

Biomechanische Eigenschaften von Gelenknorpel nach hydrostatischer Hochdruckbehandlung

Biomechanical properties of articular cartilage after high hydrostatic pressure treatment

Peter Diehl^{1,*}, Florian-Dominique Naal¹, Johannes Schauwecker¹, Erwin Steinhauser¹, Stefan Milz², Hans Gollwitzer¹ und Wolfram Mittelmeier³

¹ Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Deutschland

² Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese, Davos, Schweiz

³ Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universität Rostock, Deutschland

Zusammenfassung

Ziel: Zu den aktuellen Rekonstruktionsverfahren großer tumorbefallener Knochendefekte gehören die intraoperative extrakorporale Bestrahlung oder Autoklavierung mit anschließender Reimplantation. Dies führt jedoch zum Teil zu einer erheblichen Veränderung der Transplantatqualität. Mit der hydrostatischen Hochdrucktechnik (HHD) kommt eine neue Alternative zur experimentellen Anwendung. Maligne Tumorzellen sollen unter Erhalt der biomechanischen Eigenschaften abgetötet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die biomechanischen und immunhistologischen Auswirkungen einer HHD-Behandlung auf Knorpelgewebe zu untersuchen.

Material und Methode: Osteochondrale Segmente aus bovinen Femurcondylen wurden mit HHD bei 300 und 600 MPa behandelt (je n=20). Biomechanische und immunhistologische Eigenschaften von behandelten und unbehandelten Segmenten wurden durch einen speziell entwickelten repetitiven Kugeleindrückversuch sowie durch die immunhistochemische Anfärbung von Aggrecan und Link Protein evaluiert. Kontralaterale Segmente dienten jeweils als unbehandelte Kontrolle.

Ergebnisse: Es zeigte sich selbst nach einer Behandlung der osteochondralen Segmente bei 600 MPa keine signifikante Änderung der Steifigkeit und des Relaxationsverhaltens. Immunhistochemisch ergab sich in allen Proben eine erhaltene Anfärbbarkeit der Kollagene, Proteoglykane und kein Unterschied im Verteilungsmuster zwischen behandelten und unbehandelten Proben.

Schlussfolgerung: Bei der Behandlung von Knorpelgewebe mit HHD werden normale und Tumorzellen unter Erhalt der biomechanischen und immunhistologischen

Eigenschaften zerstört. Somit besteht die Möglichkeit, nach Resektion eines tumorbefallenen Knorpel-Knochenareals durch HHD ein tumorfreies autologes Segment zwecks Reimplantation zu erstellen.

Schlüsselwörter: Biomechanik; Hochdruck; Knorpel; Rekonstruktion; Transplantation.

Abstract

Aim: Reconstruction of bone defects due to malignant tumors can be realized by several methods. Up to now, two methods, irradiation and autoclaving, are available for extracorporeally devitalizing resected tumor-bearing osteochondral segments. Previous investigations have shown that human normal and tumor cells in culture were irreversibly impaired when subjected to extracorporeal high hydrostatic pressure (HHP) of 350 MPa. The aim of this study was to examine the biomechanical and immunohistochemical properties of cartilage after exposure to HHP.

Materials and methods: Osteochondral segments of bovine femoral condyles were exposed to pressure of 300 and 600 MPa (n=20 each). Biomechanical and biological properties of untreated and treated segments were evaluated by repetitive ball indentation testing and immunohistochemical labelling aggrecan, link protein and collagen II. The contralateral segments served as untreated control.

Results: No significant alterations concerning stiffness and relaxation of osteochondral segments even after 600 MPa were observed. Immunohistochemically, staining was positive in all cases and no differences in the labeling pattern of proteoglycans were observed between untreated and HHP-treated specimens.

Conclusion: These findings give hope that HHP eventually will be used as a new gentle way of treating resected cartilage and bone without alteration of biomechanical properties to inactivate tumor cells in order to allow autologous reimplantation.

Keywords: autograft; biomechanical properties; cartilage; devitalize; high hydrostatic pressure; reconstruction.

Einleitung

Häufig ist die Rekonstruktion von großen segmentalen Knochendefekten nicht oder nur unvollständig möglich. Neben den zwischenzeitlich etablierten Verfahren wie der Endoprothetik [13], den Allo- und Autografttransplanta-

*Korrespondenz: Dr. med. Peter Diehl, Abteilung für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München, Ismaningerstr. 22, 81675 München, Deutschland
Tel: +49 (89) 4140 5289
Fax: + 49 (89) 4140 7242
E-mail: p.diehl@lrz.tum.de

tionen und den Umkehrplastiken werden seit einigen Jahren in ausgesuchten Fällen alternative rekonstruktive Verfahren wie die intraoperative extrakorporale Bestrahlung oder Autoklavierung mit anschließender Reimplantation durchgeführt. Dabei wird das tumortragende Knochen- oder Gelenksegment mit entsprechendem Sicherheitsabstand reseziert, von makroskopischen Tumoranteilen debridiert, mittels Radio/Autoklavierung devitalisiert und zur Defektrekonstruktion orthotop reimplantiert. Vorteil dieser Verfahren ist zum einen die exakte, "passgenaue" Rekonstruktion des betroffenen Abschnitts. Des Weiteren entfällt das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern und es ist von einer schnelleren Einheilung auszugehen, da körpereigenes Gewebe reimplantiert wird und so keine immunologischen Reaktionen auftreten. Beide Verfahren sind jedoch mit deutlichen Nachteilen, wie dem Verlust biomechanischer und/oder biologischer Eigenschaften, verbunden [2, 3, 17]. Als mögliche Alternative wurde aus diesen Grund in präklinischen Untersuchungen die hydrostatische Hochdrucktechnik (HHD) untersucht.

Der Einsatz von Hochdruck wurde in der Lebensmittelindustrie bereits teilweise als Ersatz für die Pasteurisation untersucht, beispielsweise zur Herstellung von Konfitüren, Pürees und Soßen [4]. Durch die Anwendung von Hochdruck werden Mikroorganismen inaktiviert, wobei der dafür notwendige Druck vom jeweiligen Mikroorganismus abhängt [1].

Aus den sich daraus gewonnenen Erkenntnissen wurde die mögliche medizinische Anwendung des hydrostatischen Hochdruck zur Sterilisation von autologem tumorbehafteten Knochengewebe untersucht. Ziel hierbei wäre es, in ausgewählten Fällen entsprechend den oben beschriebenen Methoden das tumortragende Knochen- oder auch Gelenksegment zu resezieren, mittels HHD unter Erhalt der biomechanischen und biologischen Eigenschaften zu devitalisieren und im Anschluss zu reimplantieren.

In ersten präklinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit HHD humane Tumorzelllinien bei 350 MPa sicher abgetötet werden können [6, 7], andererseits aber die biomechanischen Eigenschaften von Knochen und Sehnen selbst nach Behandlung mit HHD bis 600 MPa erhalten bleiben [9, 20]. Erste exemplarische Untersuchungen von extrazellulären Matrixproteinen nach HHD-Behandlung bis 600 MPa geben Hinweise darauf, dass sich auch die biologische Wertigkeit des Knochens nach dieser Behandlungsmethode nicht ändert. Bislang liegen jedoch keine Ergebnisse zu den Auswirkungen von HHD auf mechanische oder immunhistologische Eigenschaften von Knorpelgewebe vor. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Effekte der HHD-Behandlung bis 600 MPa auf die biomechanischen und immunhistologischen Eigenschaften von Gelenkknorpel aufzuzeigen.

Material und Methode

Gewinnung der Knorpelproben

Am Tag der Schlachtung wurden aus 5 paarigen Rinderkniegelenken der Kapsel-Band-Apparat der Kniegelenke

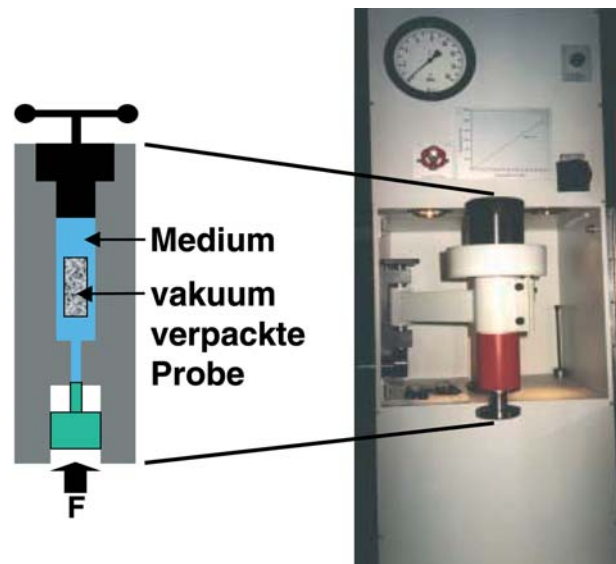


Abbildung 1 Der mit der Firma Record Maschinenbau GmbH entwickelte Hochdruckreaktor.

Druckaufbau bis 600 MPa stufenlos möglich. Temperatur von 0–50°C regulierbar.

entfernt und die Femurkondylen freigelegt. Sichtbare traumatische und/oder degenerative Knorpelschäden waren ein Ausschlusskriterium für die weitere Verwendung. Aus jedem Kondylus wurden mit Hilfe einer speziell geschliffenen Stanze standardisiert drei osteochondrale Zylinder (Durchmesser 10 mm) für die nachfolgenden Untersuchungen (Kontrolle, 300 MPa, 600 MPa) gewonnen. Um die gewünschte Probenhöhe von 4 mm zu erzielen, wurde der subchondrale Knochen zuerst mit einer Handsäge zugeschnitten und anschließend mittels einer speziell angefertigten Führungsbuchse planparallel zur Knorpeloberfläche geschliffen. Insgesamt wurden 30 Proben aus den medialen und 30 Proben aus den lateralen Femurkondylen gewonnen. Direkt nach der Probengewinnung wurden die Zylinder in Arthroskopie-Lösung mit zum Gelenkknorpel isotonischen Eigenschaften (Purisol SM, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) überführt, um eine Austrocknung bzw. ein Anschwellen des Knorpels zu verhindern.

Hochdruckbehandlung

Je drei Zylinder wurden gemeinsam in ein mit Arthroskopie-Lösung gefülltes 15 ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) eingebracht. Die Röhrchen wurden bis zum Rand mit Arthroskopie-Lösung aufgefüllt, die Deckel luftdicht aufgeschraubt und mit Parafilm (American National Can, Chicago, USA) zusätzlich abgedichtet. Die Proben wurden dann in die in früheren Versuchen validierte Autoklavenkammer der Hochdruckmaschine (HDR 100-20, RECORD Maschinenbau GmbH, Königsee, Deutschland) gebracht und bei 300 (n=20) oder 600 MPa (n=20) behandelt (10 min, Raumtemperatur (RT)). Druckauf- und Druckabbau erfolgten gleichmäßig innerhalb von 60 s. Die Kontrollproben (n=20) blieben unbehandelt (Abbildung 1).

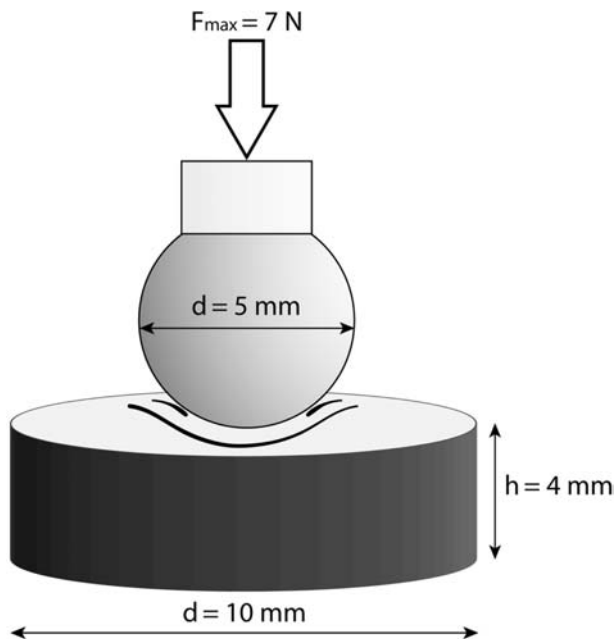


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Testaufbaus für die mechanische Testung der Knorpelproben mittels eines repetitiven Kugeleindrückversuches.

Biomechanische Testung

Die Knorpelproben wurden einzeln an einer Universalprüfmaschine (Zwicki 1120, Zwick, Ulm, Deutschland) mittels eines repetitiven Kugeleindrückversuches getestet (Abbildung 2). Hierfür wurden über einen an der Kraftmessdose angebrachten Stempel, der am unteren Ende eine Stahlkugel (Durchmesser 5 mm) besaß, fünf axiale Belastungszyklen auf die Probe appliziert. Der Stempel drückte dabei die Probe bis zu einer definierten Vorbelastung von 0,5 N ein. Diese Position wurde als Ausgangsposition definiert. Von hier ausgehend wurde eine Maximalkraft von 7,0 N angefahren, der Stempel verblieb nachfolgend für 60 s in der erreichten Wegposition. Anschließend wurde der Stempel zur Entlastung der Probe in eine Position entspr. einer verbleibenden Kraft von 0,1 N verfahren und dort für weitere 60 s belassen, bevor danach der nächste Testzyklus analog dem ersten Zyklus begann. Insgesamt wurden fünf solcher Zyklen je Probe unmittelbar hintereinander durchgeführt. Die am Stempel gemessenen Prüfkräfte sowie dessen Position wurden kontinuierlich über den gesamten zeitlichen Verlauf der Testung mit einer Frequenz von 25 Hz mittels der Prüf-Software TestXpert (Version 8.1, Zwick, Ulm, Deutschland) aufgezeichnet.

Immunhistochemische Anfärbung

Aus den medialen Kondylen der Kniegelenke von vier verschiedenen Rindern wurden jeweils zwei Osteochondrale Zylinder entnommen, wobei eine Probe bei 600 MPa (10 min, RT) hochdruckbehandelt wurde und die zweite als Kontrollprobe diente (unbehandelt). Direkt im Anschluss an die Hochdruckinkubation wurden die Proben in Methanol (100%) überführt und für 10 Tage bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben vier

Wochen lang in EDTA-Lösung (5%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) entkalkt. Die EDTA-Lösung wurde alle zwei Tage erneuert. Anschließend wurden von jeder Probe 24 Kryo-Schnitte (Kryomikrotom HM 500 OMV, Microm, Walldorf, Deutschland) mit einer Schnittstärke von 12 µm angefertigt. Die Schnitte wurden dann immunhistochemisch, wie bereits in der Literatur detailliert beschrieben [15], auf die Proteoglykane Aggrecan, Link-Protein und Kollagen II angefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämatoxylin, die Kontrollfärbung zum Nachweis der spezifischen Anfärbung mit PBS (phosphate buffered saline).

Auswertung und Statistik

Die Auswertung der mechanischen Kennwerte erfolgte mit einer eigens programmierten Auswerterroutine, welche mit der Software MatLab (Version 6.5, Mathworks, USA) erstellt worden war. Abbildung 3 zeigt exemplarisch den Verlauf der Prüfkraft und der Position des Prüfstempels über dem zeitlichen Verlauf der fünf Belastungszyklen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für das Steifigkeits- und Relaxationsverhalten wurden, getrennt nach medialem und lateralem Kondylus, zwischen unbehandelten und hochdruckbehandelten Proben verglichen. Für den Vergleich der Ergebnisse unbehandelter und behandelter Proben wurde der Student's-t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p=0,05$ gesetzt.

Ergebnisse

Biomechanik

Proben aus dem medialen Kondylus zeigten über alle 5 Testzyklen weder nach 300 noch nach 600 MPa HHD-Behandlung signifikante Unterschiede zu unbehandelten Kontrollproben (graphisch nicht dargestellt). Mit 300 MPa behandelte Proben aus dem lateralen Kondylus zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der Steifigkeit und des Relaxationsverhaltens gegenüber unbehandelten Proben auf (Abbildungen 4 und 5). Lediglich bei den mit 600 MPa behandelten Proben aus dem lateralen Femur-Kondylus zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ab dem 2. Test-Zyklus eine nicht signifikante Reduktion der Steifigkeit um etwa 15%, die in dem gleichen Ausmaß bis zum 5. Testzyklus bestehen blieb (Abbildung 3). Die am Stempel wirkende Kraft am Ende der Relaxationszeit von 60 s stieg bei den unbehandelten und hochdruckbehandelten Proben von Test-Zyklus zu Zyklus an. Dieser Effekt beruht auf der viskoelastischen Materialcharakteristik des Knorpelgewebes. Es zeigten sich über alle 5 Testzyklen weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und HHD-behandelten Proben (Abbildung 3). Die Gewebesteifigkeit der Kontrollgruppe und der hochdruckbehandelten Proben stieg nach jedem Testzyklus auf Grund des viskoelastischen Materialverhaltens in gleichen Maßen an (Abbildung 4).

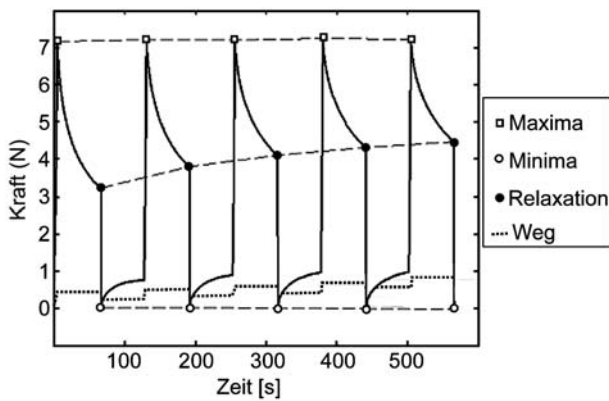


Abbildung 3 Darstellung der Prüfkraft und der Position des Prüfstempels im zeitlichen Verlauf über die fünf Belastungszyklen.

Jeder einzelne Messzyklus besteht hierbei aus Belastung bis 7 N, 60 s Verweilzeit des Prüfstempels in dieser Position, über welcher die Gegenkraft der Probe auf den Stempel in Bereiche zwischen 3–4 N abfällt. Anschließend erfolgt die Entlastung der Probe durch Zurückfahren des Stempels. Nach 60 s Entlastung beginnt ein neuer Belastungszyklus.

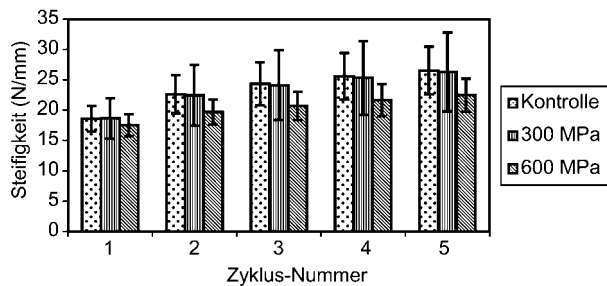


Abbildung 4 Steifigkeit (N/mm) der Knorpelproben am lateralen Femurkondylus.

Zwischen unbehandelten und bei 300 MPa (10 min, RT) behandelten Segmenten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Nach 600 MPa sinkt die Steifigkeit leicht, um max. 15%, ab. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

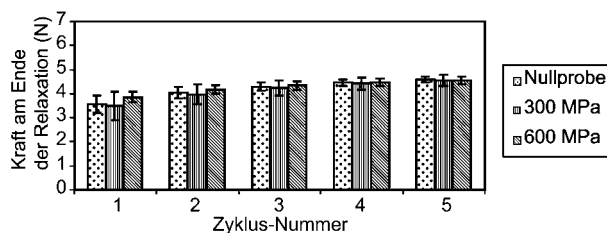


Abbildung 5 Kraft am Ende der Relaxation (N) der Knorpelproben.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und hochdruckbehandelten (300 und 600 MPa, 10 min, RT) Segmenten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Immunhistochemie

Die Schnitte der Proben zeigten die typische Histologie von hyalinem Knorpel, die besonders gut in der Kontrollfärbung erkennbar war (Abbildung 6). In den immunhistochemischen Anfärbungen waren in allen unbehandelten und hochdruckbehandelten Proben die spezifisch ange-

färbten Proteoglykane Aggrecan, Link Protein und Kollagen II nachweisbar (Abbildung 6). Es zeigten sich keine Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen unbehandelten und behandelten Proben. Die Kontrollfärbung wies keine spezifische Anfärbung auf, was die Spezifität der immunhistochemischen Färbung bewies. Die auf manchen Abbildungen erkennbaren Querstreifen sind Schnittartefakte, die während der Anfertigung der Kryoschnitte hervorgerufen wurden.

Diskussion

Bei der intraoperativen extrakorporalen Bestrahlung oder Autoklavierung tumorbefallener Knorpel-Knochen-segmente kommt es zu einer deutlichen Verschlechterung der biomechanischen und/oder biologischen Eigenschaften [3, 17]. Darüber hinaus weist die Bestrahlung eine fragliche Kanzerogenität und Mutagenität auf [12]. In Knorpelgewebe zeigten sich durch diese Verfahren eine herabgesetzte Steifigkeit und eine signifikante Abnahme der viskoelastischen Eigenschaften. Auch zeigten andere Arbeiten morphologische Veränderungen des Knorpels mit Schädigung der Kollagenstruktur [5]. Diese Nachteile können nach Reimplantation zu hohen Komplikationsraten in Form von beschleunigter Degeneration und dem Einbruch von lasttragenden Knorpeloberflächen nach Bestrahlung oder Autoklavierung führen [2, 3, 10]. Auf der anderen Seite hat sich jedoch gezeigt, dass rein tiefgefrorene azellularisierte lasttragende Knorpelallo-grafts, die nicht zusätzlich mit o. g. Methoden behandelt wurden, wesentlich bessere Prognosen haben und der Gelenkknorpel in manchen Fällen weit über 5 Jahre erhalten bleibt [10]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, ein alternatives schonendes Behandlungsverfahren zur extrakorporalen Tumordevitalisierung zu entwickeln, welches geringere Auswirkungen auf biomechanische und biologische Eigenschaften des Gewebes besitzt, Tumorzellen jedoch sicher inaktiviert.

Die hydrostatische Hochdruckbehandlung (HHD) zur Devitalisierung von Knochen, Sehnen oder Knorpel ist noch im experimentellen Stadium, hat aber das Potenzial, Zellen, wie Bakterien und Tumorzellen, in Gewebeproben bei Druckstufen ab 350 MPa (37°C) zu inaktivieren [7, 19] und damit den Weg für eine Reimplantation des eigenen Gewebes zu ebnen. In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ab 350 MPa keine vitalen Chondrozyten und Chondrosarkomzellen mehr nachzuweisen sind. Dabei sind Tumorzellen resistenter als die Chondrozyten. Diese Ergebnisse werden durch die durchflusszytometrische Analyse bestätigt [18]. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig die biomechanischen und immunhistochemischen Eigenschaften von Gelenkknorpel nach einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung untersucht. Dabei führte eine Behandlung mit sehr hohen Drücken bis 600 MPa (10 min, 37°C) zu keiner Veränderung des Relaxationsverhaltens des Knorpels. Die Steifigkeit des Knorpels war nach 300 MPa ebenfalls nicht verändert, nach 600 MPa zeigte sich ein geringer, nicht signifikanter Steifigkeitsabfall von bis zu 15% ab dem 2. Belastungszyklus im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

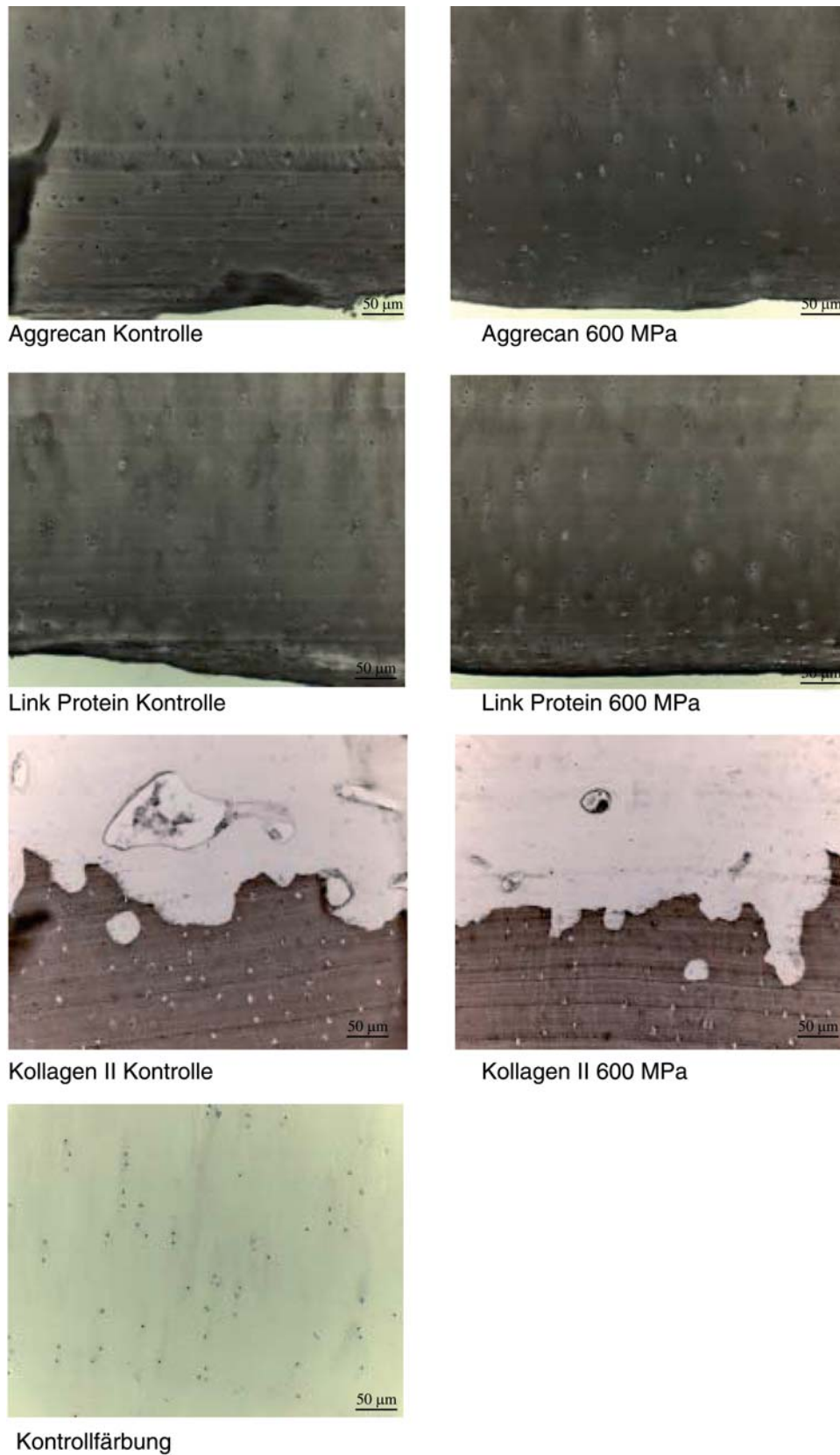


Abbildung 6 Darstellung von HHD-behandelten Knorpelproben nach immunohistochemischer Anfärbung von Aggrecan, Link Protein und Kollagen II. Es zeigt sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster zwischen unbehandelten (links) und hochdruckbehandelten (600 MPa, 10 min, RT) Knorpelproben (rechts).

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Versteifung des Knorpels von Testzyklus zu Testzyklus beruht auf den viskoelastischen Materialeigenschaften von Knorpelgewebe. Der Fluss interstitieller Flüssigkeit, der durch die Druckbelastung des Stempels induziert wird, bewirkt eine Kompaktation der Matrix und damit eine Versteifung der Probe [16]. Wird die auf die Probe einwirkende Kraft entfernt, wie in den vorliegenden Versuchen nach 60 s Haltezeit, kann die interstitielle Flüssigkeit durch den am Ort der vormaligen Krafteinwirkung entstehenden geringeren hydrostatischen Druck dorthin zurückfließen. Die gewählte Entlastungszeit von ebenfalls 60 s reicht jedoch nicht aus, um das ursprüngliche Volumen an interstitieller Flüssigkeit an diesem Ort wieder zu erreichen, so dass bei erneuter Belastung der Prüfstempel auf eine bereits kompaktierte Matrix trifft.

Das hier aufgezeigte Verfahren der biomechanischen Prüfung von Knorpelproben bietet die Möglichkeit einer speziellen Untersuchungstechnik für Knorpelgewebe, die auf die mechanischen Eigenschaften und besonders die Viskoelastizität ausgerichtet ist.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten eine erhaltene Anfärbbarkeit und keine Veränderungen des Verteilungsmusters der Proteoglykane Aggrecan, Link Protein und Kollagen II nach einer Behandlung bei 600 MPa. Damit korrelieren die immunhistochemischen Beobachtungen mit den Resultaten der biomechanischen Tests, da die Erhaltung von Struktur und Verteilung der Matrixkomponenten für die mechanischen Eigenschaften des Knorpels maßgeblich verantwortlich ist.

Im Gegensatz zur Bestrahlung oder Autoklavierung hat HHD offenbar keinen Effekt auf kovalente Bindungen [14]. So erklärt sich, dass Aromastoffe, Geschmacksstoffe und Vitamine bei der Haltbarmachung von Lebensmitteln erhalten bleiben [14]. Dies könnte ein Erklärungsansatz für den Erhalt der immunhistochemischen und biomechanischen Eigenschaften sein, da möglicherweise die Strukturproteine von HHD unbeeinflusst bleiben.

Diese Beobachtungen werden durch andere Arbeiten bestätigt, welche erhaltene biologische Eigenschaften von extrazellulären Matrixproteinen [8] und biomechanische Eigenschaften von Knochensegmenten und Sehnen nach einer HHD-Behandlung bei 600 MPa aufzeigten [9, 20]. Die vorliegenden Ergebnisse und die vorangegangenen Arbeiten zeigen, dass in diesem Druckbereich keine negativen Auswirkungen auf biomechanische und relevante biologische Eigenschaften hochdruckbehandelten Gewebes zu erwarten sind.

Die langfristige Knorpeldegeneration ist aufgrund der Azellularisierung der Knorpelmatrix ein weiterhin ungelöstes Problem. Möglicherweise kann eine Besiedlung mit autologen Chondrozyten eine Resorption des Knorpels verhindern. Die Arbeit von Kelley et al. hat bewiesen, dass sich Chondrozyten auf devitalisiertem Knorpel ansiedeln lassen und dabei ihre Vitalität und Funktion beibehalten [11]. Ob und wie sich hochdruckbehandelter Knorpel als Scaffold verwenden lässt und sich darauf Chondrozyten ansiedeln lassen, bleibt in weiteren Versuchen zu klären. Zudem ist zukünftig zu prüfen, ob nicht bei geringeren Drücken und selektiveren Bedingungen (z. B. Temperatur) eine geringere Beeinträchtigung der Knorpelzellen zu erzielen ist.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich mit der hydrostatischen Hochdruckbehandlung eine neue, vielversprechende Alternative zur extrakorporalen Devitalisierung von tumorbehafteten Skelettabschnitten mit folgender Reimplantation entwickeln könnte.

Danksagung

Diese Arbeit wurde zum Teil vom Bayerischen Ministerium für Wissenschaft, Kultur und Bildung (Bayerische Forschungsstiftung, Bayerischer Forschungsverbund für Tissue Engineering und Rapid Prototyping FORTEPRO, Teilprojekt TE3) unterstützt.

Literatur

- [1] Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Sikes A, Dunne CP, Ray B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4248–4251.
- [2] Araki N, Myoui A, Kuratsu S, et al. Intraoperative extracorporeal autogenous irradiated bone grafts in tumor surgery. *Clin Orthop* 1999; 196–206.
- [3] Bohm P. Replantation of extracorporeally devitalized bone segments for defect reconstruction in tumor orthopedics – an overview. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1998; 136: 197–204.
- [4] Cheftel JC. Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol Int* 1995; 1: 75–90.
- [5] Cheung DT, Perelman N, Tong D, Nimni ME. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 581–589.
- [6] Diehl P, Reuning U, Gollwitzer H, et al. Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability. *Oncol Rep* 2004; 12: 369–373.
- [7] Diehl P, Schmitt M, Blumelhuber G, et al. Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery. *Oncol Rep* 2003; 10: 1851–1855.
- [8] Diehl P, Schmitt M, Schauwecker J, et al. Effect of high hydrostatic pressure on biological properties of extracellular bone matrix proteins. *Int J Mol Med* 2005; 16: 285–289.
- [9] Diehl P, Schmitt M, Steinhauser E, et al. Biomechanical analysis of Achilles' tendons after high hydrostatic pressure treatment as a novel supporting technique in orthopedic surgery. *J Orthop Sci* 2006; in press.
- [10] Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83: 971–986.
- [11] Kelley TF, Sutton FM, Wallace VP, Wong BJ. Chondrocyte repopulation of allograft cartilage: a preliminary investigation and strategy for developing cartilage matrices for reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 127: 265–270.
- [12] Knaepler H, von Garrel T, Gürtler L. Die allogene Knochen transplantation – eine aktuelle Standortbestimmung. *Dtsch Arztebl* 1994; 91: 798–802.
- [13] Lehner S, Steinhauser E, Mittelmeier W, Stur S, Gradinger R. New compounds for improving wear behavior of a tumor knee endoprosthesis. *Biomed Tech* 2001; 46: 75–79.
- [14] Masson P, Tonello C, Balny C. High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J Biomed Biotechnol* 2001; 1: 85–88.
- [15] Milz S, Tischer T, Buettner A, et al. Molecular composition

- and pathology of entheses on the medial and lateral epicondyles of the humerus: a structural basis for epicondylitis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1015–1021.
- [16] Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984; 17: 377–394.
- [17] Munting E, Wilmar JF, Wijne A, Hennebert P, Delloye C. Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand* 1988; 59: 34–38.
- [18] Naal FD, Mengele K, Schauwecker J, et al. High hydrostatic pressure-induced cell death in human chondrocytes and chondrosarcoma cells. *Antican Res* 2005; 25: 1977–1982.
- [19] Schauwecker J, Wirthmann L, Schmitt M, et al. Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on cellular outgrowth from tumor-afflicted bone. *Antican Res* 2006; 26: 85–90.
- [20] Steinhauser E, Diehl P, Hadaller M, et al. Biomechanical investigation of the effect of high hydrostatic pressure treatment on the mechanical properties of human bone. *J Biomed Mat Res B Appl Biomater* 2006; 76: 130–135.