel M., Preissner K. T., Mittelmeier W., Magdolen U., Effect of high hydrostatic pressure on biological properties of extracellular bone matrix proteins. *Int J Mol Med* 16 (2005) 285 - 289

Diehl P., Naal F.-D., Schauwecker J., Steinhauser E., Milz S., Gollwitzer H., Mittelmeier W., Biomechanical properties of articular cartilage after high hydrostatic pressure treatment, *Biomed Tech* 51 (2006), 8-14

Dunn M. G., Tria A. J., Kato Y. P., Bechler J. R., Ochiner R. S., Zawadsky J. P., Silver F. H., Anterior cruciate ligament reconstruction using a composite collagenous prosthesis, *American Journal of Sports Medicine* 20,5 (1992) 507 - 612

Elke R., Partikelkrankheit, ist die Tribologie ein Thema in der Revisionschirurgie?, *Orthopäde* 30 (2001), 258-265

Enneking W. F., Domenico A., Campanacci M. D., Reconstruction with autologous pasteurized bone transplantation, *Chirurg* 62:10 (1991), 763-765

Fideler B. M., Vangsness C. T. Jr., Lu B., Orlando C., Moore T., Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone.patellar tendon.bone allografts, *Am J Sports Med* 23, 5 (1995), 643-6

Franke J. S., Biomechanisch experimentelle Untersuchungen zum Reißverhalten der menschlichen Achillessehne. Dissertation (1998) Technische Universität München, Klinik und Poliklinik für Sportverletzungen

Goertzen M. J., Clahsen H., Burrig K. F., Schulitz K. P., Sterilisation of canine anterior cruciate allografts by gamma irradiation in argon, Mechanical an neurohistological properties retrained one year after transplantation., *J Bone Joint Surg [Br]* 77-B (1995), 205-12

Grewe S. R., Tearse D. S., Bech C. L., The gore-tex anterior cruciate ligament prosthesis, *American Journal of Sports Medicine* 20,3 (1992) 246 – 253

Hammer K., Himpfel J., Lehrbuch der Physik,

R. Oldenbuourg Verlag München-Düsseldorf 2. Auflage (1962)

Hong A., Stevens G., Stalley P., Pendlebury S., Ahern V., Ralston A., Estoesta E., Barrett I., Extrakorporeale Irradiation für malignante Knochen Tumoren, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 50, 2 (2001), 441-447

Jurkiewicz E., Villas-Boas M., Silva J. L., Weber G., Hunsmann G., Clegg M., Inaktivierung von Simian Immunodefizienz Virus durch hydrostatische Druck, *Biophysical Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, July (1995) 6935 - 6937

Kharakoz D.P., Partial volumes and compressibilities of extended polypeptide chains in aqueous solution: Additive scheme and implication of protein unfolding at normal and high pressure, *Biochemistry* 36 (1997) 10276-10285

Kharakoz D. P., Protein compressibility, dynamics and pressure, *Biophysical Journal* 79 (2000) 511 – 525

Kleiner J. B., Amiel D., Roux R. D., Akeson W. H., Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft, *Journal of Orthopaedic Research* 4 (1986) 466 - 474

Kitamura N., Yasuda K., Masanori Y., Biomechanical comparisons for three posterior cruciate ligament reconstruction procedures with load controlled and displacement-controlled cyclic tests, *The American Journal of Sports Medicine* 31,6 (2003), 907-914

Knaepler H, Haas H, Püschel HU., Biomechanische Eigenschaften thermisch und radioaktiv behandelte Spongiosa, *Unfallchirurg* 17 (1991) 194 - 199

Knaepler H, Ascherl R, von Garrel Th, Gotzen L., Richtlinien zur allogenen Knochen transplantation, *Chirurg* 62 (1991) 763 – 765

Knaepler, H., von Garrel, T., Seipp, H.M., Ascherl, R.: Experimentelle und klinische Untersuchungen zur thermischen Desinfektion allogener Knochen transplantatione und deren Einbauverhalten, *Orthop. Praxis* 1 (1992) 23-27

Knaepler H., von Garrel Th., Gotzen L., Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochen transplantatione / Harald Knaepler. – Berlin; Heidelberg; New York; London;

Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest; Springer, 1994 (Hefte zur Zeitschrift „Der Unfallchirurg“; 235)

Knaepler, H.: Die allogene Knochen transplantation – Chancen und Risiken. Vortrag DGU, Berlin 1999

Knaepler H, von Garrel Th., Sind die Risiken allogener Knochen transplantate noch vertretbar?, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie (Kongressband 1999) 93 - 98

Kühne, J.-H., Refior, H.J.: Möglichkeiten zur HIV-Inaktivierung homologer Knochen transplantate. Unfallchirurg 19 (1993) 3113-317

Masson P., Action de la pression hydrostatique sur les protéines: émergence de la biotechnologie des hautes pressions, application pharmaceutiques et médicale potentielle. Ann pharm Fr 57 (1999) 49-55

Masson P., Tonello D., Balny C., High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science, Journal of Biomedicine and Biotechnology 1,2 (2001), 85-88

Meyer-Pitroff R., Ultrahochdruck in der Lebensmittel- und Medizintechnik, Vortrag auf dem 1. Hochschultag des Wissenschaftszentrums Weihenstephan am 29. Juli 2001

Meyer-Pitroff R., High pressure applications in medicine, In: Winter R (Editor) Advances in high pressure bioscience and biotechnology II., Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Conference on high pressure bioscience and biotechnology, Dortmund, September 16-19, 2002, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2003), 295-305

Meyer-Pitroff R, Gollwitzer H, Mittelmeier W:, Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopaedic surgery, Oncology Reports 10 (2003) 1851 - 1855

Milz S., McNeilly C., Putz R., Ralphs J. R., Benjamin M., Fibrocartilages in the extensor tendons of the interphalangeal joints of human toes., Anat Rec 252 (1998), 264-270

Milz S., Putz R., Ralphs J. R., Benjamin M., Fibrocartilage in the extensor tendons of the human metacarpophalangeal joints, Anat. Rec. 256 (1999), 139-145

Milz S., Schlüter Th., Putz r., Moriggle B., Ralphs J. R., Benjamin M., Fibrocartilage in the transverse ligament of the human atlas, Spine 26 (2001), 1765-1771

Milz S., Regner F., Putz R., Benjamin M., Immunohistochemical studies on the tendon of the human superior oblique muscle and its associated pulley, Invest Ophthalmol vis Sci 43 (2002), 1330-1334

Mittelmeier W., Braun C., Gradinger R., Defektfrakturen am Unterschenkel – verschiedene Knochenersatzformen, Chirurg 67 (1996), 1087-1092

Mittelmeier H., Mittelmeier W., Gleitz M., Mineralisches, spongiöses Knochenersatzmaterial Pyrost, experimentelle Grundlagen und 13 Jahre klinische Erfahrung bei über 1000 Fällen, Orthopäde 27 (1998), 126-135

Morris H.G., FRACS, Capanna R., MD, Del Ben M, MD, Campanacci D., MD, Prosthetic reconstruction of the proximal femur after resection for bone tumors, The Journal of Arthroplasty 10, 3 (1995) 293-299

Muellner T., Reihnsner R., Mrkonjic L., Kaltenbrunner W., Kwasny O., Schabus R., Mittlboeck M., Vécsei V., Twisting of patellar tendon grafts does not reduce their mechanical properties, Journal of Biomechanics 31 (1998) 311 - 315

Naal F. D., Mengele K., Schauwecker J., Gollwitzer H., Gerdesmeyer L., Reunion U., Mittelmeier W., Gradinger R., Schmitt M, Diehl P., High hydrostatic pressure-induced cell death in human chondrocytes and chondrosarcoma cells. Anticancer Res 25 (2005) 1977 - 1982

Natarajan M., Bose J. C., Rajkumar G., Proximal femoral reconstruction with custom mega prosthesis, Int. Orthop. 27 (2003), 175-179

Noguchi M., Kitaura T., Ikoma K., Kusaka Y., A method of in-vitro measurement of the cross-sectional area of soft tissues using ultrasonography, J Orthop Sci 7 (2002), 247-251

Noyes F. R., Butler D. L., Grood E. S., Zernicke R. F., Hefzy M. S., Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. J of Bone and Joint Surgery. Incorporated 66-A 3 (1984) 344 - 352

Racce A., Amis A. A., Cross-sectional area measurement of soft tissue. A new casting method, *J Biomechanics* 29,9 (1996), 1207-1212

Rasmussen T. J., Feder M. S., Butler Ph. D., Noyes F. R., The effects of 4 Mrad of  $\gamma$  irradiation on the initial mechanical properties of bone-patellar tendon- bone grafts, *Arthroscopy*, 10,2 (1994), 188-197

Rauch G., Gerbersdorf M., Dörner P., Lengsfeld M., Griß P., Biomechanische Untersuchung über die Zugfestigkeit lyophilisierter und tiefgefrorener humaner Achillessehnen nach Gamma. Und Ethylenoxid-Sterilisation, *Z. Orthop.* 129 (1991), 393-399

Refior H. J., Hackenbroch M, Wirth C. J., Knochenersatzstoffe, *Orthopäde* 27 (1998) 71

Roberts T. S., Drez D., Mc Carthy W., Paine R., Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylen oxide-sterilised, bone-patellar tendon-bone allografts, *Am J Sports Med.* 19,1 (1991), 35-41

Sabo D., Bernd L., Ewerbeck V., Eble M., Wannemacher M., Schulte M., Lokale Behandlung primär maligner Knochentumoren. Intraoperative extrakorporale Bestrahlung und Replantation, *Unfallchirurg* 102 (1999), 580-588

Sabo D., Bernd L., Buchner M., Treiber M., Wannemacher M., Ewerbeck V., Parsch D., Intraoperative extrakorporale Irradiation und Replantation (IEIR) in der lokalen Behandlung primär maligner Knochentumoren, *Orthopäde* 32 (2003) 1003-1012

Salehpour A., Butler D. L., Proch F. S., Schwartz H. E., Feder S. M., Doxey C. M., Ratcliffe A., Dose-dependant response of gamma irradiation in mechanical properties and related biochemical composition of goat bone-patellar tendon-bone allografts., *J Orthop Res* 13, 6 (1995), 898-906

Schauwecker J., Wirthmann L., Schmitt M., Tuebel J., Magdolen U., Gradinger R., Mittelmeier W., Diehl P., Effect of extravaskular high hydrostatic pressure on cellular outgrowth from tumor-afflicted bone., *Anticancer Research* 26 (2006) 3-7

Schlüter T., Faserknorpel im Ligamentum transversum atlantis, Dissertation (2002), Ludwig-Maximilians-Universität zu München, Anatomische Anstalt

Schreiber U., Buchmann S., Steinhauser E., Mittelmeier W., Effekt der Tiefkühlagerung von Wirbelsäulenpräparaten auf deren biomechanisches Verhalten, *Biomaterialien* 5,1 (2004) 44 - 47

Shadwick R. E., Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age, *The American Physiological Society* (1990) 1033 - 1040

Siebels W., Optimierung von Werkstoffen für die Bandersatzchirurgie, Dissertation (1994) TU München Fakultät für Maschinenwesen

Stäubli H. U., Schatzmann L., Brunner P., Rincòn L., Nolte L.-P., Mechanical tensile properties of the quadriceps tendon and patellar ligament in young adults, *American Journal of Sports Medicine* 27,1 (1999), 27-34

Steinhauser E., Diehl P., Hadaller M., Schauwecker J., Busch R., Gradingner R., Mittelmeier W., Biomechanical investigation of the effect of high hydrostatic pressure treatment on the mechanical properties of human bone. *J Biomed Mater Res ind Press* (2005) 130-135

Sterling J. c., Meyers M. C., Calvo R. D., Allograft failure in cruciate ligament reconstruction. Follow up evaluation of eighteen patients, *Am J Sports Med.* 23,2 (1995), 173-178

Sugimoto M, Takahashi S, Toguchida J, Kotoura Y, Shibamoto Y, Yamamuro T., Changes in bone after high-dose irradiation, *J Bone Joint Surg [Br]* 73 (1991), 492-497

Sugiura H., Sato K., Miura T., Nakanishi K., Rong Y., Tendon insertions onto allografts pretreated with heat and/or bone surface demineralization, *Clin Orthop* 295, Oct (1993) 289 - 294

Sys G., Uttendaele D., Poffyn B., Extracorporeally irradiated autografts in pelvic reconstruction after malignant tumor resection, *International Orthopaedics (SICOT)* (2002) 26: 174-178

Tischer T., Milz S., Maier M., Schieker M., Benjamin M., An immunohistochemical study of the rabbit suprapatella, a sesmoid fibrocartilage in the quadriceps tendon containing aggrecan, *J Histochem Cytochem* 50 (2002), 955-960

Turner W. D., Vasseur P., Gorek J., Rodrigo J.J., Wedell J. R., An in vitro study of the structural properties of deep-frozen versus freeze-dried, ethylen oxide-sterilized canine anterior cruciate ligament bone-ligament-bone Preparations, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 230, May (1988) 251 - 256

Uyttendaele D., De Schryver A., Claessens H., Roels H., Berdvens P., Mondelaers W., Limb conservation in primary bone tumorss by resection, extrakorporeal irradiation and re-implantation, *J Bone Joint Surg [Br]* 70-B (1988), 348-53

Yamamoto E., Tokura S., Noritaka Y., Hayashi K., Mechanical properties of collagen fascicles form in situ frozen and stress-shielded rabbit patellar tendons, *Clinical Biomechanics* 15 (2000) 284 - 291

Yamamoto T., Hitora T., Marui T., Akisue T., Nagira K., Kawamoto T., Yoshiya S., Kurosaka M., Reimplantation of autoclaved or irradiated cortical bones invaded by soft tissue sarcomas, *Anticancer Res* 22, 6B (2002) 3685 – 3690

Yamamoto N., Tsuchiya H., Nojima t., Sumiya H., Tomita K., Histological and radiological analysis of autoclaved bone 2 years after extirpation, *J Orthop Sci* 8 (2003) 16-19

Yin C., Wayne J. S., Jiranek W. A., Zuelzer W. A., Biomechemical am molekular homogeneity in the patellar tendon of the immature Pig. *J Orthop Res* 15,5 (1997), 712-725

Yoshiya S., Andrish J. T., Manley M. T., Kurosaka M., Augmentation of anterior cruciate ligament reconstruction in dogs with prostheses of different stiffnesses, *J Orthop Res* 4 (1986), 475-485

Voggenreiter G., Ascherl R., Blümel G., Schmit-Neurburg K. P., Extracorporal irradiationand incorporation of bone grafts, *Acta Orthop Scand* 67, 6 (1996) 583 – 588

Watanabe H., Ahmed A. R., Shinozaki T., Yanagawa T., Terauchi M., Takagishi K., Reconstruction with autologous pasteurised whole knee joint II: application for osteosarcoma of the proximal tibia, *J Orthop Sci* 8 (2003), 180-186

Wuisman P., Gohlke F., Witlox A., Allografts in der Rekonstruktion von knöchernen Defekten bei primär malignen Knochentumoren, *Orthopäde* 32 (2003), 994-1002

Wuytack E. Y., Diels A. M. J., Michiels C. W., Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure, *International Journal of Food Microbiology* 77 (2002), 205-212

Zoricic S., Bobinac D., Lah B., Maric I., Cvijanovic O., Bajek S., Golubovic V., Mihelic R., Study of the healing process after transplantation of pasteurized bone grafts in rabbits, *Acta Med. Okayama* 56, 3 (2002), 121-128

## **7. Anhang**

### **7.1. Abkürzungsverzeichnis**

BMP: bone morphogenetic protein  
DAB: Chromogen  
ECIR: extrakorporale Irradiation und Reimplantation  
E-Modul: Elastizitätsmodul  
IEIR: intraoperative extrakorporale Irradiation und Reimplantation  
HHD-Behandlung: Hydrostatische Hochdruck-Behandlung  
HHD: Hydrostatische Hochdruck  
kGy: kilo Gray  
MPa: Mega Pascal  
MRT: Magnetresonanztomographie  
PBS: Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

### **7.2. Tabellenverzeichnis** **(Seite)**

Tab. 1: Ergebnisse der Berechnungen der Sehnenquerschnitte	31
Tab. 2: Querschnittsflächen der Sehnenpräparate berechnet aus der Summe der Pixel	33
Tab. 3: E-Modul [N/mm <sup>2</sup> ] hochdruckbehandelter Sehnen und deren Kontrollen	36
Tab. 4: Zugfestigkeit [N/mm <sup>2</sup> ] hochdruckbehandelter Sehnen und deren Kontrollen	38
Tab. 5: E-Modul-Werte der unbehandelten Kontrollen zu der 300MPa Gruppe	43

### **7.3. Abbildungsverzeichnis** **(Seite)**

Abb. 1: Prüfprotokoll	14
Abb. 2 Berechnung der Gesamtfläche aus Ar und Ak	17
Abb. 3: Darstellung der Querschnittsmessung mittels Bügelmeßschraube und Meß- Schieber	17
Abb. 4: Bügelmeßschraube	18
Abb. 5: digitaler Meßschieber	18
Abb. 6: Einspannung aus Kunststoff zur Vorspannung der Sehnen mit 300 g für die MRT- Messung	19
Abb. 7: Kunststoffklemmböden für die MRT-Messung	20
Abb. 8: Modell für die Berechnung des Sehnenquerschnitts unter der Annahme einer Ellipsen-Form	21

Abb. 9: schematische Darstellung der Hochdruckanlage	23
Abb. 10: Einspannung der Sehne in die Universalprüfmaschine vor dem Zugversuch	26
Abb. 11: Klemmbacken für den Zugversuch mit 6 Schrauben pro Halterungsvorrichtung	27
Abb. 12: Klemmbacken	28
Abb. 13: Gerissene Sehne nach dem Zugversuch	34
Abb. 14: Boxplot des E-Moduls der beiden Versuchsgruppen	37
Abb. 15: Boxplot der Zugfestigkeit der beiden Versuchsgruppen	39
Abb. 16: Boxplot: Statistische Auswertung der E-Modul – Werte unbehandelter Sehnen	40
Abb. 17: Boxplot: Statistische Auswertung der Zugfestigkeit unbehandelter Sehnen	41
Abb. 18: Boxplot der Differenzen der E-Modul – Werte unbehandelter Sehnen	44
Abb. 19: Sehne 9	46
Abb. 20: Sehne 19	46

#### **7.4. Immunhistochemisches Protokoll**

Protokoll: Immunofärbeverfahren mit Vectastain DAB-Kit

- Präparatshnitte mit Dako-pen umranden
- 5 min Rehydrieren in PBS + Tween
- Enzym – Behandlung (30 min bei 37°C)

Monoklonal:

Col 1 mit HC

12C5 (Versicab) mit ABC

Mono-Kontrolle mit Chonroitinase ABC oder HC

[Hyaluronidase/Chondroitinase ABC (H 1.5 U/ml + C 0.25 U/ml)]

Polyklonal:

4H12 (Col 3) mit HC

Poly-Kontrolle mit Chondroitinase HC

- Blockierung mit 1:20 Pferdeserum (60 min., RT, befeuchten mit PBS)
- Vorbereitung in der Zwischenzeit: ABC-Komplex

1 ml PBS (ohne Tween)

20 \_l ABC – A

20 \_l ABC – B

(Aufbewahrung bei 4°C für ca. 30 min.)

- Aufbringen der Erstantikörper (30 min., RT)

Kontrolle: Mono: Mäuseimmunglobulin – MIG (2,0 \_g/ml)

Poly: Kaninchenimmunglobulin – RIG (2,5 µg/ml)

- Aufbringen der Sekundärantikörper (30 min., RT) Vectastain ABC-kit Elite

Mono: Anti-Maus (1:100-1:200)

Poly: Anti-Kaninchen (1:100-1:200)

- „Waschen“ (3x5 min. PBS + Tween)
- Zugabe des vorbereiteten ABC-Komplexes 30 min. ,RT)
- „Waschen“ (3x5 min. PBS + Tween)
- DAB 3-4 min. (Inkubation im Dunkeln)
- Sofort Waschen mit Leitungswasser
- 30 Sek. Meyer`s Hämatoxylin
- 2x Differenzieren mit Leitungswasser (5-10 min.)
- Alkohol-Reihe (70%-80%-90%-100%-Xylol1 – Xylol2; je 5 min.)
- Eindecken der Präparate mit DPX

## **8. Danksagung**

Mein verbindlicher Dank gilt denen, die mich in der Vorbereitung, Ausführung und Auswertung der vorliegenden Untersuchungen unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Mittelmeier, Chefarzt der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Universität Rostock Medizinische Fakultät, für die Vergabe des Themas, wertvolle Anregungen und die intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Reiner Gradinger, Direktor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München, für die zur Verfügung gestellten Räume und Laboreinrichtungen der Klinik.

Herrn Dr. med. P. Diehl, Assistenzarzt der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München, für die Betreuung.

Herrn Dipl. Ing. Gerrit Blümelhuber, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik in der Lebensmittelindustrie der Technischen Universität München, für die Einführung in die Bedienung der Hochdruck-Aggregate sowie die tatkräftige Unterstützung in der Ausführung der Hochdruck-Anwendungen.

Herrn Dr. rer. nat. Marcus Settles und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Link, Institut für Röntgendiagnostik der Technischen Universität München, für die Beratung in der Gestaltung sowie die Geräteeinstellung bei den Kernspin-Untersuchungen.

Herrn Dipl.-Ing. Stefan Lehner und Dr.-Ing. Erwin Steinhauser, Mitarbeiter des Labors für Biomechanik der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München, für die Einweisung in die Geräte-Bedienung, die Mithilfe bei technischen Problemen und die bereitwillige Beratung bezüglich des Auswertungsverfahrens der biomechanischen Untersuchungen.

Frau Dipl. Math. R. Busch, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, für die wertvolle Unterstützung im Rahmen der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

## Lebenslauf

**Name:** Heister  
**Vorname:** Cornelia  
**Familienstand:** ledig

**Schulbildung:** 9/1982 – 7/1986 Rotbuchenschule (Grundschule)  
9/1982 – 7/1995 Gymnasium am Anger  
1995 Allgemeine Hochschulreife

**Studium:** WS/95 – WS/97 Bauingenieurwesen an der TU München  
SS/97 – SS/04 Humanmedizin an der LMU München  
Nov./04 3. Staatsexamen

**Promotion:** Seit 2004 Doktorandin an der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München

**Berufliche Laufbahn:** 2/05 – 5/05 Anstellung als Assistenzärztin in der Psychiatrie am Klinikum Ingolstadt  
6/05 – 6/06 Anstellung als Assistenzärztin in der Neurochirurgie am Klinikum Ingolstadt  
Seit 8/06 Anstellung als Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik Bad Aibling