

Orthopädische und Sportorthopädische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

**Untersuchungen zur Vitalität humaner Chondrosarkomzellen und
Chondrozyten, sowie zu biomechanischen und immunhistochemischen
Eigenschaften von Knorpelgewebe nach hydrostatischer
Hochdruckbehandlung, als neues Verfahren in der Orthopädischen Chirurgie**

Florian-Dominique Naal

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

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
3. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 06.09.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2007 angenommen.

*Meinen Eltern,
in Liebe und Dankbarkeit.*

*Meinem Bruder,
in stillem Gedenken.*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
2. Material und Methoden	
2.1 Verwendete Materialien	12
2.2 Aufbau der Hochdruckanlage für die Zellversuche	15
2.3 Verwendete Zelllinien	16
2.4 Zellkultur	17
2.4.1 Herstellung der Nährmedien	17
2.4.2 Kultivierung der Zellen	17
2.4.3 „Splitting“ der Zellkulturen	18
2.5 Hochdruckinkubation der Zellen in Suspension	19
2.5.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	19
2.5.2 Hochdruckinkubation der Zellproben	20
2.6 Hochdruckinkubation adhärent wachsender Zellen	21
2.6.1 Probenvorbereitung und Hochdruckinkubation adhärent wachsender Zellen	22
2.7 Auswertung des Effektes der Hochdruckinkubation der Zellen	23
2.7.1 Bestimmung der Zahl vitaler und avitaler Zellen mit dem Trypanblau-Test	24
2.7.2 Messung der Annexin V-Bindung und Propidiumiodid-Aufnahme im Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS)	24
2.7.2.1 Prinzip der FACS-Messung	25
2.7.2.2 Hochdruckinkubation der Zellen für die FACS-Messung	26
2.7.2.3 Vorbereitung der Zellproben und Durchführung der FACS-Messung	26
2.8 Morphologische Bewertung hochdruckbehandelter Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie	27
2.9 Auswertung der Vitalitätsanalyse mittels des Trypanblau-Tests und der FACS-Messungen	27
2.10 Biomechanische und immunhistochemische Eigenschaften von Knorpelgewebe nach hydrostatischer Hochdruckinkubation	28
2.10.1 Gewinnung der Knorpelproben	29

2.10.2	Hochdruckanlage und Hochdruckinkubation der Knorpelproben	31
2.10.3	Biomechanische Testung der Knorpelproben	32
2.10.4	Auswertung der biomechanischen Testung der Knorpelproben	33
2.10.5	Immunhistochemische Untersuchungen der Knorpelproben	34
2.10.5.1	Anfertigen von Gefrierschnitten der Knorpelproben	35
2.10.5.2	Immunhistochemische Anfärbung der Gefrierschnitte	35
3.	Ergebnisse	
3.1	Kultivierung der Zellen	38
3.2	Vitalitätstests hochdruckbehandelter Zellen	38
3.2.1	Hochdruckinkubation von Chondrozyten in Suspension	38
3.2.2	Hochdruckinkubation von Chondrosarkomzellen in Suspension	40
3.2.3	Hochdruckinkubation von adhärennten Chondrozyten	41
3.2.4	Hochdruckinkubation von adhärennten Chondrosarkomzellen	43
3.2.5	Grafische Darstellung der Ergebnisse des Trypanblau-Vitalitätstests hochdruckbehandelter Zellen	45
3.3	FACS-Messungen hochdruckbehandelter Zellen	47
3.3.1	Lichtmikroskopie hochdruckbehandelter Zellen nach anschliessender Rekultivierung für 24 Stunden	47
3.3.2	Auswertung der FACS-Messungen	49
3.3.3	FACS-Messungen hochdruckinkubierter Chondrozyten in Suspension	49
3.3.4	FACS-Messungen hochdruckinkubierter Chondrosarkomzellen in Suspension	54
3.4	Konfokale Lasermikroskopie hochdruckbehandelter Zellen	59
3.5	Biomechanische Untersuchungen von Knorpelgewebe nach Hochdruckbehandlung	61
3.5.1	Lateraler Meniskus	61
3.5.2	Medialer Meniskus	64
3.5.3	Lateraler Kondylus	67
3.5.4	Medialer Kondylus	70
3.6	Immunhistochemische Färbungen von Knorpelgewebe nach Hochdruckbehandlung	73
3.6.1	Meniskus-Knorpel	73

3.6.2	Gelenkknorpel	76
4.	Diskussion	79
4.1	Allgemeine Wirkungsweise von hydrostatischem Hochdruck	79
4.2	Vitalität und Morphologie humaner Chondrozyten und Chondrosarkomzellen nach Hochdruckbehandlung	81
4.3	Knorpelgewebe: Funktionen, biochemische und biomechanische Grundlagen von Gelenkknorpel und Meniskus	89
4.4	Überlegungen zur Minimierung von Fehlerquellen bei der biomechanischen Testung von Knorpelgewebe	91
4.5	Knorpelgewebe nach Hochdruckbehandlung	92
4.6	Ausblick	96
5.	Zusammenfassung	99
6.	Literaturverzeichnis	101
7.	Danksagung	124
8.	Anhang	125
8.1	Abkürzungen	125
8.2	Einzelne Messergebnisse des Trypanblau-Tests	127
8.3	Einzelne Messergebnisse der FACS-Messungen	136
8.4	Lichtmikroskopische Morphologie von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen nach Hochdruckbehandlung	138
8.5	Einzelne Messergebnisse der biomechanischen Knorpel-Testung	139
8.6	Verzeichnis der Abbildungen, Grafiken und Tabellen	147

1. Einleitung

Die Rekonstruktion von segmentalen Knorpel- und Knochendefekten nach Resektion von malignen Tumoren des Skelettsystems ist eine der Herausforderungen in der orthopädischen Chirurgie. Dabei hat sich in den letzten Jahren der Trend zur Extremitäten erhaltenden Chirurgie entwickelt. Verschiedene Methoden zur Defektrekonstruktion stehen dabei zur Verfügung. Für die Entscheidung über die Rekonstruktions-Methode spielen die chirurgische Komplexität, im Sinne von Größe und Ausdehnung des Defektes, oder Infiltration von benachbarten Strukturen durch einen Tumor, sowie Alter, Morbidität und funktionelle Ansprüche des Patienten ebenso eine Rolle, wie die methodenspezifischen Komplikationen [Sim et al., 1987: 188-195]. Grundsätzlich kann die Versorgung durch Prothesen, insbesondere spezielle Tumorprothesen, Allografts oder Autografts erfolgen. Jede dieser Verfahrensmöglichkeiten bietet dabei, teils spezifische Vor- und Nachteile. Allen gemeinsam ist jedoch eine hohe Komplikationsrate [Hillmann et al., 2003: 340].

Künstlicher Knochenersatz wird zur Füllung von Knochendefekten eingesetzt [Mittelmeier et al., 1998: 126], jedoch ist derartige Material zur Überbrückung größerer Defekte ungeeignet [Mittelmeier et al., 1996: 1087-1092]. Die biologische Rekonstruktion wird insbesondere bei jüngeren Patienten der Prothesenversorgung vorgezogen. Auf der einen Seite werden durch Prothesen zwar Vorteile geboten, etwa eine frühe Stabilität und damit mögliche Frühmobilisation. Neben dem Risiko einer postoperativen Infektion spielen jedoch spezifische Langzeit-Komplikationen, wie Implantatlockerung und -versagen (Brüche), die zwangsläufig zu Revisionsoperationen führen, eine große Rolle [Elke, 2001: 258-263; Natarajan et al., 2003: 176-178]. Diese können letztendlich in einer Amputation des betroffenen Körperabschnitts enden [Böhm et al., 2003: 362].

Eine Alternative zur prothetischen Rekonstruktion stellt der Einsatz biologischen Gewebes dar: Allografts stammen von einem Fremdspender, bei Autografts wird patienteneigenes Gewebe zur Rekonstruktion verwendet. Der Einsatz von Allografts wird kontrovers diskutiert. Spezifische Probleme, neben ethischen Fragen, sind Immunreaktionen des Empfängers gegen das transplantierte Gewebe, eine begrenzte Verfügbarkeit des Materials und ein kostenintensives Handling mit Gewebe- bzw. Knochen-Banken [Sanjay et al., 1997: 291-297; Sys et al., 2002: 177]. Vor allem aber das primäre Infektionsrisiko, insbesondere durch HIV

oder Hepatitis, stellt ein Hauptargument gegen die Verwendung von allogenem Material dar [Knaepler et al., 1991: 763-765]. So zeigte sich in einer Studie in etwa 18 % der Femurkopf-Grafts eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen [Chapman et al., 1992: 398], selbst eine maligne Infiltration wurde in einem Allograft nachgewiesen [Palmer et al., 1999: 333-335]. Diese Aspekte führten dazu, Allografts routinemäßig zu sterilisieren. Durch eingesetzte Verfahren wie Bestrahlung oder Autoklavierung werden weitere Komplikationen im Hinblick auf die biologische Wertigkeit und biomechanische Stabilität des Materials in Kauf genommen. Diese Komplikationen werden durch das zusätzliche Einfrieren bei gängigerweise -80 °C weiter verschärft [Pelker et al., 1987: 236-238]. So berichteten Mankin et al. (1996) über Komplikationen von 46 % bei 718 großen Allografts, wobei die Komplikationsrate mit der Größe der Grafts stieg. Hauptsächlich traten Infektionen, Frakturen und eine Störung der ossären Reintegration des Transplantats auf [Mankin et al., 1996: 86]. Auch Cruz et al. (1997), die den Verlauf von 104 Patienten mit einer Allograft-Implantation dokumentierten, zeigten bei 31 Patienten Störungen der Graft-Integration, zum Teil assoziiert mit weiteren Komplikationen, bei 18 Grafts kam es zu einer Fraktur [Cruz et al., 1997: 101-103]. Die Infektionsrate bei der allogen Rekonstruktion wird mit 12-30 % angegeben [Altman et al., 1995: 54; Hernigou et al., 1991: 6].

Die Standarddosis für die sterilisierende Radiatio von Allografts liegt bei 25-35 kGy [Akkus et al., 2001: 927]. Eine Dosis von 30 kGy wurde als ausreichend für eine Inaktivierung von HIV gesehen [Fideler et al., 1994: 1032], allerdings scheint ein Sterilitätsniveau von 10^{-6} erst bei 89 kGy erreichbar zu sein [Campbell et al., 1999: 517]. Prionen wie Erreger von Scrapie oder der Kreuzfeld-Jakob Krankheit bleiben selbst nach Strahlendosen von 50 Mrads (50000 Gy) vital [Gibbs et al., 1978: 6268]. Sie können allerdings durch Autoklavierung für 60 min bei 132 °C inaktiviert werden [Ernst et al., 1993: 193].

Beide Verfahren weisen jedoch Nachteile auf. Eine Studie von Speirs et al. (1999) zeigte eine dramatische Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften von Knochen nach Autoklavieren für 60 min bei 134 °C . Es zeigte sich bei dem durchgeführten axialen Kompressions-Test eine Abnahme der Endkraft um 82 % und eine Reduktion der strukturellen Steifigkeit um 67 % gegenüber unbehandelten Kontrollproben, so dass biomechanisch stark beeinträchtigte Grafts resultierten [Speirs et al., 1999: 489]. Auch eine Verschlechterung der biologischen Eigenschaften autoklavierter Resektate wurde nachgewiesen [Munting et al., 1988: 34]. In einer klinischen Studie kam es bei 4 von 7

Patienten zu Komplikationen, in erster Linie zu Frakturen und einem Nicht-Einwachsen des autoklavierten Gewebes [Sanjay et al., 1997: 294]. Eine andere Arbeit zeigte im Tierversuch eine Reduktion der Steifigkeit von autoklavierten Transplantaten um 50 % nach 12 Wochen, verglichen mit der unbehandelten Kontrollseite [Ku et al., 1985: 340]. Man kam zu dem Schluss, dass auf der Basis radiologischer, histologischer und biomechanischer Ergebnisse die Bestrahlung zu besseren Resultaten führt, als die Autoklavierung [Böhm et al., 1997: 289].

Autografts besitzen gegenüber Allografts verschiedene Vorteile. Zum einen erlauben sie die exakte, „passgenaue“ Rekonstruktion des betroffenen Abschnitts, zum anderen entfällt das Infektionsrisiko, welches von einem Allograft trotz Sterilisation ausgeht. Auch ist von einer schnelleren Einheilung des Grafts auszugehen, da er aus körpereigenem Gewebe besteht und keine immunologische Reaktion hervorruft [Böhm et al., 2003: 363]. Daneben entfällt der Aufwand einer Knochen-Bank [Sys et al., 2002: 177].

Die sichere extrakorporale Inaktivierung aller Tumorzellen ist allerdings die Voraussetzung für eine Reimplantation eines autologen Knorpel-Knochen Segmentes. Klinisch werden zur Devitalisierung resektierten, tumorbefallenen autologen Gewebes ebenfalls die Autoklavierung und die Bestrahlung angewendet. Die Autoklavierung stellt hierbei zwar die einfachere der beiden Methoden dar, sie ist aber mit den Nachteilen einer Knorpelschädigung und einer deutlicheren Minderung der biologischen und biomechanischen Qualität des Gewebes verbunden (s. o.). Diese Nachteile sind bei der Bestrahlung von Autografts geringer ausgeprägt [Böhm et al., 2003: 356, Sys et al., 2002: 177]. Dennoch zeigen sich auch nach Bestrahlung hohe Komplikationsraten. In verschiedenen Studien wurden insgesamt 50 Patienten durch eine Tumorresektion mit extrakorporaler Radiatio und Reimplantation behandelt. Dabei betrug die durchschnittliche Strahlendosis 201 Gy. Die lokale Rezidivrate lag bei 10 %. Hauptkomplikationen waren Infektionen und Frakturen in den reimplantierten Gebieten. [Böhm et al., 2003: 359-362]. In einer Follow-up-Studie von Park und Mitarbeitern (1999) ergaben sich biologische und biomechanische Komplikationen in 5 von 11 Fällen [Park et al., 1999: 520]. Bei der Behandlung von 15 malignen Beckentumoren durch extrakorporale Bestrahlung (300 Gy) und Reimplantation wurde eine sehr hohe lokale Rezidivrate von annähernd 50 % aufgezeigt, darüber hinaus traten in 13 der 15 Fälle Komplikationen auf [Sys et al., 2002: 175]. In einer Studie an Hunden zeigte sich nach 24 Wochen eine signifikant schlechtere Reintegration bestrahlter (25 Gy) osteochondraler Reimplantate, verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch das Remodelling des Knochens war

beeinträchtigt und der Knorpel wies degenerative Veränderungen auf. Es zeigte sich eine gesteigerte Resorption des behandelten Grafts [Sabo et al., 1999: 276-280]. In einem weiteren Tierversuch an Ratten untersuchten Voggenreiter et al. (1996) die Auswirkungen einer Bestrahlung von 1, 5, 10, 25 und 50 kGy auf kortikale Knochensegmente mit folgender Reimplantation. Die Versuchsreihe mit einer Dosis von 50 kGy wurde auf Grund von Frakturen in mehr als 66 % der Fälle nach drei Wochen abgebrochen. Das Einwachsen der Transplantate war stark beeinträchtigt, es reduzierte sich um 16 % nach 1 kGy, um 24 % nach 5 kGy und um 50 % nach 25 kGy. Auch fehlte eine Revaskularisierung nach 25 kGy [Voggenreiter et al., 1996: 583-585]. Bei diesen Versuchen muss allerdings auch die relativ hohe Strahlendosis berücksichtigt werden, die im Bereich der Sterilisation liegt und die zur Abtötung von Tumorzellen durchschnittlich verwendete Dosis von 250-300 Gy deutlich übersteigt [Böhm et al., 2003: 356; Chen et al., 2002: 1157; Sys et al., 2002: 174].

Die Verbesserung der bestehenden Methoden und die Entwicklung alternativer Verfahren sind auf Grund der zum Teil deutlichen Komplikationen notwendig. Eine primäre Voraussetzung ist dabei die reproduzierbare, vollständige Abtötung von malignen Zellen durch das angewandte Verfahren. Weiterhin sollte die biomechanische Stabilität der Resektate nach der Behandlung erhalten bleiben. Ein vielversprechender Ansatz, der zu erfolgreichen ersten Laborresultaten führte, ist die Verwendung von hydrostatischem Hochdruck (HHD), um extrakorporal Tumorzellen zu devitalisieren und das Gewebe folgend zu reimplantieren.

In der Lebensmittelindustrie wird hydrostatischer Hochdruck schon seit längerem mit Erfolg zur Haltbarmachung von Lebensmitteln eingesetzt. Mit dieser Methode wird eine Wachstumshemmung bzw. Abtötung von Viren, Bakterien und anderen Mikroorganismen erreicht [Alpa et al., 2000: 33; Freitas et al., 2003: 205; Garcia-Graells et al., 2000: 4173; Kingsley et al., 2002: 1605; Nakagami et al., 1992: 255; O'Reilly et al., 2000: 4890; Wuytack et al., 2002: 205]. Selbst verschiedene Sporen können durch HHD inaktiviert werden [Delacour et al., 2002: 38; Drews et al., 2002: 765; Oh et al., 2003: 599]. Dabei zeigt sich die Behandlung von Lebensmitteln mit HHD schonender als andere gängige Verfahren wie Erhitzen, Schockgefrieren, Ansäuern oder Trocknen. Aromen und Vitamine werden durch diese Behandlung erhalten [Gould, 2000: 84 und 2001: 463; San Martin et al., 2002: 627]. Bereits 1899 erforschte Hite die Wirkung von Hochdruck in der Verarbeitung von Lebensmitteln [Hite, 1899: 15]. In den 90er Jahren wurde diese Technologie in Japan

weiterentwickelt, mittlerweile wird hydrostatischer Hochdruck mit bis zu 900 MPa eingesetzt [McClements et al., 2001: 514].

Auch bei eukaryotischen Zellen führt eine Inkubation mit HHD zu einer Schädigung und zu einem Abtöten der Zellen, wie verschiedene Arbeiten gezeigt haben [Crenshaw et al., 1996: 277-278; Dibb et al., 1981: 169-176; Hashiguchi et al., 1999: 107-111; Mentré et al., 2001: 46-49; Takano et al., 1997: 155-158]. Dabei können neben gesunden Zellen auch verschiedenste Arten von Tumorzellen durch HHD inaktiviert werden [Dibb et al., 1981: 169-176; Diehl et al., 2003: 1851; Diehl et al., 2004: 371; Goldman et al., 2000: 352-357; Matsumoto et al., 1998: 87; Take et al., 2001: 193-198; Yamaguchi et al., 1997: 257]. Der Druckbereich, in dem eine Zellabtötung erreicht werden kann, hängt dabei vor allem von der Zelllinie ab. Tumorzellen der gleichen Zellart zeigen sich bei einer Behandlung mit HHD resistenter als gesunde Zellen [Dibb et al., 1981: 169-176; Diehl et al., 2003: 1851-1854; Diehl et al., 2004: 371]. In eigenen Arbeiten konnte bei verschiedenen normalen und malignen Zellen nachgewiesen werden, dass bei Druckstufen ab 350 MPa alle Zellen und Zelltypen sicher abgetötet werden [Diehl et al., 2003: 1851-1854; Diehl et al., 2004: 371].

Wie für die Bestrahlung und Autoklavierung aufgezeigt, könnte jedoch auch eine extrakorporale HHD-Behandlung zu einer mechanischen Beeinträchtigung des Resekts führen. Für befriedigende Behandlungsergebnisse ist u. a. jedoch ein Erhalt der mechanischen Stabilität erforderlich. In verschiedenen Arbeiten konnte vor diesem Hintergrund ein Erhalt der biomechanischen und biologischen Eigenschaften von Knochensegmenten und Sehnen nach einer Inkubation mit HHD bei 300 und 600 MPa nachgewiesen werden [Diehl et al., 2001: 121; Diehl et al., 2005: eingereicht; Steinhauser et al., 2006: 130].

Bislang liegen keine Ergebnisse zu der Wirkung von HHD auf Chondrozyten und Chondrosarkomzellen vor. Ebenso sind keine Resultate zu den Auswirkungen auf die biomechanischen oder immunhistochemischen Eigenschaften von Knorpelgewebe verfügbar. Dies wäre jedoch wünschenswert, zumal Malignome des Stütz- und Bewegungsapparates, insbesondere das Chondrosarkom, Gelenke und Knorpel infiltrieren können, bzw. von diesem ausgehen.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit soll die Apoptose-Induktion und die letale Wirkung einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung bei humanen Chondrozyten und Chondro-

sarkomzellen untersuchen. Ein weiteres Ziel des ersten Teils ist es, dabei mögliche Unterschiede zwischen adhärent gewachsenen Zellen und Zellen der gleichen Zelllinie in Suspension aufzuzeigen. Im zweiten Teil der Arbeit sollen die Auswirkungen einer Hochdruckbehandlung auf die biomechanischen und immunhistochemischen Eigenschaften von osteochondralem Gelenkknorpel und von Meniskus erarbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Geräte und Werkzeuge

- Brutschrank „Function Line“, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
- Einmal-Skalpelle, steril, PfM, Köln, Deutschland
- FACSCalibur, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- Handsäge, herkömmlich erwerbbar
- Henkellocheisen, Durchmesser 10 mm, herkömmlich erwerbbar
- Histomesser, „Prep Blades“, Edward Weck & Company, Inc. Research Triangle Park, New York, USA
- Hochdruckmaschine „Sitec“, Sitec Engineering, Zürich, Schweiz
- Hochdruckmaschine HDR 100-20, RECORD Maschinenbau GmbH, Königsee, Deutschland
- Konfokale Laserscanning Einheit, Leica, Heidelberg, Deutschland
- Kryomikrotom HM 500 OMV, Microm, Walldorf, Deutschland
- Laminar flow „Herea Safe“, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
- Leica Immunostainer 5050, Leica, Heidelberg, Deutschland
- Lichtmikroskop „Axiovert 25“, Zeiss, Jena, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim, Deutschland
- Schüttel-Misch-Tisch, „Titramax/Inkubator“, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
- Thermostat K10, Haake, Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland
- Universalprüfmaschine zwicki1120, Zwick, Ulm, Deutschland
- Vortexer M52 Minishaker, IKA Works Inc., Wilmington, USA
- Zentrifuge „Centrifuge 5804 R“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge „Centrifuge 5415 D“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Lösungen, Medien und Chemikalien

- Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Katalog-Nr. 1 988 549
- Aqua Spüllösung DeltaSelect, steril, DeltaSelect GmbH, Pfulingen, Deutschland
- Arthroskopie-Lösung „Purisolet SM“, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
- D(+)-Sucrose, Fluka, Buchs, Deutschland
- DAB (Diaminobenzidin), Vector Labs, Burlingame, USA
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit HEPES und High Glucose, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- DTT (1,4-Dithiothreitol), Boehringer, Mannheim, Deutschland
- Dulbecco's PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- EDTA-Natrium >99 %, RNase-frei, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
- Einbettmedium, „Tissue freezing medium“, Jung, Nussloch, Deutschland
- Enzyme: Hyaluronidase (1,5 U/ml)/Chondroitinase (0,25 U/ml) ABC
Chondroitinase ABC, Chondroitinase ACII, alle über Herrn PD Dr. Milz, München
- Ethanol 70 %-100 %, Methanol 100 %, Xylol 100 %, VWR International GmbH,
Darmstadt, Deutschland
- FKS (Fetales Kälberserum), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Iodacetamid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Kunstharz „DPX Mountant for histology“, Fluka, Buchs, Deutschland
- L-15 Leibovitz Medium, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- L-Glutamin, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Meyer's Haematoxylin, selbst angesetzt nach Romeis, mikroskopische Technik
- PBS (Phosphate-buffered saline) 0,01 M, pH 7,4, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
- PenStrep (Penicillin/Streptomycin), Gibco, Paisley, Schottland
Inhalt: 25000 Einheiten/ml Penicillin, 25 mg/ml Streptomycin
- Primärantikörper: Col 1 (Kollagen-I), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; ClICI
(Kollagen-II), Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA; FH7A
(Kollagen-III), 12C5 (Versican), 1C6 (Aggrecan), 8A4 (Link-Protein), alle über Herrn
PD Dr. S. Milz, Davos
- Tris-Puffer „Trizma base“, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

- Trypanblau, 0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Trypsin/EDTA, 0,5 g/l Trypsin (1:250) und 0,2 g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A, Gibco, Paisley, Schottland
- Vectastain ABC-kit *Elite*, Vector Labs, Burlingame, USA

Gefäße, Pipetten und Sonstiges

- 96er-wells und Deckel, steril, Nalge Company, Rochester, USA
- Cryoröhrchen, Nalgene Cryoware "cryogenic vials", Nalge Company, Rochester, USA, Cat-Nr. 5000-0012
- Dako-Pen, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
- Elektrische Pipette, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Falcon Blue Max Tube 15 ml und 50 ml, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- Humane Chondrozyten (HCHON), proliferierend, Cell Lining, Berlin, Deutschland
- Humane Chondrosarkomzellen (SW1353), Bank of biological material; Interlab Cell Line Collection (ICLC), Genua, Italien
- Objektträger und Deckgläschen Super Frost[®] Plus, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
- Parafilm M, American National Can_{TM}, Greenwich, USA
- Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Reaktionsgefäße 0,6 ml, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Deutschland
- Sterile Kunststoff-Pipetten Advantage 5 ml, 10 ml und 25 ml, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- T-25 Zellkulturflaschen BD Falcon (25 cm² Bodenfläche) mit Gasaustauschdeckel und mit „Blue Plug Seal Cap“, BD Biosciences, Bedford, USA
- T-75 Zellkulturflaschen BD Falcon (75 cm² Bodenfläche) mit Gasaustauschdeckel und mit „Blue Plug Seal Cap“, BD Biosciences, Bedford, USA
- T-175 Zellkulturflaschen BD Falcon (175 cm² Bodenfläche) mit Gasaustauschdeckel und mit „Blue Plug Seal Cap“, BD Biosciences, Bedford, USA

2.2 Aufbau der Hochdruckanlage für die Zellversuche

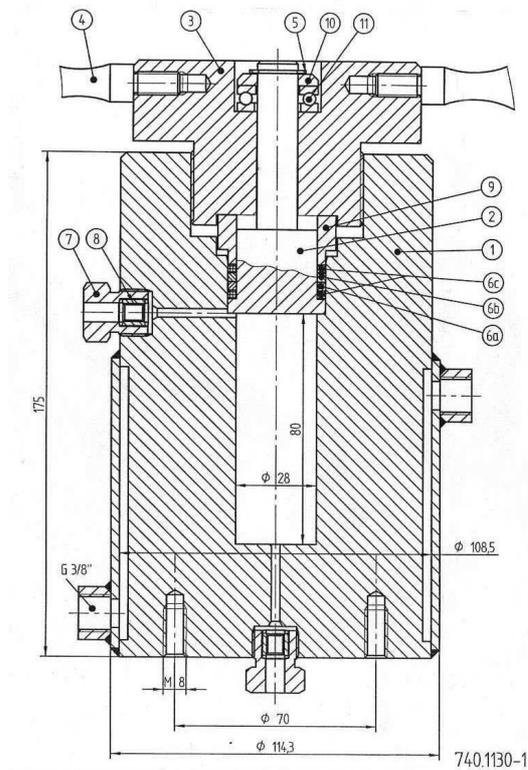
Die Zellversuche mit hydrostatischem Hochdruck (HHD) wurden an der Hochdruckanlage Modell 765.0050 (SITEC Sieber Engineering AG Zürich, Schweiz) durchgeführt. Die Hochdruckanlage gliedert sich in zwei funktionelle Teile, in das Druckerzeugungssystem mit dem Hochdruck-Autoklaven und in das Druckregelungssystem. An den Autoklaven ist über ein Thermostat ein Wasserbad angeschlossen, über das die gewünschte Betriebstemperatur der Autoklavenkammer eingestellt werden kann. In den durchgeführten Versuchen wurden stets 37 °C gewählt, so dass die inkubierten Proben keinen zu großen Temperaturschwankungen ausgesetzt wurden. Die Hochdruckanlage kann einen Betriebsdruck von bis zu 400 MPa aufbauen. Einen Überblick über die weiteren technischen Daten der Anlage gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Technische Daten der Hochdruck-Anlage für die Zellversuche.

Hochdruckanlage	
Betriebsdruck	Maximal 4000 bar (400 MPa)
Betriebstemperatur	Bis 50 °C
Betriebsmedium	Wasser
Betriebsspannung	230 V
Druckerzeugungsaggregat	
Betriebsdruck	4000 bar (400 MPa)
Hubvolumen	4 ml
Betriebstemperatur	20 °C (Raumtemperatur)
Betriebsmedium	Wasser

Die Autoklavenkammer hat ein Volumen von 50 ml, einen Innendurchmesser von 28 mm und eine Wandstärke von 40,25 mm. Um Proben zu inkubieren, wird der Autoklav vorgewärmt und die Probe in die Autoklavenkammer, in der sich ein Übertragungsmedium befindet, überführt. Als Übertragungsmedium dient ein Wasser/Glykol-Gemisch im Verhältnis 1:1. Die Kammer wird mit einem Schraubdeckel verschlossen, der mit selbstdichtenden Ringen und Dichtungen ausgestattet ist. Durch leichtes Anziehen des Deckels entsteht eine Vorspannung im Dichtungssystem und der Deckel dichtet sich unter Druck selbständig ab. Zur

Druckerzeugung dient eine Spindelpresse, die mit einer Automatik ausgestattet ist, um den gewünschten Betriebsdruck nach dessen Erreichen konstant zu halten. Die Abbildung 1 zeigt das technische Schema des Hochdruck-Autoklaven.



- 1: Zylinder
- 2: Stopfen
- 3: Druckschraube
- 4: Handgriff
- 5: Seegering
- 6a: Dichtung
- 6b: Dichtung
- 6c: Ring
- 7: Druckschraube ¼ HP
- 8: Druckring ¼ HP
- 9: Druckstück
- 10: Distanzscheibe
- 11: Axial-Rillenkugellager

Abb. 1: Hochdruckautoklav

2.3 Verwendete Zelllinien

Für die Zellversuche mit hydrostatischem Hochdruck wurden die folgenden zwei Zelllinien eingesetzt:

- Primäre humane Chondrosarkomzellen (SW1353)

Die Zellen stammen von einer 72 Jahre alten, kaukasischen Frau. Sie wurden über Herrn Dr. T. Florio (Abteilung Neurowissenschaften, ABC, Genua, Italien) von der „Bank of biological material; Interlab Cell Line Collection“ bezogen. (Bezugsnummer ICLC HTL99008).

- Humane Chondrozyten (HCHON), proliferierend

Die Zellen wurden von der Firma „Cell Lining“ (Berlin, D) bezogen (Katalog-Nr. 1110211).

2.4 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit Zellen oder Medien erfolgten zur Vermeidung von Kontaminationen stets unter sterilen Bedingungen. Es wurde mit Handschuhen unter der sterilen Laminar flow „Herasafe“ (Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D) gearbeitet. Die Handschuhe, die Arbeitsfläche und alle verwendeten Gefäße und Flaschen wurden vor der Benutzung mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Für Pipettierschritte wurden sterile Einmal-Pipetten (5, 10 und 25 ml) benutzt („Falcon Advantage“, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA).

2.4.1 Herstellung der Nährmedien

Alle benötigten Bestandteile der Nährmedien wurden zunächst im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Für die Chondrozytenkultur wurde DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit HEPES und High Glucose (500 ml, Biochrom KG, Berlin, D) verwendet. Anteilsmäßig wurden 10 %, bzw. 50 ml FKS (Fetales Kälberserum, Biochrom), sowie je 1 %, bzw. 5 m, PenStrep (Penicillin/Streptomycin, Gibco, Paisley, Schottland), Vitamine und L-Glutamin (Biochrom) hinzupipettiert und das fertige Medium kurz geschwenkt.

Für die Chondrosarkomzellkultur wurde L-15 Leibovitz-Medium (500 ml, Biochrom) verwendet. Hinzupipettiert wurden ebenfalls 10 %, bzw. 50 ml FKS, sowie je 1 %, bzw. 5 ml PenStrep, Vitamine und L-Glutamin.

2.4.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in T-25, T-75 und T-175 Kulturflaschen (BD Falcon, BD Biosciences, Bedford, USA) kultiviert. In die Kulturflaschen wurden je nach Größe 5, 10 oder 20 ml Nährmedium gegeben. Zwei- bis dreimal wöchentlich erfolgte eine morphologische Kontrolluntersuchung der Zellen unter dem Lichtmikroskop mit anschließendem Mediumwechsel.

Hierfür wurde zunächst das alte Medium aus den Kulturflaschen herauspipettiert. Es wurde anschließend PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzugegeben, je nach Größe der Flasche 2, 3 oder 5 ml, die Flasche kurz geschwenkt und das PBS wieder entfernt. Der Waschvorgang mit PBS diente dazu, restliches Nährmedium und tote Zellen zu entfernen. Schließlich wurde wieder frisches Nährmedium zu den Zellen pipettiert. Die anschließende Inkubation erfolgte im Brutschrank („Function Line“, Heraeus) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Chondrosarkomzellkulturen wurden in Kulturflaschen mit einem Plug Seal Cap (Falcon) kultiviert. Ein Plug Seal Cap ist ein Deckel, der keinen Gasaustausch zulässt. Die Inkubation der Chondrosarkomzellkultur im Brutschrank sollte in Abwesenheit von CO₂ erfolgen, wie es in der von ICLC mitgelieferten Beschreibung ausdrücklich aufgeführt wurde. Die Chondrozyten wurden in Kulturflaschen mit normalem Gasaustausch-Deckel kultiviert.

Die Verdoppelungszeit der Chondrosarkomzellen von etwa 2-3 Tagen machte es notwendig, die Zellen zweimal wöchentlich zu splitten. Die Chondrozyten wurden alle 10-14 Tage gesplittet.

2.4.3 „Splitting“ der Zellkulturen

Die Zellen wurden gesplittet, sobald eine Konfluenz von 70-80 % erreicht war. Chondrozyten und Chondrosarkomzellen sind adhärent wachsende Zellen. Wenn derartige Zellen zu dicht wachsen, kommt es zur Kontakthemmung und zu unerwünschten morphologischen Veränderungen und zur Dedifferenzierung. Daher ist darauf zu achten, rechtzeitig ein Splitting der Zellen durchzuführen.

Zunächst wurde das Nährmedium aus den Kulturflaschen herauspipettiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden 2, 3 oder 5 ml Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, Gibco) hinzugegeben. Die Flasche wurde dann für 3 min im Brutschrank belassen. Danach wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop auf Ihre Ablösung hin beurteilt. Waren noch adhärenente Zellen zu sehen, so liessen sich diese ebenfalls durch leichtes Klopfen gegen den Flaschenboden lösen. Im Anschluss wurden gleiche Mengen an Nährmedium hinzugefügt, um Trypsin/EDTA zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette aufgenommen und entweder in eine größere Zellkulturflasche überführt, oder zu gleichen Teilen in neue,

gleich große Kulturflaschen gebracht. Es wurde dann noch jeweils soviel Nährmedium hinzugegeben, dass sich in jeder T-25 Kulturflasche insgesamt 5, in jeder T-75 Kulturflasche 10 und in jeder T-175 Kulturflasche 20 ml Nährmedium befanden.

2.5 Hochdruckinkubation der Zellen in Suspension

Die Chondrozyten und Chondrosarkomzellen wurden in Druckstufen zwischen 50 und 350 MPa mit einer Inkubationsdauer von 10 min bei 37 °C behandelt. Für die Nullkontrolle wurden die Proben bei Raumdruck belassen. Die Nullkontrolle wird weiter als Druckstufe 0 MPa bezeichnet. Bei jeder Druckstufe wurden 3 Proben inkubiert. Je Versuchsreihe wurden Zellen aus drei gut bewachsenen T-175 Kulturflaschen mit Hilfe von Trypsin/EDTA gelöst und in ein 50 ml Bluecap-Gefäß (Falcon) überführt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 250 U/min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet mit 10 ml Nährmedium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (s. u.) die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde der Zellsuspension so viel Medium hinzugefügt, dass sich eine Konzentration von 500.000 Zellen/ml einstellte. Die Suspension wurde auf dem Vortexer gut vermischt. Dann wurden in je ein Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) 0,7 ml dieser Suspension pipettiert, so dass die Gefäße randvoll gefüllt waren und ohne Luftabschluss verschlossen werden konnten. Sie wurden mit Parafilm umwickelt, um eine gute Abdichtung zu erzielen. Die so vorbereiteten Proben wurden dann dem hydrostatischen Hochdruck ausgesetzt, je drei Proben pro Druckstufe.

2.5.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Zuerst wurden die Randleisten der Zählkammer leicht befeuchtet und das Deckgläschen aufgeschoben. Die Kammer besteht aus neun Quadranten, die je eine Fläche von 1 mm² besitzen. So ergibt sich ein Volumen von 0,1 µl je Quadrant. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden aus der zuvor gut durchmischten Zellsuspension etwa 10 µl mit einer Pipette aufgenommen. Die Pipettenspitze wurde an den Rand des Deckgläschens angesetzt und langsam entleert. Durch die Kapillarkräfte füllte sich die Zählkammer (Abb. 2). Dabei war eine Über- oder Unterfüllung zu vermeiden, da dies die Auszählung hätte verfälschen können.

Unter dem Lichtmikroskop wurden die äußeren vier der neun Quadranten ausgezählt (Abb. 3). Sie sind jeweils nochmals in sechzehn Quadrate unterteilt. Um auf Linien liegende Zellen

dabei nicht doppelt zu zählen, wurden nur Zellen gezählt, die auf einer der beiden inneren Linien lagen. Die Zellzahl pro ml wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$Zz = gZ : 4 \times 10^4 \times Vd$$

$$Zz = \text{Zellzahl/ml}$$

$$gZ = \text{gezählte Zellen}$$

$$10^4 = \text{Kammerfaktor}$$

$$Vd = \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die gezählte Zellzahl wurde durch vier geteilt, da vier Quadranten ausgezählt wurden. Mögliche Fehler dieses Verfahrens beruhen zum einen auf einer mangelnden Durchmischung der Zellsuspension vor der Bestimmung, so dass zu große Zellcluster entstehen, zum anderen in einer zu hohen oder zu niedrigen Zellzahl in der Suspension. Um diese Fehler zu vermeiden wurde auf eine Mindestzahl von 20-30 gezählten Zellen geachtet. Die Zellsuspension wurde zudem vor jeder Probenentnahme gut auf dem Vortexer durchmischt. Weiterhin erfolgte eine Dreifachauszählung bei jeder Zellzahlbestimmung, um den Fehler so gering wie möglich zu halten.



Abb. 2: Neubauerkammer. Zur besseren Darstellung der Zählkammern sind diese mit Trypanblau gefüllt.

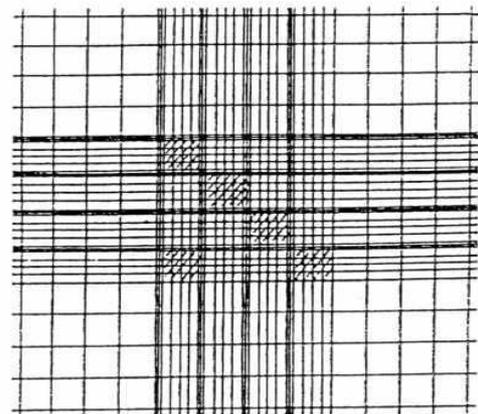


Abb. 3: Fadenkreuz der Neubauerkammer. Ausgezählt werden die äußeren vier der neun Quadranten.

2.5.2 Hochdruckinkubation der Zellproben

Zunächst wurden die Hochdruckmaschine und der Heizer, der die Autoklavenkammer temperierte, eingeschaltet. Die Temperatur für den Autoklaven wurde auf 37 °C eingestellt. An der Hochdruckmaschine selbst konnte die aktuelle Temperatur des Autoklaven abgelesen werden. Nach 10 bis 15 min erreichte die Temperatur 37 °C und es wurden je drei der vorbereiteten Proben zugleich in die vorgewärmte Autoklavenkammer überführt. Der Deckel

der Kammer wurde festgeschraubt und die gewünschte Druckstufe über ein elektronisches Display eingestellt. Als nächster Schritt wurde mit Hilfe der Handpumpe (Abb.4) Trägermedium in das System geschleust, um restliche Luftrückstände auszuschließen. Danach wurde das Ventil 3 (Abb. 4) geschlossen und mit der Handpumpe manuell ein Vordruck aufgebaut, der als aktueller Druck im Autoklaven auf dem elektronischen Display oberhalb der Zieldruckangabe abzulesen war. Nachdem anschließend ebenfalls Ventil 1 (Abb. 4) verschlossen wurde, konnte schließlich die Automatik eingeschaltet werden. Über eine Hydraulik wurde nun Druck aufgebaut bis der Zieldruck erreicht war. Der Druckaufbau benötigte je nach Druckstufe 20 bis 60 Sekunden. Der Zieldruck wurde für 10 min konstant gehalten ($\pm 0,1$ MPa). Für den Druckabbau wurde zunächst die Automatik abgeschaltet und dann die Hydraulik heruntergefahren, bis der aktuelle Druck 0 MPa erreichte und der Druckzylinder vollständig zurückgefahren war. Der Druckabbau erfolgte dabei in der gleichen Zeit wie der Druckaufbau. Hiernach wurden die Ventile 1 und 3 wieder geöffnet, der Deckel vom Autoklaven geschraubt und die inkubierten Proben konnten zur Auswertung entnommen werden.

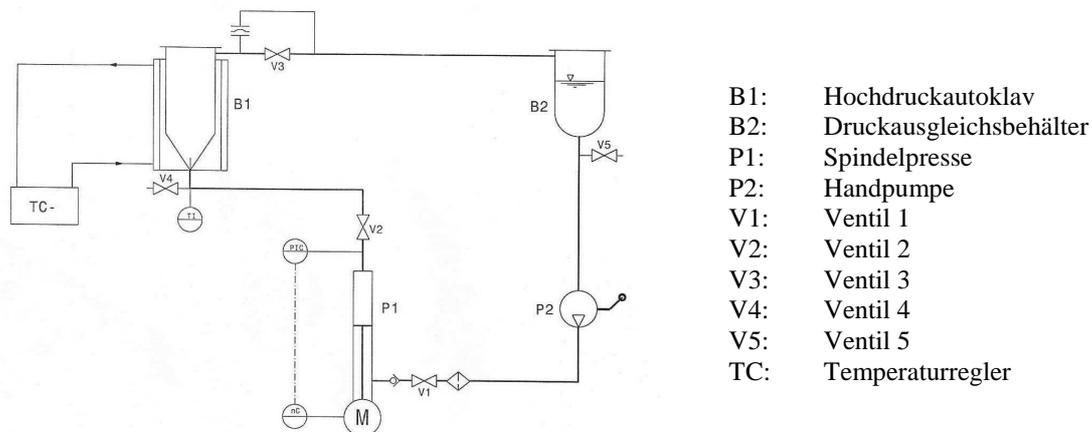


Abb. 4: Skizze des Druckerzeugungssystems mit Hochdruck-Autoklav und Druckregelung.

2.6 Hochdruckinkubation adhärent wachsender Zellen

Um bei Untersuchungen von adhären Zellen die *in vitro*-Bedingungen möglichst derer *in vivo* anzunähern, wurden humane Chondrozyten und humane Chondrosarkomzellen auf mit Fibronectin beschichtete 96er-Wells (Nalge Company, Rochester, USA) ausgesät, bevor sie der HHD-Inkubation zugeführt werden. Fibronectin (FN) ist ein Bindeprotein, welches Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, sowie Matrix-Matrix-Interaktionen

vermittelt [Loeser, 2000: 109; White et al., 2003: 251]. *In vivo* ist FN für die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen notwendig und an der Formation von Knochengewebe beteiligt [Garcia et al., 1998: 48-49; Weiss et al., 1980: 2074 und 1981: 634-636]. *In vitro*-Versuche konnten eine beschleunigte und verbesserte Adhäsion von Chondrozyten an Kulturgefäße aufzeigen, die zuvor mit FN beschichtet wurden [Bhati et al., 2001: 79-81; Imoto et al., 2002: 41-43].

Zwei einzelne Wells zusammen wurden in je ein Cryo-Röhrchen (Cryogenic Vials, Nalge Company, Rochester, USA) überführt und der Hochdruckinkubation zugeführt. Dabei wurden sowohl die Chondrozyten wie auch die Chondrosarkomzellen in Druckstufen zwischen 50 und 200 MPa behandelt. Für die Nullkontrolle wurden die Zellproben bei Raumdruck belassen. Die Inkubationsdauer betrug analog der Inkubation der suspendierten Zellen jeweils 10 min (37 °C). Es wurden auch hier bei jeder Druckstufe 3 Proben inkubiert.

2.6.1 Probenvorbereitung und Hochdruckinkubation adhärent wachsender Zellen

Die Arbeitsschritte erfolgten stets unter sterilen Bedingungen unter der Laminar flow. Aus den steril verpackten 96er-Wells wurden zunächst die Wells aus der Well-Platte herausgebrochen, um einzelne Wells zu erhalten. Es wurden dann so viele Wells wieder auf die Well-Platte aufgesteckt, wie für eine Versuchsreihe benötigt wurden.

Als nächster Schritt erfolgte die Beschichtung mit Fibronectin. Die Fibronectin-Stammlösung hatte eine Konzentration von 100 µg/ml. Aus der Stammlösung wurden zunächst 100 µl entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, welches mit sterilem Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt wurde. Aus dieser Lösung wurden zur Beschichtung wiederum 100 µl entnommen und in jedes einzelne Well pipettiert, so dass jedes Well mit 1 µg. Fibronectin beschichtet wurde. Es erfolgte eine Inkubation für 24 h bei 5-10 °C. Danach wurden die Überstände abpipettiert, die Wells mit PBS gewaschen und die Zellen konnten ausgesät werden. In jedes Well wurden etwa 10.000 Zellen pipettiert, bei einer auf die Konzentration von 100.000 Zellen/ml eingestellten Chondrozyten- bzw. Chondrosarkomzellsuspension (Abb. 5). Die Wellplatte wurde nach der Aussaat für 24 Stunden im Brutschrank belassen, damit sich die Zellen absetzen und an Fibronectin binden konnten.

Nach Ablauf der 24 Stunden wurde zunächst das Anwachsen der Zellen unter dem Lichtmikroskop überprüft. Überschüssiges Medium wurde entfernt und jedes Well mit 100 µl PBS gespült, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Danach wurden die einzelnen Wells mit Nährmedium vollständig aufgefüllt und einzeln mit Parafilm abgedichtet. Je zwei dieser Wells wurden in ein Cryo-Röhrchen überführt, welches zum Ausschluss von Luft anschließend mit Aqua dest. aufgefüllt und dann zugeschraubt wurde (Abb. 6). Die Cryo-Röhrchen wurden mit Parafilm umwickelt und die Proben konnten mit Hochdruck behandelt werden. Die Hochdruckinkubation der adhärennten Zellen erfolgte im weiteren Verlauf wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben.

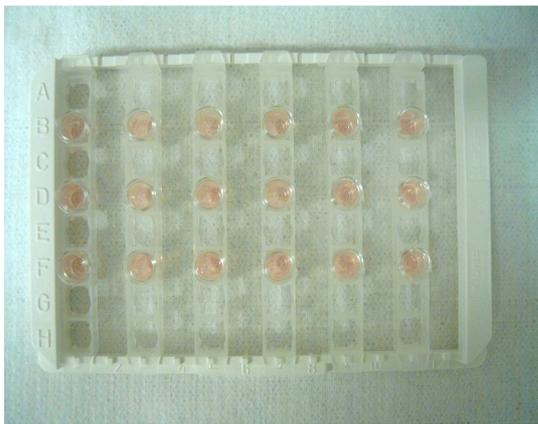


Abb. 5: In einzelne „Wells“ ausgesäte Zellen. Die „Wells“ wurden zuvor mit Fibronektin beschichtet.

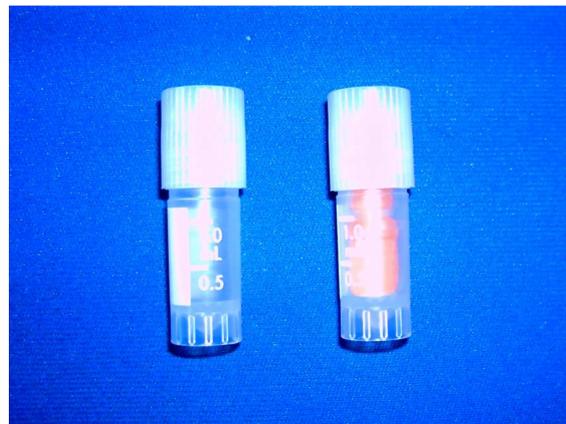


Abb. 6: Cryo-Röhrchen. Das linke ist leer, das rechte ist mit zwei Zellbewachsenen Wells bestückt, die mit Medium aufgefüllt und mit Parafilm umwickelt wurden.

2.7 Auswertung des Effektes der Hochdruckinkubation der Zellen

Um die Effekte der hydrostatischen Hochdruckinkubation auf Chondrozyten und Chondrosarkomzellen zu erfassen, erfolgte zum einen die prozentuale Bestimmung von vitalen und avitalen Zellen direkt im Anschluss an die Hochdruckbehandlung mit dem Trypanblau-Test [Mishell et al., 1980: 1-25]. Zum anderen wurde 24 h später mit den Zellen in Suspension eine Fluoreszenz-Messung im FACS (Fluorescence-activated Cell Sorter) mit Annexin V (AN) als Apoptosemarker und Propidiumiodid (PI) als Marker für destruierte Zellen durchgeführt [Bronckers et al., 2000: 267-72; Koopman et al., 1994: 1415-20; Moore et al., 1998: 265-78; Reutelingsperger et al., 2002: 123-32].

2.7.1 Bestimmung der Zahl vitaler und avitaler Zellen mit dem Trypanblau-Test

Trypanblau ist ein Farbstoff, der häufig zur Differenzierung vitaler und avitaler Zellen herangezogen wird. Trypanblau kann bei zerstörter bzw. defekter Membran (leakage) in Zellen permeieren und bindet dort an intrazelluläre Proteine. Unter dem Lichtmikroskop resultiert eine dunkelblaue Färbung avitaler Zellen, während vitale Zellen weiß erscheinen.

Um den prozentualen Anteil lebender und toter Zellen nach der Hochdruckinkubation zu bestimmen, wurde die Zellzahl ebenfalls wie unter 2.4.1 beschrieben mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurden zuvor eine bestimmte Menge Trypanblau und eine bestimmte Menge der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und auf dem Vortexer gut durchmischt. Bei den Versuchsreihen mit den Zellen in Suspension wurden 10 µl der Zellsuspension zu 40 µl Trypanblau pipettiert.

Um den Trypanblau-Test bei den an Fibronectin adhären Zellen durchzuführen, wurden zunächst die Überstände der einzelnen Wells nach der Hochdruckinkubation in 0,7 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen, die am Boden der Wells adhären waren, wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst und in die entsprechenden Reaktionsgefäße hinzupipettiert. Diese Suspension wurde für 10 min bei 250 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Nährmedium resuspendiert. Hieraus wurden zur Zellzahlbestimmung je 30 µl entnommen und je 30 µl Trypanblau hinzugefügt.

Es wurde dann weiter verfahren, wie unter 2.4.1 beschrieben. In der Berechnungsformel musste der Verdünnungsfaktor durch die Zugabe von Trypanblau berücksichtigt werden. In den vorliegenden Versuchen wurden zu 40 µl Trypanblau 10 µl Zellsuspension sowie zu 30 µl Trypanblau ebenfalls 30 µl Zellsuspension gegeben, so dass die Verdünnung 1:5 bzw. 1:2, der Verdünnungsfaktor also 5 bzw. 2 betrug.

2.7.2 Messung der Annexin V-Bindung und Propidiumiodid-Aufnahme im Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS)

Die in Suspension mit HHD inkubierten Zellproben wurden einer Annexin V- und Propidiumiodid-Fluoreszenzmessung im FACS unterzogen, um die Auswirkungen einer HHD-Behandlung auf Apoptose und Zelltod zu untersuchen. Die Fluoreszenz-Messung mit

Annexin V ist neben dem TUNEL-Assay [Lizard et al., 1997: 61; Loo et al., 1998: 251-64; Moore et al. 1998: 265-78] die gängigste Methode, die Apoptoserate von chondralen und ossären Zellen zu bestimmen.

2.7.2.1 Prinzip der FACS-Messung

Apoptotische Zellen verlieren ihre Zellmembranpolarität. Diese wird durch den sogenannten Flip-Flop-Mechanismus aufrechterhalten. Treten Zellen in den Apoptosezyklus ein, so erliegt dieser Mechanismus und an der äußeren Membran kommt es zu einer Anhäufung von Phosphatidylserin (PS), welches sich normalerweise an der inneren Membran befindet und als früher Marker des apoptotischen Zelltods angesehen wird [Bratton et al., 1999: 28113; Frasch et al., 2004: 17625; van Engeland et al., 1998: 1]. Durch diese PS-Präsentation wird die Phagozytose apoptotischer Zellen getriggert [Bratton et al., 1999: 28113]. Annexin V (AN) besitzt die Fähigkeit, hochaffin an PS zu binden [Darzynkiewicz et al., 1998: 33-36; van Engeland et al., 1998: 1]. Wird AN mit einem Fluoreszenz-Marker konjugiert und zu einer Zellprobe hinzugegeben, so wird sich AN mit dem gebundenen Marker an apoptotische Zellen binden, die PS präsentieren. Vitale Zellen präsentieren kein PS. So entsteht je apoptotischer Zelle ein Fluoreszenz-Signal, welches in einem Durchflusszytometer quantifiziert und dargestellt werden kann.

Die zusätzliche Messung von PI dient der Differenzierung zwischen Zellen, die sich in der Apoptose befinden und bereits toten Zellen, bzw. Zelltrümmern. PI interkaliert mit DNA-Doppelsträngen, d. h. PI baut sich zwischen Nukleinsäuren ein, kann bei intakter Membran allerdings nicht in die Zelle permeieren, so dass eine Bindung mit messbarer Fluoreszenz nur bei zerstörter Zellmembran möglich ist. So sind bei einem Doppelsignal in der Messung von PI und AN die Zellen nicht apoptotisch, sondern sie müssen bereits eine Membranundichtigkeit aufweisen bzw. sie sind zerstört.

Für die Fluoreszenz-Messungen am FACS (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) wurde das Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D) verwendet. An AN ist bei diesem Kit Fluorescein konjugiert, welches bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird. Die Extinktion liegt bei 518 nm. PI besitzt eine Eigenfluoreszenz, die bei einer Wellenlänge von 488-540 nm angeregt wird. Die Extinktion liegt bei 617 nm.

2.7.2.2 Hochdruckinkubation der Zellen für die FACS-Messung

Die Hochdruckinkubation der Zellproben für die AN-Bestimmung erfolgte zunächst wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben. Es wurden nur Chondrozyten und Chondrosarkomzellen in Suspension durchflusszytometrisch untersucht. Die Behandlung erfolgte in Druckstufen bis 200 MPa. Für die Nullkontrolle wurden die Zellen bei Raumdruck belassen. Im Anschluss an die Hochdruckbehandlung wurden die Proben aus der Autoklavenkammer entnommen und direkt in ein Ethanolbad (70 %) gebracht, um eine Kontaminierung zu verhindern. Aus diesem Ethanolbad wurden die Proben erst unter der Laminar flow entnommen. Die Zellen aus den einzelnen Reaktionsgefäßen wurden dann, je Druckstufe gesondert, in eine T-75 Kulturflasche pipettiert und diese mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt. Es wurden also etwa 1 Mio Zellen je Druckstufe rekultiviert. Die Kulturflaschen wurden dann für 24 h im Brutschrank belassen.

2.7.2.3 Probenvorbereitung und FACS-Messung

Nach 24-stündiger Inkubation der rekultivierten Zellen im Brutschrank wurden nach der Begutachtung unter dem Mikroskop zunächst die Überstände aus den Kulturflaschen abpipetiert und je Druckstufe gesondert in ein zuvor beschriftetes 15 ml Falcon „Blue Max Tube“ überführt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und ebenfalls in das der Druckstufe entsprechende „Blue Max Tube“ gebracht. Diese Suspensionen wurden dann für 10 min bei 250 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 5 ml Nährmedium resuspendiert. Hieraus erfolgte dann je Druckstufe bzw. Gefäß gesondert eine Zellzahlbestimmung.

Die Zellen wurden weiter auf vier FACS-Röhrchen je Druckstufe aufgeteilt. Dabei sollte sich in allen FACS-Röhrchen etwa die gleiche absolute Zellzahl befinden. In den vorliegenden Versuchen betrug die Zellzahl immer etwa 200.000 pro FACS-Röhrchen. Die Röhrchen wurden für 5 min bei 300 U/min zentrifugiert, und der Überstand entfernt. Die Zellpellets in den einzelnen Röhrchen wurden mit je 50 µl der entsprechenden Reaktionslösungen für die FACS-Messung resuspendiert.

Die Reaktionslösungen wurden zuvor in den benötigten Konzentrationen hergestellt. Als Grundsubstanz der Reaktionslösungen diente der im Kit enthaltene Inkubationspuffer, mit

dem ebenfalls die Grundfluoreszenz bestimmt wurde. Für die Messungen der Chondrosarkomzellen wurde eine Konzentration von 20 µg AN je 1 ml Reaktionslösung bzw. von 2,5 µg PI je 1 ml Reaktionslösung eingestellt, für die gleichzeitige Messung von AN- und PI-Fluoreszenz dementsprechend eine Konzentration von 20 µg AN und 2,5 µg PI je 1 ml Reaktionslösung. Die Chondrozyten benötigten höher konzentrierte Reaktionslösungen von 30 µg AN bzw. von 10 µg PI je 1 ml Reaktionslösung, zur gemeinsamen Messung also 30 µg AN und 10 µg PI je 1 ml Reaktionslösung.

Die Proben wurden dann für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zu jedem FACS-Röhrchen 500 µl Inkubationspuffer hinzugegeben, die Suspension auf dem Vortexer kurz vermischt und die Proben konnten am FACS-Gerät durchflusszytometrisch ausgewertet werden. Das erste Röhrchen diente dabei der Messung der Grundfluoreszenz, das zweite der AN-Messung, das dritte Röhrchen der PI-Messung, mit der vierten Probe wurden sowohl die AN- als auch die PI-Fluoreszenz bestimmt. Für die Auswertung wurde vom Gerät die Zellsuspension angezogen. Jede dabei durchfließende Zelle entsprach einem Signal und je Röhrchen wurden 10.000 Signale gezählt.

2.8 Morphologische Bewertung hochdruckbehandelter Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie

Die Chondrozyten und Chondrosarkomzellen in Suspension wurden morphologisch an einem konfokalen Lasermikroskop (Axiovert 35, Zeiss, Jena) untersucht. Dabei erfolgte eine Fotodokumentation der jeweiligen Nullkontrolle und nach einer Behandlung bei 200 MPa (10 min, 37 °C). Zusätzlich erfolgte eine Fotodokumentation der Chondrosarkomzellen nach 150 MPa.

2.9 Auswertung der Vitalitätsanalyse mittels Trypanblau-Tests und der FACS-Messungen

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden gemittelt. Als Fehler wurde das Konfidenzintervall der 95 %-Perzentile ($p=0,05$) berechnet. Der Mittelwert der Nullproben wurde als 100 % definiert. Die Überlebensrate der Zellen nach der jeweiligen Druckbehandlung wurde prozentual dazu angegeben.

Die 50 %-Überlebensrate der Zellen wurde grafisch bestimmt. Für jede einzelne Messreihe wurde ein Graph angefertigt und der 50 %-Wert abgelesen. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt. Der Fehler wurde anhand der Standardabweichung angegeben.

Die Ergebnisse der vier einzelnen FACS-Messreihen von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen wurden gemittelt, als Fehler wurde die Standardabweichung berechnet.

2.10 Biomechanische und immunhistochemische Eigenschaften von Knorpelgewebe nach hydrostatischer Hochdruckinkubation

Um die mechanischen Eigenschaften von Knorpelgewebe vor und nach einer Hochdruckbehandlung zu testen, wurden jeweils 30 Knorpelproben aus den medialen und lateralen Femurkondylen, sowie aus den medialen und lateralen Menisken paariger boviner Kniegelenke (Abb. 7) gewonnen, so dass insgesamt 120 Proben ausgewertet wurden. Dabei dienten je 10 Proben als Kontrollproben, je 10 Proben wurden mit 300 MPa und je 10 mit 600 MPa behandelt. Alle Proben wurden aus insgesamt fünf verschiedenen Individuen gewonnen. Die Entscheidung, bovine Kniegelenke zu verwenden, lag zum einen in der guten Verfügbarkeit begründet, das Kniegelenk bot weiterhin mit Kondylen und Menisken zwei verschiedene Knorpelarten und Rinder sind zum Zeitpunkt der Schlachtung jung und etwa gleich alt. Die Kniegelenke wurden in frischem Zustand von der Fleischgroßhandlung Anzenberger, München, direkt nach der Schlachtung bezogen. Sichtbare degenerative und/oder traumatische Knorpelschäden waren ein Ausschlusskriterium für die Testung. Direkt nach der Probengewinnung wurden die Proben in Arthroskopie-Lösung (Purisolet SM, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, D) überführt. Dies geschah um eine Austrocknung und auf Grund der zum Knorpel isotonischen Eigenschaften der Lösung ebenfalls ein Anschwellen des Knorpels zu verhindern. Die Hochdruckbehandlung wurde für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Knorpelproben an einer Universalprüfmaschine (zwicki1120, Zwick, Ulm, D) auf ihre biomechanischen Eigenschaften hin getestet. Dies erfolgte durch einen Stress-/Relaxationsversuch. Die mit Hochdruck behandelten Proben wurden dabei mit unbehandelten Kontrollproben aus dem paarigen Kniegelenk verglichen. Die einzelnen Versuche wurden jeweils vollständig an einem Tag durchgeführt, so dass die Proben nicht eingefroren werden mussten.

2.10.1 Gewinnung der Knorpelproben

Zunächst wurde mit Hilfe eines Operationsbesteckes der Kapsel-Band-Apparat der Kniegelenke entfernt und das Gelenk exartikuliert, um die Femurkondylen und die Menisken freizulegen. Aus jedem Kondylus und Meniskus wurden standardisiert drei Knorpelproben entnommen (Abb. 8 und 9). Dies erfolgte mit Hilfe eines Lochsaisens mit einem Durchmesser von 10 mm (Abb. 10), so dass Knorpel-Knochenzylinder bzw. Knorpelzylinder mit einem Durchmesser von ebenfalls 10 mm aus den Kondylen und Menisken herausgestanzt werden konnten. Die herausgestanzten Proben wurden dann von der subchondralen Seite bzw. Meniskusunterseite her auf eine definierte Dicke von 4 mm plan zugearbeitet. Hierfür wurde ein hohlrunder Stahlzylinder verwendet, der 10 mm hoch war und dessen Innendurchmesser mit 10 mm dem Durchmesser der Knorpel-Knochen-Zylinder entsprach. In den Hohlzylinder konnte ein Stempel von 6 mm Länge eingesetzt werden, so dass eine Nut mit 4 mm Tiefe und 10 mm Durchmesser resultierte (Abb. 11). Die Proben konnten dann mit der Knorpeloberfläche voran in die Nut eingebracht werden. Mit einem Histomesser (Prep Blades, Edward Weck & Company, Inc. Research Triangle Park, New York, USA) wurden die Meniskusproben dann von der Unterseite her plan in Höhe des Stahlzylinders geschnitten, so dass sie die gewünschte Probendicke von 4 mm erreichten. Der subchondrale Knochen der Kondylenproben wurde mit einer Handsäge abgesägt und das restlich überstehende Gewebe mit Schmirgelpapier abgeschliffen. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die fertig bearbeiteten Knorpelproben.



Abb. 7: Bovines Kniegelenk. Im Bild links erkennt man Teile des femoralen Knorpels, nachdem die Kapsel eröffnet wurde (mit Pfeil markiert).

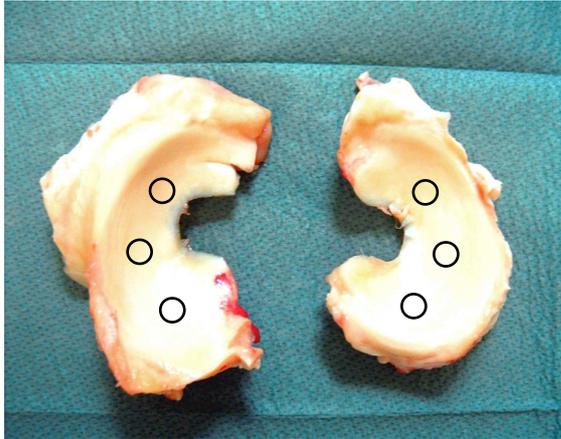


Abb. 8: Aufsicht auf die herauspräparierten Menisken eines bovinen Kniegelenkes. Die Entnahmestellen der Proben sind markiert.

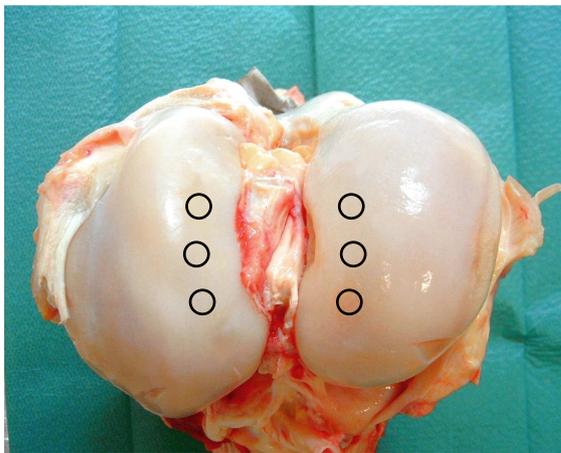


Abb. 9: Aufsicht auf die Kondylen eines bovinen Kniegelenkes nach Exartikulation und Präparation. Die Entnahmestellen der Proben sind markiert.



Abb. 10: Henkellocheisen. Durchmesser 10 mm.

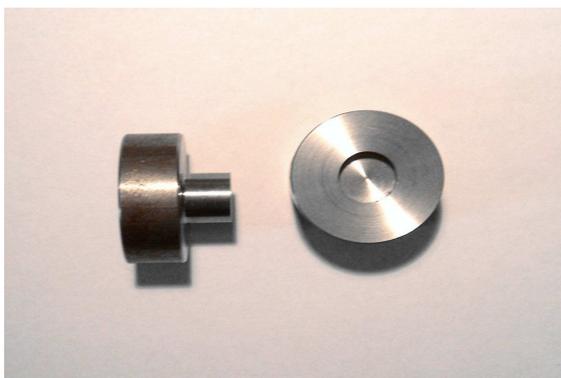


Abb. 11: Stahlzylinder zur Bearbeitung der Knorpelproben. Eine Probe kann in die Nut positioniert und dann mittels Handsäge (osteocondrale Proben) oder Messer (Meniskus-Proben) auf eine Dicke von 4 mm gesägt bzw. geschnitten werden.



Abb. 12: Zylinder aus dem medialen Meniskus eines bovines Kniegelenkes. Höhe 4 mm, Durchmesser 10 mm.



Abb. 13: Osteochondrale Zylinder aus dem medialen Femurkondylus eines bovines Kniegelenkes. Höhe 4 mm, Durchmesser 10 mm.

2.10.2 Hochdruckanlage und Hochdruckinkubation der Knorpelproben

Die Versuche wurden an der Hochdruckanlage HDR 100-20 (RECORD Maschinenbau GmbH, Königsee, D) durchgeführt (Abb. 14). Die Maschine kann Drücke von bis zu 600 MPa aufbauen. An die Hochdruckeinheit ist ein Thermostat (K10, Haake, Dreieich, D) angeschlossen, über den die Temperatur des in der Druckkammer befindlichen Übertragungsmediums eingestellt werden konnte. Als Übertragungsmedium diente ein Wasser/Glykol-Gemisch im Verhältnis 1:1. Die Hochdruckversuche mit Knorpelproben wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Hydraulikdruck konnte mittels eines Drehrades manuell eingestellt und der aktuelle Autoklavendruck über eine Anzeige abgelesen werden. Die Maschine hielt einen eingestellten Druck konstant.

Die fertig bearbeiteten Proben, jeweils drei gemeinsam, wurden direkt in ein mit Arthroskopie-Lösung gefülltes 15 ml „Blue Max Tube“ gebracht. Die Tubes wurden bis zum Rand mit Arthroskopie-Lösung aufgefüllt, so dass die Deckel luftdicht aufgeschraubt werden

konnten. Um die Deckel wurde Parafilm gewickelt. Die Proben konnten nun in die Autoklavenkammer gebracht werden und wurden für 10 min bei entweder 300 oder 600 MPa behandelt. Druckauf- und Druckabbau erfolgten gleichmäßig innerhalb von 60 s.

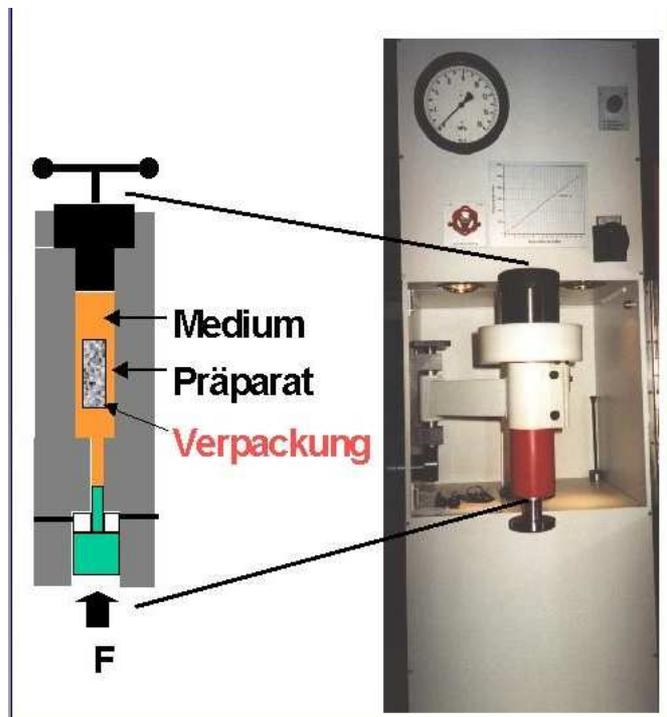


Abb. 14: Hochdruckanlage. Die Druckkammer und das Wirkprinzip sind schematisch vergrößert dargestellt.

2.10.3 Biomechanische Testung der Knorpelproben

Die Knorpelproben wurden einzeln mittels einer Universalprüfmaschine (zwicki1120, Zwick, Ulm, D) getestet. Hierfür wurden über einen an eine Kraftmessdose angebrachten Stempel, der am unteren Ende ein Stahlkugel (Durchmesser 5 mm) als Drucküberträger besaß, fünf axiale Belastungszyklen je Probe durchgeführt (Abb. 15). 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 definierte Maximalkraft von 7,0 N aufgebaut und der Stempel verblieb für 60 s in dieser Position. Hiernach fuhr der Stempel auf eine definierte Endposition zurück. Diese wurde erreicht, wenn die gemessene Kraft 0,1 N betrug. Der Stempel verblieb für weitere 60 s in dieser Endposition, bevor er danach wieder eine Vorkraft von 0,5 N aufbaute, diese Position als neue Ausgangsposition definierte und der Zyklus analog des ersten Belastungszyklus von neuem begann. Insgesamt wurden fünf solcher axialen Zyklen je Probe hintereinander durchgeführt. Die gemessenen Kräfte wurden über einen angeschlossenen Computer kontinuierlich aufgezeichnet. Aus den Messwerten

konnten die Zyklen später grafisch dargestellt werden, weiterhin wurden aus den Werten die biomechanischen Kriterien „Steifigkeit“, „Kraft am Ende der Relaxation“ und „Eindringtiefe bis F_{\max} “ bestimmt.

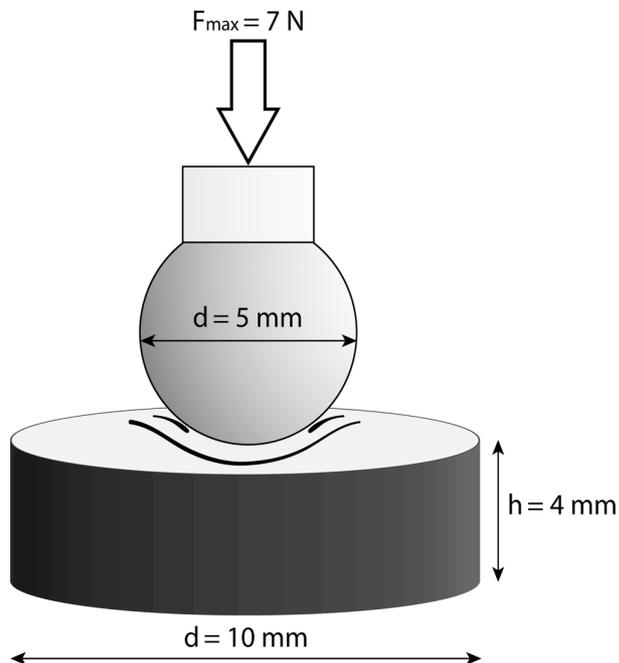


Abb. 15: Schematische Darstellung der biomechanischen Testung. Die getesteten Proben hatten jeweils einen Durchmesser (d) von 10 mm und eine Höhe (h) von 4 mm. Die Kugel am Ende des Stempels besaß einen Durchmesser von 5 mm. Es wurden fünf axiale Belastungszyklen mit einer Maximalkraft (F_{\max}) von 7 N hintereinander durchgeführt.

2.10.4 Auswertung der biomechanischen Testung der Knorpelproben

In der Abbildung 16 ist ein Versuchszyklus grafisch dargestellt. Während der Stempel die definierte Maximalkraft von 7 N aufbaute, wurde das Steifigkeitsmodul (N/m) berechnet. Die Berechnung erfolgte in dem Bereich zwischen 3 und 6 N. Der während der darauffolgenden Relaxation zu verzeichnende Kraftabfall wurde gemessen und die Kraft am Ende der Relaxation (N) bestimmt. Ebenfalls wurde die Eindringtiefe (mm) bestimmt, die benötigt wurde, um die Maximalkraft (F_{\max}) aufzubauen. In der Auswertung, die mit Hilfe der Software MatLab (Version 6.5, Mathworks, USA) erfolgte, interessierte insbesondere der Vergleich zwischen unbehandelten und hochdruckbehandelten Proben.

Medialer und lateraler Kondylus, sowie medialer und lateraler Meniskus wurden getrennt ausgewertet. Für jeden der fünf Zyklen wurden die Mittelwerte der 10 Probenserien von Steifigkeit, Relaxation und Eindringtiefe bis F_{\max} berechnet. Als Fehler wurde die

Standardabweichung angegeben. Für die Signifikanz-Testung wurde der Students-t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p=0,05$ gesetzt.

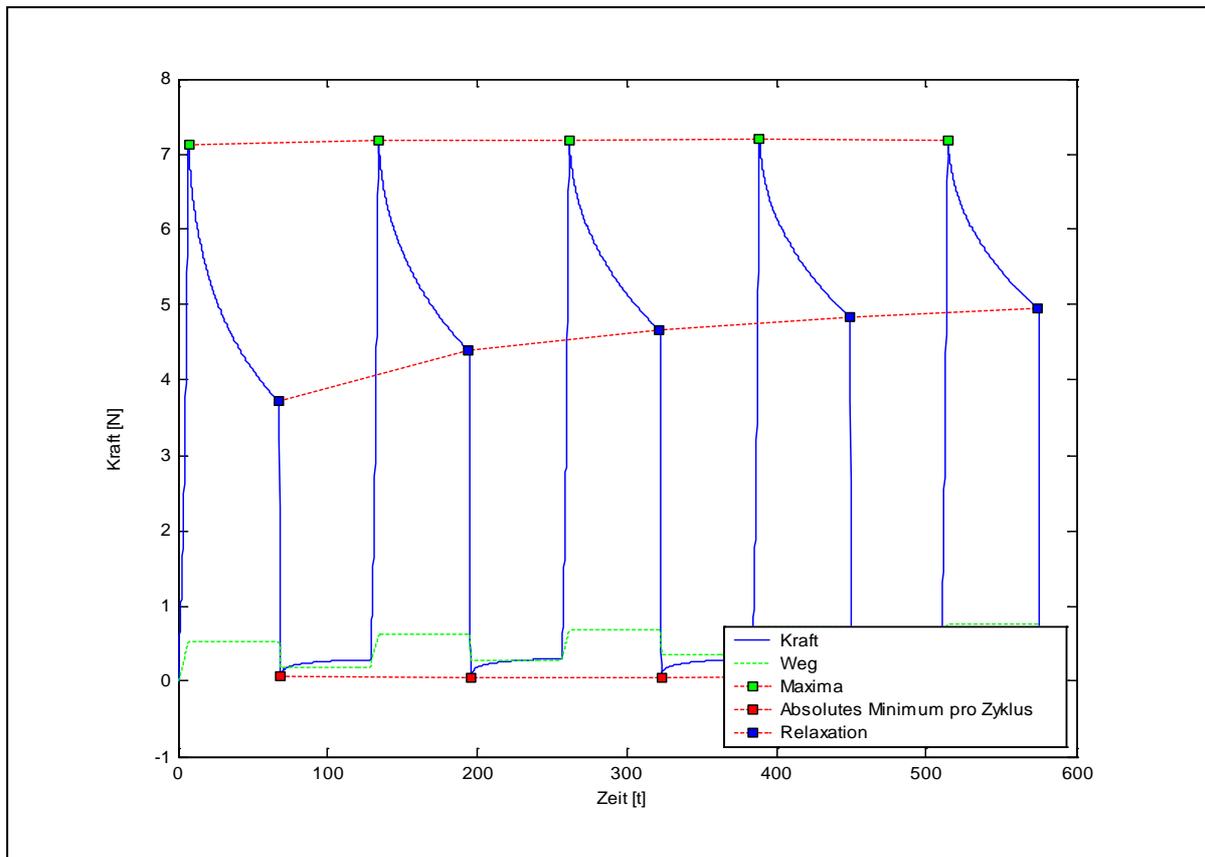


Abb. 16: Grafische Darstellung eines Versuchszyklus einer unbehandelten Probe aus dem Femurkondylus. Die Steifigkeit der Probe wurde beim Aufbau der Maximalkraft (7 N) zwischen 3 und 6 N ermittelt. Dabei wurde die Eindringtiefe des Stempels ermittelt, die benötigt wurde, um die definierte Maximalkraft zu erreichen. Die Kraft am Ende der Relaxation wurde nach der Haltezeit von 60 s ermittelt.

2.10.5 Immunhistochemische Untersuchungen der Knorpelproben

Für die immunhistochemischen Untersuchungen des Knorpels wurden Proben aus den medialen Kondylen und medialen Menisken von vier verschiedenen Individuen untersucht. Aus jedem Meniskus und Kondylus wurden jeweils zwei Proben entnommen, wobei eine Probe bei 600 MPa hochdruckbehandelt wurde, wie unter 2.9.2 beschrieben, und die zweite als Kontrollprobe diente (unbehandelt). Direkt im Anschluss an die Hochdruckinkubation wurden die Proben in 100 %iges Methanol überführt und für 7 Tage (Meniskus) bzw. für 10 Tage (Kondylus) bei 4 °C fixiert. Die Kondylen-Proben wurden nach der Fixierung vier Wochen lang unter Schütteln bei Raumtemperatur (Schüttel-Misch-Tisch, „Titramax/

Inkubator“, Heidolph Instruments, Schwabach, D) in 5 %iger EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich) entkalkt. Die EDTA-Lösung wurde alle zwei Tage erneuert.

2.10.5.1 Anfertigen von Gefrierschnitten der Knorpelproben

Die Gefrierschnitte wurden an dem Kryomikrotom HM 500 OMV (Microm, Walldorf, D) angefertigt (Abb. 17). Nach der Fixierung bzw. Entkalkung wurden die Proben in 5 %ige Sucrose-Lösung (D(+)-Sucrose, Fluka, Buchs, D) überführt und für 24 h bei 4 °C gelagert. Zum Anfertigen der Schnitte wurden die einzelnen Proben aus der Sucrose-Lösung entfernt, hochkant auf ein Objektischchen aufgebracht und mit Hilfe eines Einbettmediums (Tissue freezing medium, Jung, Nussloch, D) auf der Schnellgefrierplatte des Gerätes aufgefroren. Der Objekthalter mit der aufgefrorenen Probe wurde dann in eine auf –20 °C gekühlte Haltevorrichtung eingebracht. Die Probe wurde zunächst im „Trimmschnitt“ mit einer Schnittstärke von 50 µm bearbeitet, bis das Präparat eine gleichmäßige glatte Schnittfläche aufwies. Von jeder Probe wurden dann 24 Kryo-Schnitte mit einer Schnittstärke von 12 µm angefertigt, wobei je zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Die Objektträger mit den Schnitten wurden bis zur immunhistochemischen Färbung bei –20 °C gelagert.



Abb. 17: Ansicht des Kryotoms mit Blick in die Schneidekammer. Links im Bild befindet sich die Schnellgefrierplatte. Im Zentrum die Objekthalterung, davor die Schneidevorrichtung.

2.10.5.2 Immunhistochemische Anfärbung der Gefrierschnitte

Um einen präzisen Vergleich zwischen unbehandelten und hochdruckbehandelten Proben zu erreichen, war bei der immunhistochemischen Färbung die Einhaltung der exakt gleichen Antikörper-Inkubationsvolumina und Inkubationszeiten notwendig. Um dies zu gewährleisten wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe des Leica-Immunostainers 5050 (Leica, Heidelberg) angefärbt. Schnitte der Meniskus-Proben (Faserknorpel) und der osteochondralen Kondylen-

Proben (Gelenkknorpel) wurden auf die Kollagene Typ I, II und III, sowie auf die Proteoglykane Versican, Aggrecan und Link-Protein angefärbt (Tab. 2).



Abb. 18: Mit Objektträgern bestückte Färbekammer des Leica Immunostainers. Die für die Färbung benötigten Enzyme und Antikörper wurden in die Fächer in der Mitte eingebracht.

Mit einem Dako-Pen (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde zunächst eine dünne Linie um die Präparate auf den Objektträgern gezogen, um ein zu rasches Ablaufen der Inkubationslösungen von den Schnitten zu verhindern. Anschließend wurden die Objektträger auf die entsprechenden Halterungen der Färbekammer gebracht (Abb. 18). Vor der Enzymbehandlung zur Freilegung der entsprechenden Epitope erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte mit PBS+Tween für 5 min und anschließend eine Refixierung in Methanol (100 ml + 1 ml 30 % H₂O₂) für 30 min, an die sich drei Waschschrte mit PBS+Tween für je 5 min anschlossen. Die Enzymbehandlung erfolgte für 30 min bei 37 °C. Für die Kollagene I, II und III wurde Hyaluronidase (1,5 U/ml)/ Chondroitinase ABC (0,25 U/ml) eingesetzt, für Versican Chondroitinase ACII, sowie für Aggrecan und Link-Protein Chondroitinase ABC (s. Tab. 2). Nach der Enzymbehandlung erfolgten drei weitere Waschschrte mit PBS+Tween für je 5 min bevor die Schnitte für 60 min mit Pferdeserum inkubiert wurden, um eine unspezifische Proteinbindung zu blockieren. Die anschließende Primärantikörper-Inkubation (s. Tab. 2) erfolgte ebenso wie die nach einem Waschschrte (s. o.) folgende Sekundärantikörper-Inkubation (Vectastain ABC-kit *Elite*) für 30 min bei Raumtemperatur. Kontrollproben wurden mit PBS an Stelle des Primärantikörpers inkubiert, so dass später die spezifische Anfärbung bewiesen werden konnte. Vor und nach der Applikation des ABC-Komplexes aus dem Vectastain ABC-kit erfolgten jeweils erneute Waschschrte (s. o.). Schließlich wurden die Schnitte für 4 min mit DAB (Diaminobenzidin) gefärbt.

Vor der Anfärbung von Aggrecan und Link-Protein war eine Vorbehandlung der Schnitte in Form einer Reduktion und Alkylierung notwendig. Die Reduktion, die der Freilegung der

Epitope dient, erfolgte mittels 10 mM DTT (1,4-Dithiothreitol, Boehringer, Mannheim) für 2 h bei 37 °C. Die Alkylierung, die zur Stabilisierung gebrochener Disulfid-Bindungen führt, erfolgte im Anschluss mittels 40 mM Iodacetamid (Sigma) für 1 h bei ebenfalls 37 °C.

Nach der Färbung mit DAB erfolgte die Gegenfärbung für 20 s mit Meyers Haematoxylin. Hiernach wurden die Objektträger mit den gefärbten Schnitten für je 5 min in zwei Wasserbäder hintereinander gebracht, um überschüssiges Haematoxylin zu entfernen. Es erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 % - 80 % - 90 % - 100 % - 100 %) und schließlich in Xylol (100 % - 100 %). Die Inkubation erfolgte für jeweils 5 min. Abschließend wurden die Proben auf den Objektträgern mit Hilfe eines Kunstharzes (DPX Mountant for histology, Fluka, Buchs) und Deckgläschen „eingedeckelt“. Die Objektträger wurden für 7 Tage flach gelagert, in denen das Harz an Festigkeit gewann und seine beste optische Klarheit erreichte, bevor die Histologien fotografiert werden konnten.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Eingesetzte Enzyme	Bezugsquelle
Kollagen I	Col 1	1:2000	Hyal (1,5 IU/ml) & ChABC (0,25 IU/ml)	Sigma
Kollagen II	CIICI	1:5	Hyal (1,5 IU/ml) & ChABC (0,25 IU/ml)	DSHB
Kollagen III	FH7A	1:500	Hyal (1,5 IU/ml) & ChABC (0,25 IU/ml)	PD Dr. med. Stefan Milz, Davos, Schweiz
Versican	12C5	1:10	ChACII (0,25 IU/ml)	PD Dr. med. Stefan Milz, Davos, Schweiz
Aggrecan	1C6	1:5	ChABC (0,25 IU/ml)	PD Dr. med. Stefan Milz, Davos, Schweiz
Link-Protein	8A4	1:5	ChABC (0,25 IU/ml)	PD Dr. med. Stefan Milz, Davos, Schweiz

Tab. 2: Primäre Antikörper und Enzym-Vorbehandlung für die immunhistochemische Untersuchung von Meniskus- und Gelenkknorpel. Alle Antikörper sind monoklonale Maus-Antikörper. Die Enzym-Vorbehandlungen wurden in allen Versuchen bei 37 °C in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) für 30 min durchgeführt. Ch=Chondroitinase, Hyal=Hyalonidase, DSHB=Developmental Studies Hybridoma Bank, Universität Iowa (USA).

3. Ergebnisse

3.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung sowohl der humanen Chondrozyten als auch der humanen Chondrosarkomzellen gestaltete sich unproblematisch. Es trat keine Kontaminierung mit Bakterien oder Pilzen auf. Die Chondrozytenkulturen wurden etwa alle 14 Tage gesplittet. Das rasche Wachstum der Chondrosarkomzellen machte ein zweimal wöchentliches Splitting der Kulturen erforderlich. In den folgenden Abbildungen sind kultivierte Chondrozyten und Chondrosarkomzellen dargestellt.

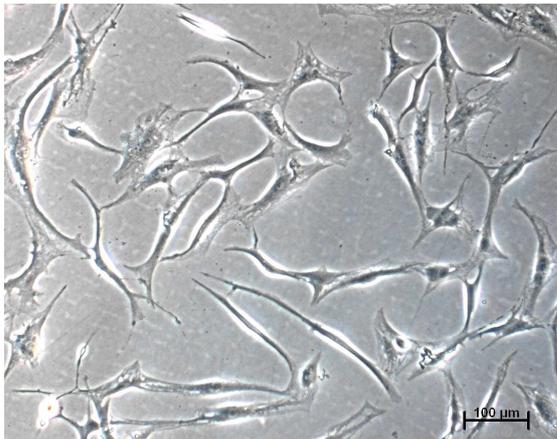


Abb. 19: Chondrozyten in Kultur.

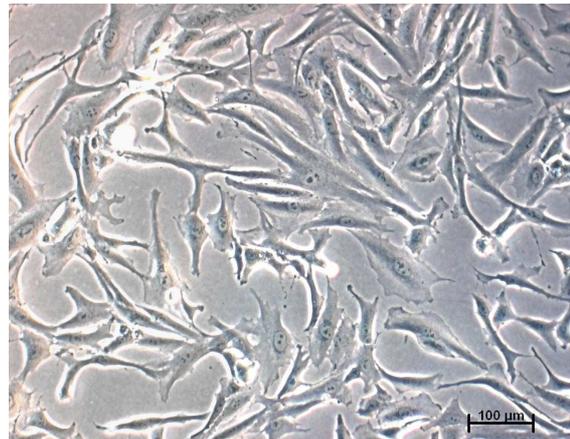


Abb. 20: Chondrosarkomzellen in Kultur.

3.2 Vitalitätstests hochdruckbehandelter Zellen

3.2.1 Hochdruckinkubation von Chondrozyten in Suspension

Bis zu der Druckstufe von 100 MPa zeigte sich kaum eine Änderung in der Überlebensrate der Zellen. Erst ab 125 MPa begann ein Abfall lebender Zellen, der sich zwischen 150 MPa und 175 MPa beschleunigte. Bei der Druckstufe von 175 MPa waren bereits etwa 85 % der Zellen tot. Bei Drücken von 225 MPa und höher konnten wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden (Tabelle 3, Grafiken 1 und 3). Die 50 %-Überlebensrate der Zellen lag bei 154,75 MPa \pm 4,5 MPa (s. Tab. 7).

In Abb. 21 sind lichtmikroskopisch im Phasenkontrast intakte Chondrozyten aus der Nullprobe gezeigt, die bei Raumdruck belassen wurden. Mit steigenden Druckstufen wurden die Zellen inhomogener und der Anteil zerstörter Zellen stieg. Ab einem Druck von 150 MPa waren zerstörte Zellmembranen zu erkennen, ebenso waren mit steigenden Drücken verstärkt Zelltrümmer sichtbar. Ab einem Druck von 250 MPa waren nur noch zerstörte Zellen zu erkennen, die von reichlich Zelltrümmern umgeben waren (Abb. 22). Die Abbildungen der Zwischendruckstufen (50-200 MPa) sind dem Anhang zu entnehmen.

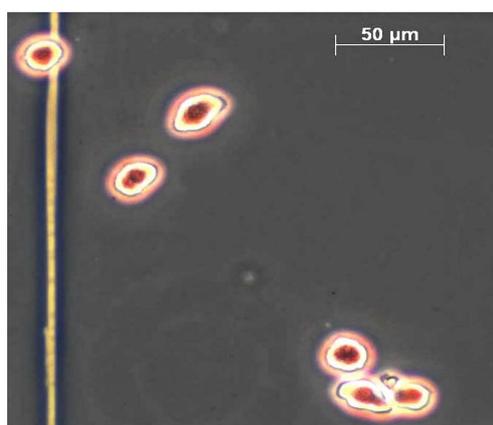


Abb. 21: Chondrozyten in Suspension. Nullkontrolle.

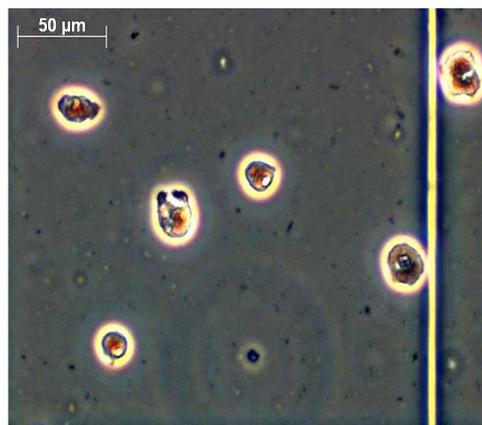


Abb. 22: Chondrozyten in Suspension nach 250 MPa.

Druckstufe in MPa	Lebende Zellen in Mio/ml	In Prozent von der 0-Probe	Fehler in Prozent
0-Probe	0,506	100,0	+/- 6,1
50	0,506	100,0	+/- 1,9
100	0,500	98,8	+/- 1,7
125	0,450	88,9	+/- 9,2
150	0,311	61,5	+/- 7,6
175	0,078	15,4	+/- 7,4
200	0,017	3,4	+/- 0,9
225	0,000	0,0	+/- 0,0
250	0,000	0,0	+/- 0,0

Tabelle 3: Chondrozyten in Suspension nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte der Versuche 1-4 und prozentuale Fehler (95 %-Konfidenzintervall).

3.2.2 Hochdruckinkubation von Chondrosarkomzellen in Suspension

Bis zu der Druckstufe von 125 MPa zeigten die Zellen einen leichten linearen Abfall in ihrer Überlebensrate. Der Abfall beschleunigte sich ab 125 MPa. Bei der Druckstufe von 165 MPa waren bereits mehr Zellen tot als lebend. Bis zu Drücken von 300 MPa zeigten sich immer einzelne lebende Zellen. Erst ab 350 MPa konnten wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden (Tabelle 5, Grafiken 2 und 3). Die 50 %-Überlebensrate der Zellen lag bei 159 MPa \pm 3,84 MPa (s. Tab. 7).

In Abb. 23 sind lichtmikroskopisch im Phasenkontrast intakte Chondrosarkomzellen aus der Nullprobe gezeigt. Mit steigenden Druckstufen wurden die Zellen inhomogener und der Anteil zerstörter Zellen stieg. Ab einem Druck von 150 MPa, waren zerstörte Zellmembranen zu erkennen, ebenso waren mit zunehmenden Drücken vermehrt Zelltrümmer zu sehen. In Abb. 24 sind Zellen mit zerstörter Membran nach einer Druckbehandlung 350 MPa gezeigt. Die Abbildungen der Zwischendruckstufen (50-300 MPa) sind dem Anhang zu entnehmen.

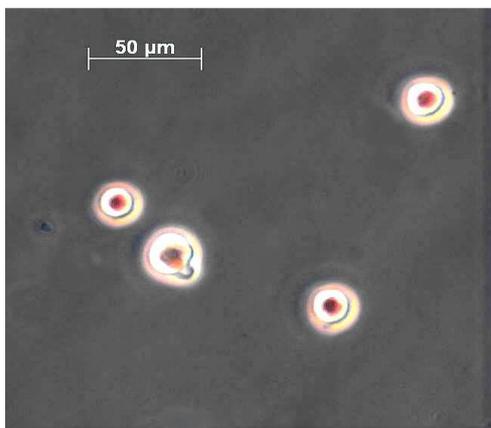


Abb. 23: Chondrosarkomzellen in Suspension. Nullkontrolle.

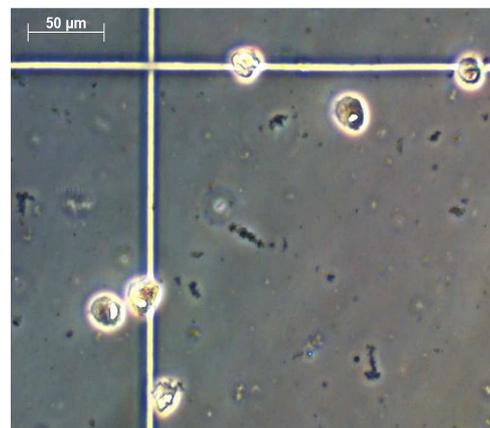


Abb. 24: Chondrosarkomzellen in Suspension nach 350 MPa.

Druckstufe in MPa	Lebende Zellen in Mio/ml	In Prozent von der 0-Probe	Fehler in Prozent
0-Probe	0,521	100,0	+/- 4,5
50	0,493	94,6	+/- 4,1
100	0,466	89,4	+/- 4,0
125	0,435	83,5	+/- 1,9
150	0,340	65,3	+/- 5,6
165	0,232	44,5	+/- 2,8
175	0,086	16,5	+/- 2,4
200	0,052	10,0	+/- 1,7
250	0,019	3,6	+/- 0,7
300	0,007	1,3	+/- 0,5
350	0,000	0	+/- 0,0

Tabelle 4: Chondrosarkomzellen in Suspension nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte der Versuche 5-8 und prozentuale Fehler (95 %-Konfidenzintervall).

3.2.3 Hochdruckinkubation von adhärennten Chondrozyten

Bis zu der Druckstufe von 100 MPa zeigten die Zellen einen in etwa linearen leichten Abfall in ihrer Überlebensrate. Der Abfall beschleunigte sich zwischen 100 MPa und 125 MPa. Bei der Druckstufe von 125 MPa waren bereits etwa 60 % der Zellen tot. Ab 200 MPa konnten wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden (Tabelle 5, Grafiken 2 und 4). Die 50 %-Überlebensrate der Zellen lag bei 121,25 MPa +/- 7,7 MPa (s. Tab. 7).

Die Abbildungen 25-29 zeigen die Zellen lichtmikroskopisch im Phasenkontrast nach der Hochdruckbehandlung. Die Zellen der Nullprobe waren alle adhärennt mit ausgebildeten Zellausläufern (Abb. 25). Bereits ab 50 MPa begann bei einzelnen Zellen ein Abrunden, verbunden mit einer Retraktion der Zellausläufer (Abb. 26). Dieser Prozess verstärkte sich mit steigenden Druckstufen, bei 150 MPa waren beinahe alle Zellen abgerundet (Abb. 28). Nach 200 MPa zeigten sich nur noch einzelne adhärennte Zellen (Abb. 29).

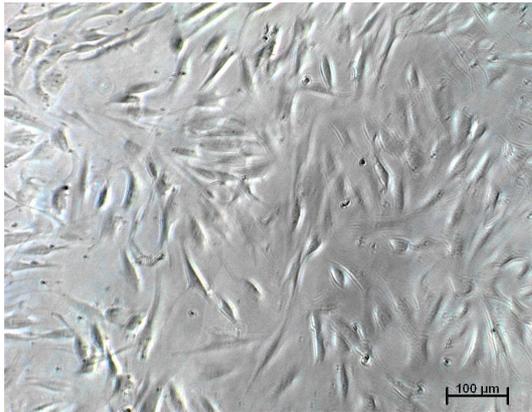


Abb. 25: Adhärente Chondrozyten. Nullkontrolle.

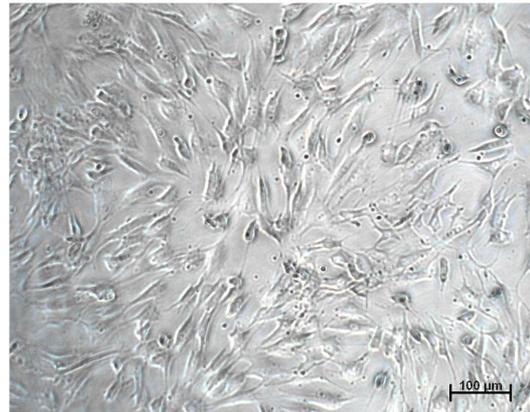


Abb. 26: Adhärente Chondrozyten nach 50 MPa.

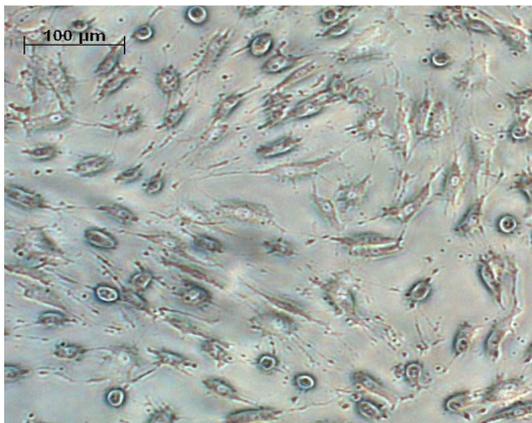


Abb. 27: Adhärente Chondrozyten nach 100 MPa.

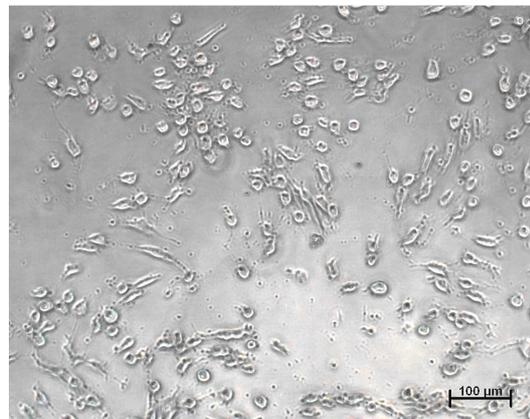


Abb. 28: Adhärente Chondrozyten nach 150 MPa.

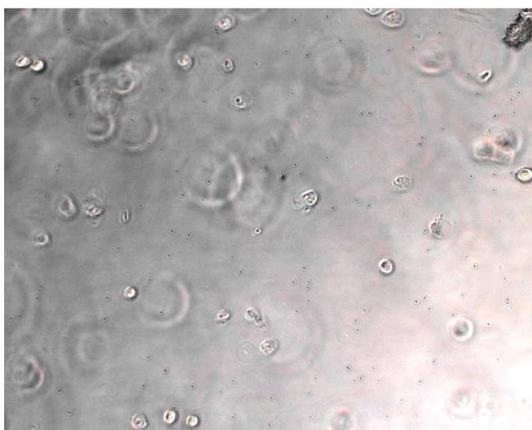


Abb. 29: Adhärente Chondrozyten nach 200 MPa.

Druckstufe in MPa	Lebende Zellen in Mio/ml	In Prozent von der 0-Probe	Fehler in Prozent
0-Probe	0,093	100,0	+/- 6,5
50	0,088	94,6	+/- 7,4
100	0,077	82,8	+/- 11,7
125	0,037	39,8	+/- 8,1
150	0,008	8,6	+/- 3,6
200	0,000	0,0	+/- 0,0

Tabelle 5: Chondrozyten adhären nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte der Versuche 9-12 und prozentuale Fehler(95 %-Konfidenzintervall).

3.2.4 Hochdruckinkubation von adhären Chondrosarkomzellen

Bis zu der Druckstufe von 100 MPa zeigten die Zellen einen leichten linearen Abfall in ihrer Überlebensrate. Der Abfall beschleunigte sich zwischen 100 MPa und 125 MPa. Bei der Druckstufe von 125 MPa waren bereits mehr Zellen tot als lebend. Ab 200 MPa konnten wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden (Tabelle 6, Grafiken 3 und 4). Die 50 %-Überlebensrate der Zellen lag bei 122,5 MPa +/- 5,2MPa (s. Tab. 7).

Die Abbildungen 30-33 zeigen die Zellen lichtmikroskopisch im Phasenkontrast nach der Hochdruckbehandlung. Die Zellen der Nullprobe zeigten sich adhären und mit ausgebildeten Zellausläufern (Abb. 30). Ab 100 MPa begannen sich die Zellen abzurunden (Abb. 31). Dieser Prozess verstärkte sich mit steigenden Druckstufen, bis sich die Zellen bei 200 MPa alle abgerundet darstellten. Ein Teil der Zellen hatte sich abgelöst (Abb. 33). Mit zunehmendem Druck war eine Retraktion der Zellausläufer zu beobachten.

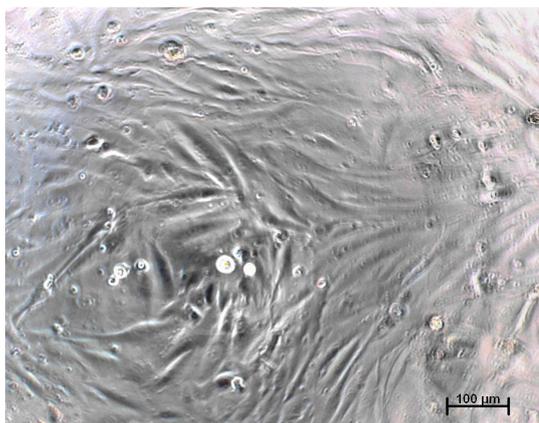


Abb. 30: Adhärenente Chondrosarkomzellen. Nullkontrolle.

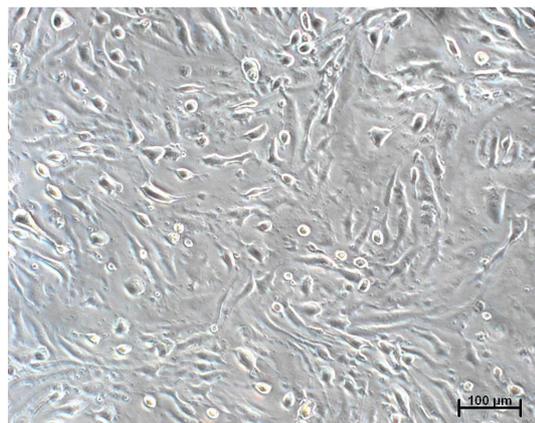


Abb. 31: Adhärenente Chondrosarkomzellen nach 100 MPa.



Abb. 32: Adhärenente Chondrosarkomzellen nach 150 MPa.

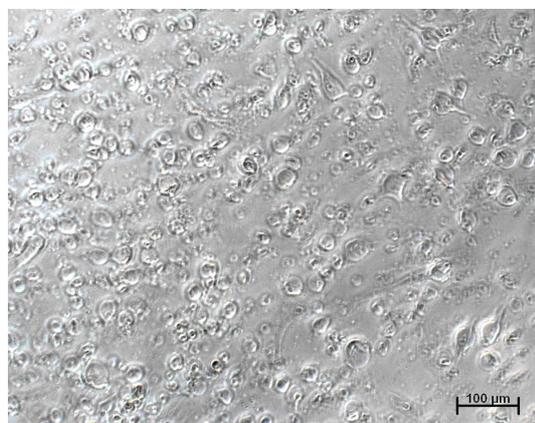
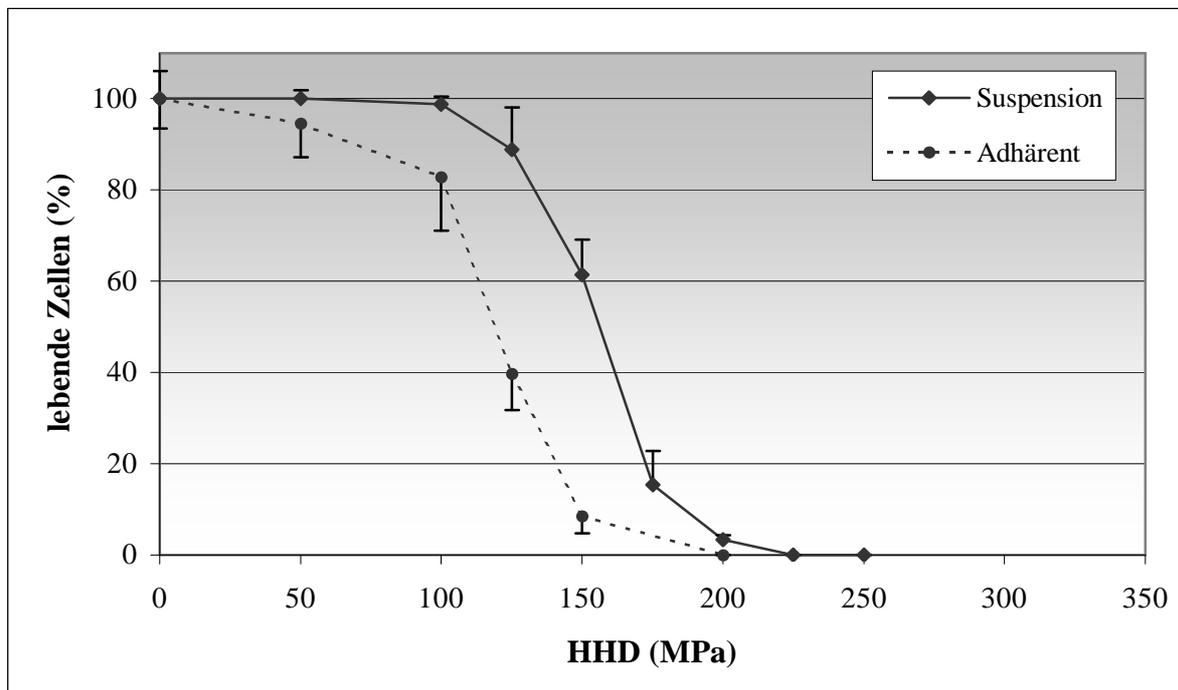


Abb. 33: Adhärenente Chondrosarkomzellen nach 200 MPa.

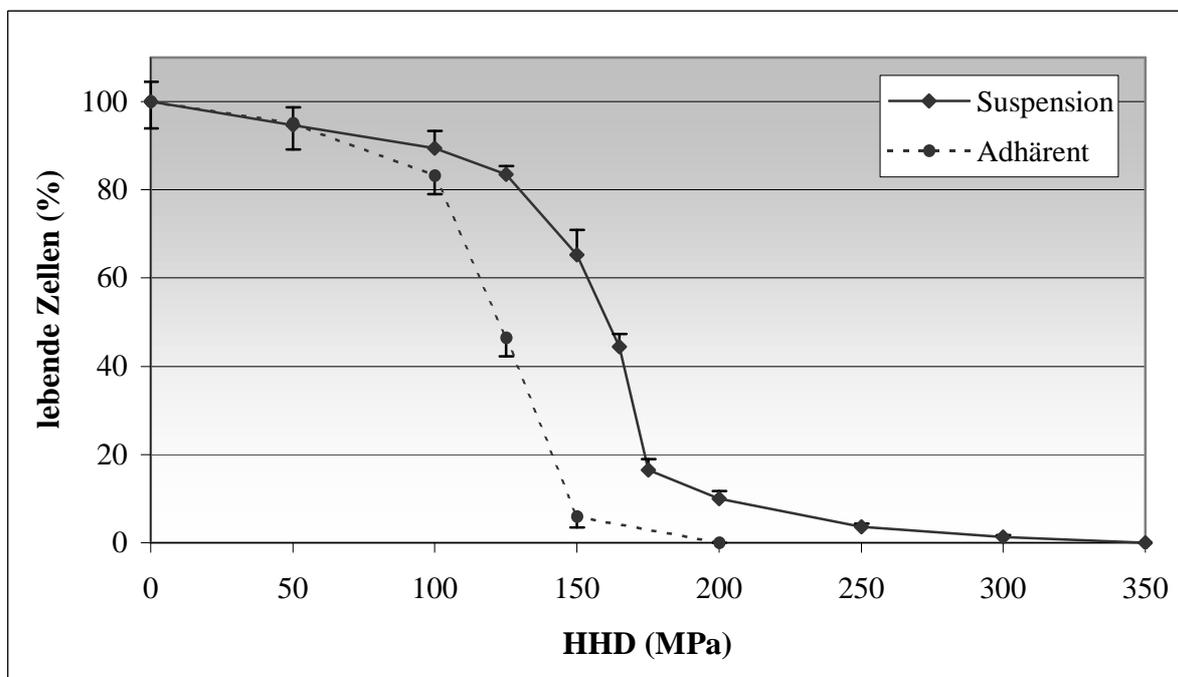
Druckstufe in MPa	Lebende Zellen in Mio/ml	In Prozent von der 0-Probe	Fehler in Prozent
0-Probe	0,101	100,0	+/- 5,3
50	0,096	95,1	+/- 6,1
100	0,084	83,2	+/- 8,5
125	0,047	46,5	+/- 4,8
150	0,006	5,9	+/- 2,7
200	0,000	0,0	+/- 0,0

Tabelle 6: Chondrosarkomzellen adhärenent nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte der Versuche 13-16 und prozentuale Fehler(95 %-Konfidenzintervall).

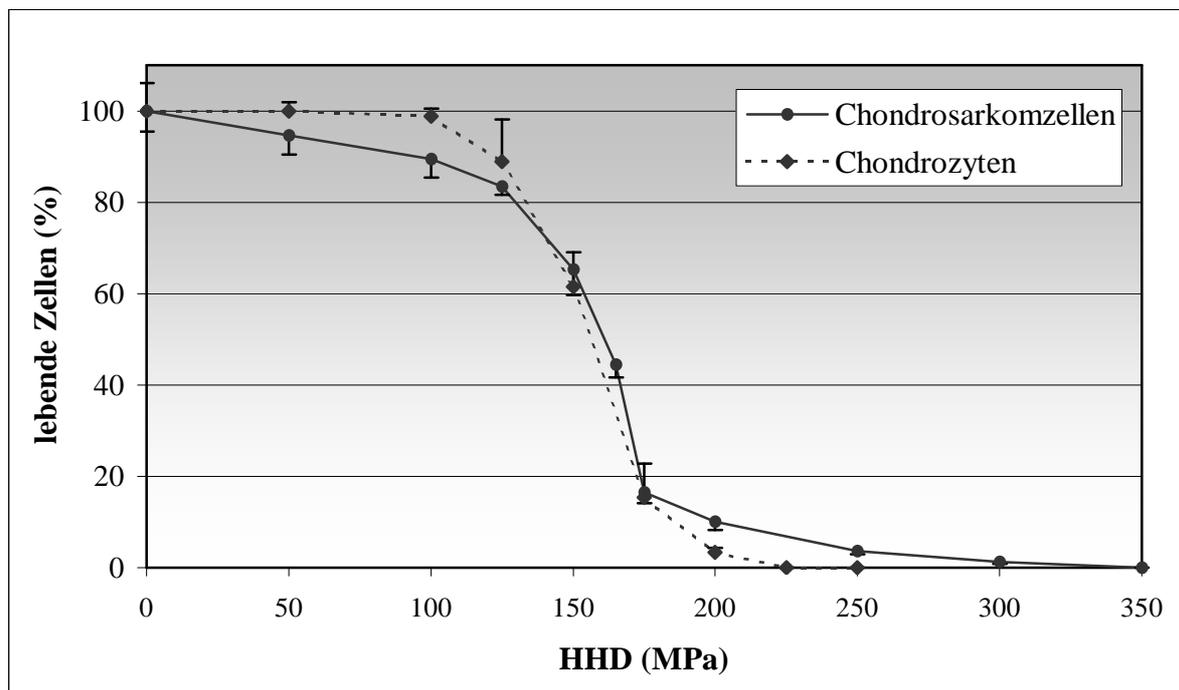
3.2.5 Grafische Darstellung der Ergebnisse des Trypanblau-Vitalitätstests hochdruckbehandelter Zellen



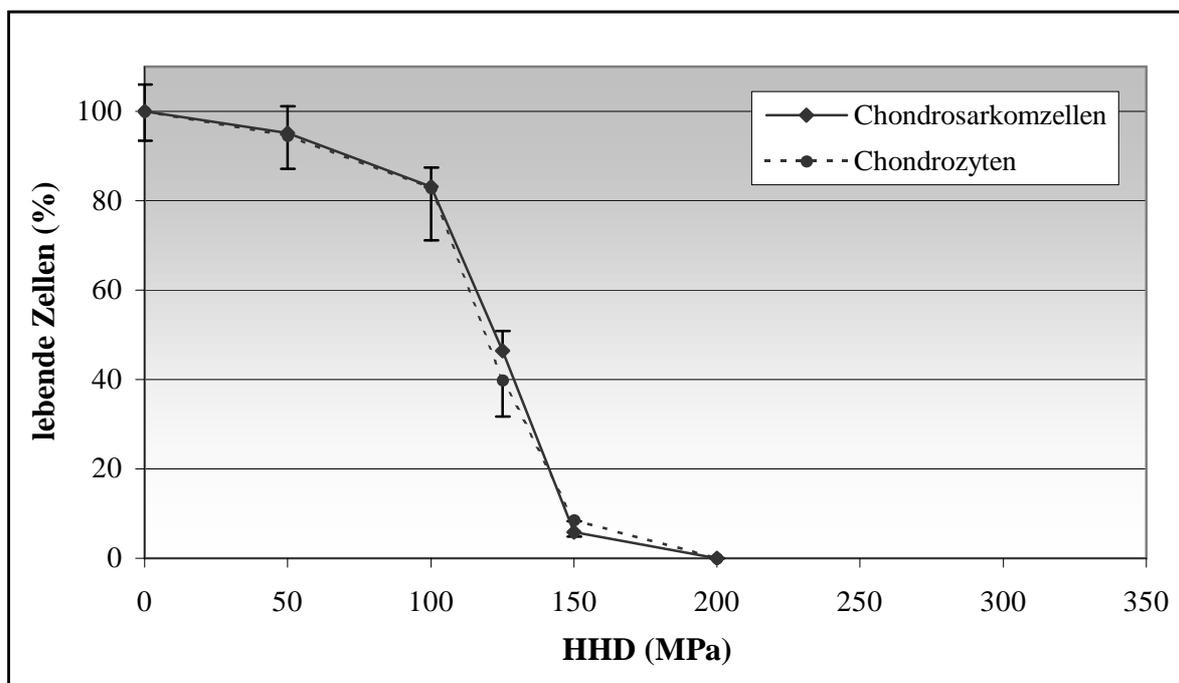
Grafik 1: Chondrozyten nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Überprüfung der Vitalität im Trypanblau-Test. Adhärenz Chondrozyten zeigten sich empfindlicher gegenüber HHD als die Zellen in Suspension.



Grafik 2: Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Überprüfung der Vitalität im Trypanblau-Test. Adhärenz Chondrosarkomzellen zeigten sich empfindlicher gegenüber HHD als die Zellen in Suspension.



Grafik 3: Chondrozyten und Chondrosarkomzellen in Suspension nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Überprüfung der Vitalität im Trypanblau-Test. Chondrosarkomzellen zeigten sich bei hohen Druckstufen etwas resistenter, Chondrozyten waren bis 125 MPa etwas unempfindlicher.



Grafik 4: Adhärenente Chondrozyten und Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Überprüfung der Vitalität im Trypanblau-Test. Chondrosarkomzellen und Chondrozyten wurden bei 200 MPa inaktiviert. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Druckresistenz.

	SW1353 Chondrosarkomzellen	Chondrozyten
Suspension	159 +/- 3,84 MPa	154,75 +/- 4,5 MPa
Adhärenz	122,5 +/- 5,2 MPa	121,25 +/- 7,7 MPa
p-Wert	0,05	0,05

Tabelle 7: 50%-Überlebensraten von SW1353 Chondrosarkomzellen und Chondrozyten nach HHD-Inkubation (10 min, 37 °C). Es zeigten sich sehr nah beieinanderliegende Werte für Chondrozyten und Chondrosarkomzellen.

3.3 FACS-Messungen hochdruckbehandelter Zellen

3.3.1 Lichtmikroskopie hochdruckbehandelter Zellen nach anschließender Reaktivierung für 24 Stunden

24 h nach der Hochdruckbehandlung zeigten sowohl Chondrozyten wie auch Chondrosarkomzellen lichtmikroskopisch ein mit steigenden Drücken zunehmendes „rounding“ und einen Verlust von Zellausläufern und Adhärenz. In beiden Zellreihen bildeten die Zellen der Nullkontrolle deutliche Zellausläufer aus und waren adhärenz an den Boden der Kulturflaschen angewachsen (Abb. 34 und 37). Auch die Zellen nach einer Behandlung bei 50 MPa zeigten regelrecht ausgebildete Zellausläufer und normale Adhärenz. Ab 100 MPa zeigten sich die Zellen teilweise abgerundet, die Zellausläufer waren spärlicher ausgebildet, es zeigten sich vermehrt abgelöste bzw. nicht adhärenz Zellen (Abb. 35 und 38). 24 h nach Inkubation bei 150 MPa waren sowohl die meisten Chondrozyten als auch Chondrosarkomzellen abgerundet und nicht adhärenz. Es hatten sich keine Zellausläufer ausgebildet. Nach 200 MPa waren in beiden Zellreihen nur noch nicht adhärenz, runde Zellen zu erkennen, auch zeigten sich Zelltrümmer (Abb. 36 und 39). Die Abbildungen der Zwischendruckstufen (50 und 150 MPa) sind dem Anhang zu entnehmen.

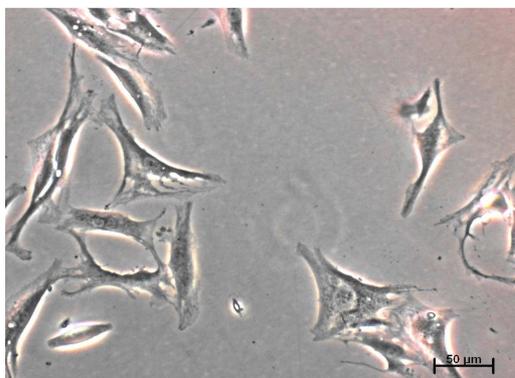


Abb. 34: Rekultivierte Chondrozyten. Nullkontrolle.

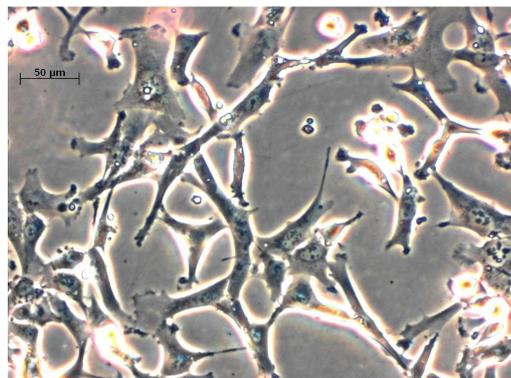


Abb. 37: Rekultivierte Chondrosarkomzellen. Nullkontrolle.

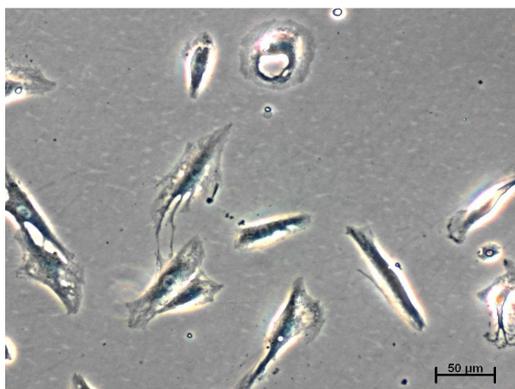


Abb. 35: Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 100 MPa.



Abb. 38: Rekultivierte Chondrosarkomzellen 24 h nach Inkubation bei 100 MPa.

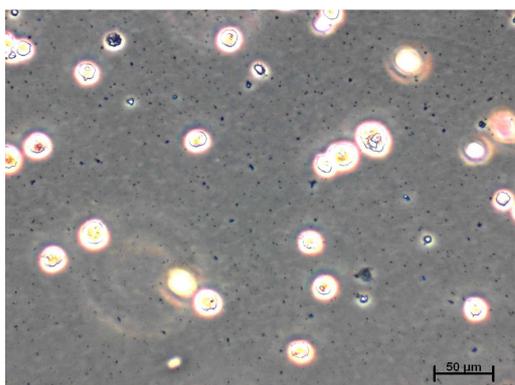


Abb. 36: Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 200 MPa.

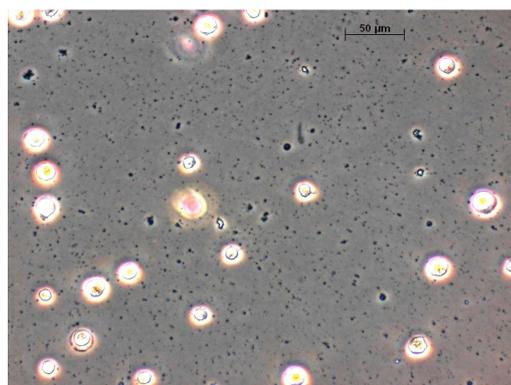


Abb. 39: Rekultivierte Chondrosarkomzellen 24 h nach Inkubation bei 200 MPa.

3.3.2 Auswertung der FACS-Messungen

In den Abbildungen 40-55 ist exemplarisch eine repräsentative der vier Versuchreihen der Chondrozyten, sowie der Chondrosarkomzellen gezeigt. Die einzelnen Abbildungen der FACS-Messung werden dabei wie folgt ausgewertet: Die Morphologie der Zellen ist anhand der durchflusszytometrischen Messungen ohne Fluoreszenzmarker-Zusatz zu erkennen. Die Zellen werden dabei nach Größe (X-Achse, FSC-Height) und Oberflächenbeschaffenheit bzw. Rauhgigkeit (Y-Achse, SSC-Height) dargestellt (Abb. 40,41,48,49). Bei Messungen der alleinigen Annexin V (AN)-Bindung ist die Zellgröße (X-Achse) zur Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen (Abb. 42,43,50,51). Die Unterteilung trennt unmarkierte Zellen (unten) von AN-positiven Zellen (oben). Die alleinige Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenz ist ebenfalls auf der Y-Achse (FL3-Height) gegen die Größe auf der X-Achse aufgetragen (Abb. 44,45,52,53). Die Unterteilung trennt unmarkierte Zellen (unten) von PI-positiven Zellen (oben). Bei der gleichzeitigen Doppelmessung von AN und PI ist AN (X-Achse, FL1-Height) gegen PI (Y-Achse, FL3-Height) aufgetragen. Daraus entsteht hierbei eine Quadrantenunterteilung, links unten zeigen sich vitale Zellen, ohne Fluoreszenz, links oben nur PI-positive, rechts unten nur AN-positive und oben rechts PI- und AN-positive Zellen (Abb. 46,47,54,55).

3.3.3 FACS-Messungen hochdruckinbubierter Chondrozyten in Suspension

Bis 100 MPa zeigte sich die Morphologie der Zellen im Vergleich zur Nullkontrolle nahezu unverändert (Abb. 40 A-C).

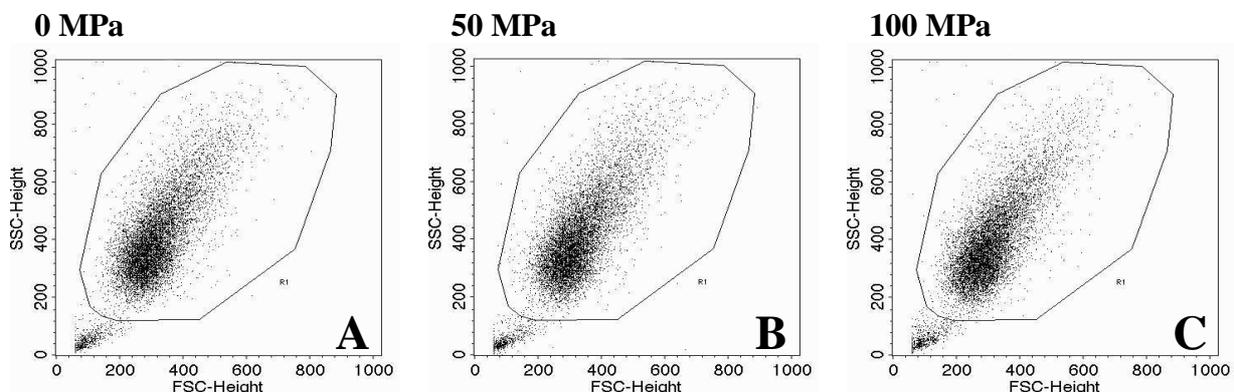


Abb. 40 A-C: Morphologie von Chondrozyten nach HHD-Behandlung (0-100 MPa). Die Größe der Zellen ist auf der X-Achse (FSC-Height), die Oberflächenbeschaffenheit bzw. Rauhgigkeit auf der Y-Achse (SSC-Height) dargestellt. Bis 100 MPa zeigte sich keine wesentliche Änderung der Zellgröße und Oberflächenbeschaffenheit.

Ab 150 MPa kam es zu leichten Änderungen, die Streuung der Zellen bezüglich Größe und Oberflächenbeschaffenheit bzw. Rauigkeit nahm zu (Abb. 41 A). Bei 200 MPa kam es zu deutlichen Änderungen, die Zellen wurden in ihrer Größe insgesamt homogener kleiner, die Rauigkeit nahm zu (Abb. 41 B).

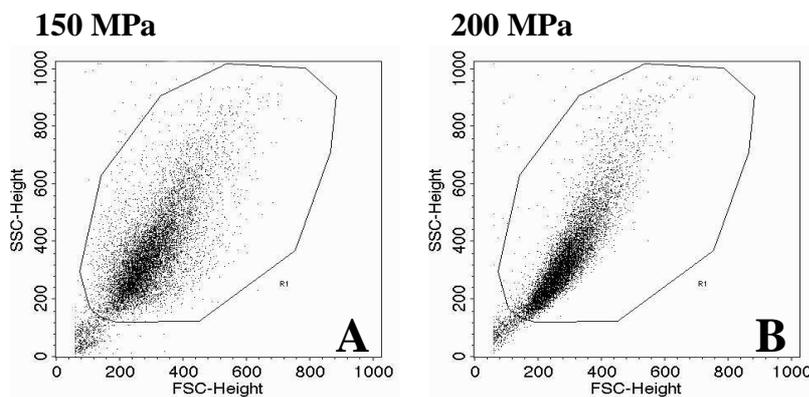


Abb. 41 A,B: Morphologie von Chondrozyten nach HHD-Behandlung (150-200 MPa). Die Größe der Zellen ist auf der X-Achse (FSC-Height), die Oberflächenbeschaffenheit bzw. Rauigkeit auf der Y-Achse (SSC-Height) dargestellt. Nach 150 MPa wurden die Zellen kleiner und die Oberfläche inhomogener, deutlicher ausgeprägt nach 200 MPa.

Bei der alleinigen Messung der AN-Bindung zeigten Chondrozyten bis 100 MPa kein deutlich vermehrtes AN-Signal (Abb. 42 A-C). Bis nach einschliesslich 100 MPa waren unter 5 % der Zellen AN-positiv.

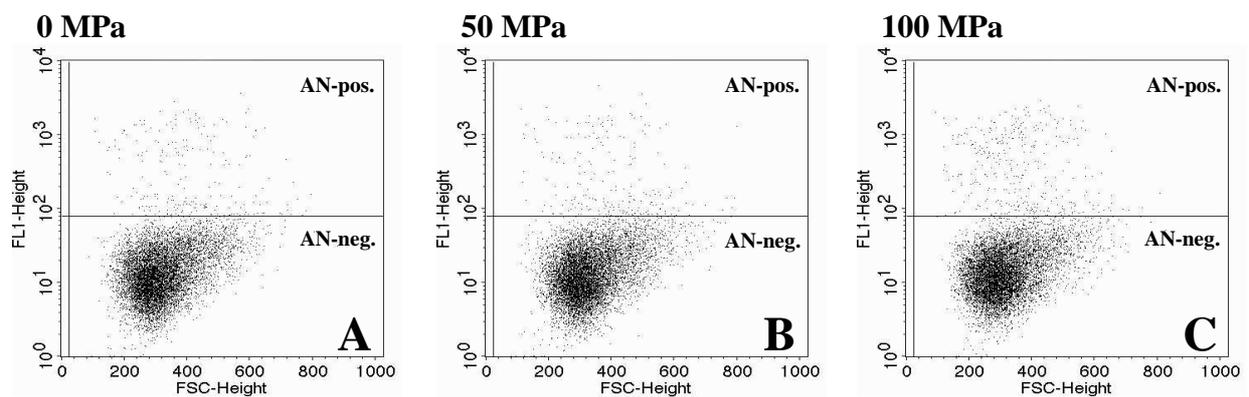


Abb. 42 A-C: Annexin V-Bindung von Chondrozyten. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Signale oberhalb der Trennlinie zeigen AN-positive Zellen an, Signale darunter AN-negative Zellen. Bis einschliesslich 100 MPa zeigt sich keine wesentliche Zunahme AN-positiver Zellen.

Die Rate AN-positiver Zellen stieg ab 150 MPa rapide an, sie lag dort bei 46,0 % (+/- 2,2 %) und erreichte bei 200 MPa 95,2 % (+/- 1,5 %) (Abb. 43 A,B). Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

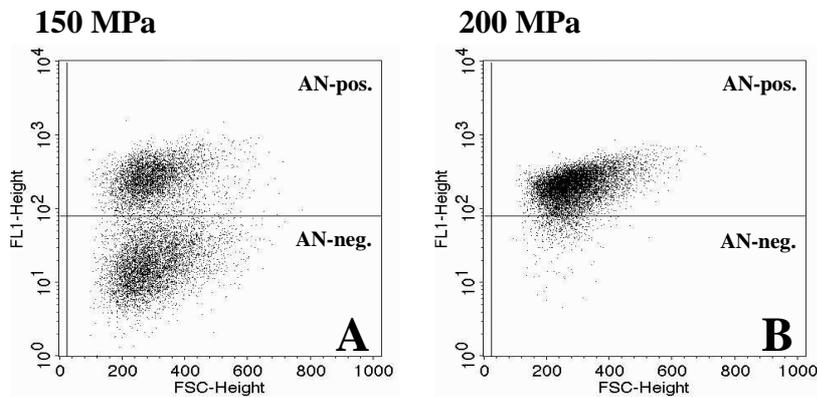


Abb. 43 A,B: Annexin V-Bindung von Chondrozyten. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Ab 150 MPa liess sich gut eine zweite, AN-positive Zellpopulation erkennen (D), die nach 200 MPa die meisten Zellen einnahm (E).

Bei der alleinigen Messung der PI-Bindung zeigten Chondrozyten bis 100 MPa keine deutlich vermehrte PI-Fluoreszenz (Abb. 44 A-C). Bis nach einschliesslich 100 MPa waren unter 5 % der Zellen PI-positiv.

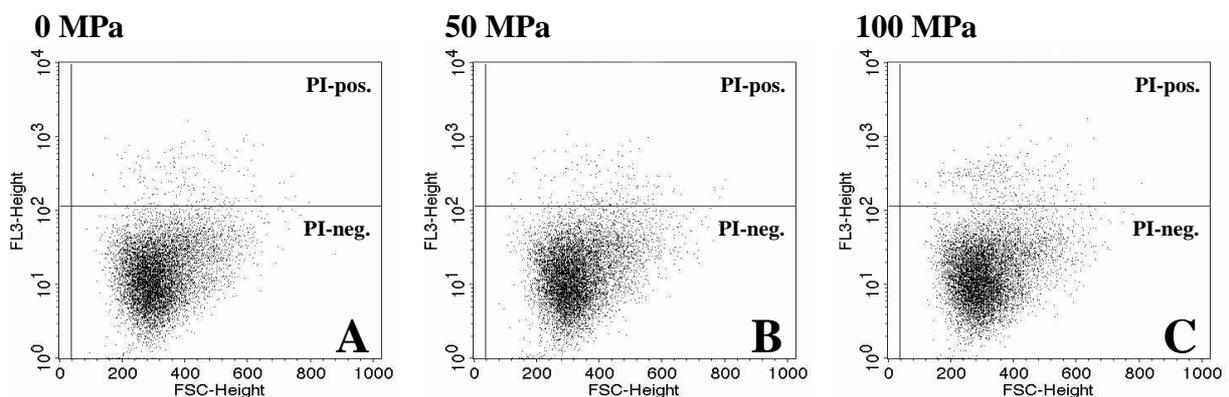


Abb. 44 A-C: Propidiumiodid-Bindung von Chondrozyten. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Signale oberhalb der Trennlinie zeigen PI-positive Zellen an, Signale darunter PI-negative Zellen. Bis einschliesslich 100 MPa zeigt sich keine wesentliche Zunahme PI-positiver Zellen.

Die Rate PI-positiver Zellen stieg ab 150 MPa rapide an und lag dort bei 46,4 % (+/- 3,7 %) (Abb. 45 A). Bei 200 MPa waren 96,1 % (+/- 0,6 %) der Zellen PI-positiv (Abb. 45 B). Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

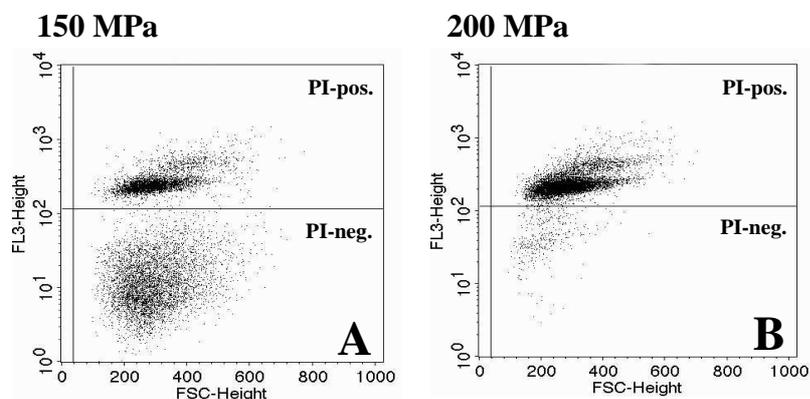


Abb. 45 A,B: Propidiumiodid-Bindung von Chondrozyten. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Ab 150 MPa liess sich deutlich eine zweite, PI-positive Zellpopulation erkennen (D), die nach 200 MPa die meisten Zellen einnahm (E). Die dritte erkennbare Population ist durch einen tetraploiden DNA-Satz während der Zellteilung zu erklären. Das Signal ist durch die Aufnahme von PI während eines Teilungszyklus entstanden.

Bei der Doppelmarkierung der Chondrozyten mit AN und PI zeigten sich bis einschliesslich 100 MPa keine wesentlichen Änderungen der AN- und PI-Fluoreszenz (Abb. 46 A-C).

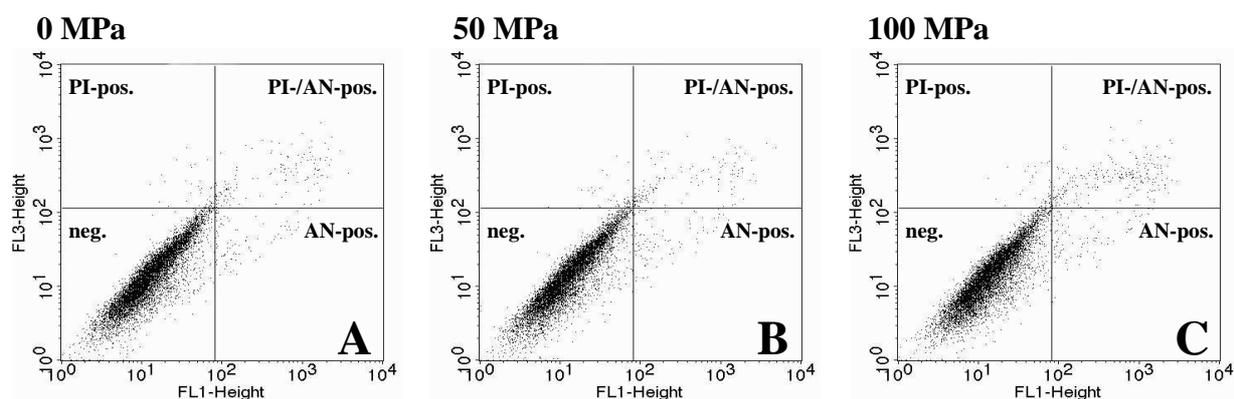


Abb. 46 A-C: Annexin V- und Propidiumiodid-Bindung von Chondrozyten. Die Annexin V-Fluoreszenz ist auf der X-Achse (FL1-Height), die Propidiumiodid-Fluoreszenz auf der Y-Achse (FL3-Height) aufgetragen. Zellen im unteren linken Quadranten weisen keine Fluoreszenz auf. Zellen im unteren rechten Quadranten sind AN-positiv und Zellen im oberen linken Quadranten PI-positiv. Zellen, die sich im oberen rechten Quadranten darstellen sind sowohl AN- als auch PI-positiv.

Erst ab 150 MPa sank die Zahl unmarkierter Zellen deutlich, bis nach 200 MPa nur noch 0,5 % (+/- 0,1 %) der Zellen weder eine PI-, AN-, noch eine Doppelfluoreszenz aufwiesen (Abb. 47 A,B).

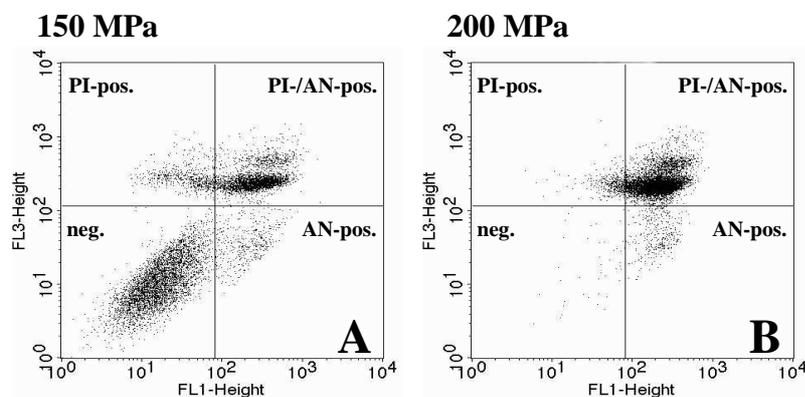


Abb. 47 A,B: Annexin V- und Propidiumiodid-Bindung von Chondrozyten. Die Annexin V-Fluoreszenz ist auf der X-Achse (FL1-Height), die Propidiumiodid-Fluoreszenz auf der Y-Achse (FL3-Height) aufgetragen. Zellen im unteren linken Quadranten weisen keine Fluoreszenz auf. Zellen im unteren rechten Quadranten sind AN- positiv und Zellen im oberen linken Quadranten PI-positiv. Zellen, die sich im oberen rechten Quadranten darstellen sind sowohl AN- als auch PI-positiv. Ab 150 MPa stieg deutlich die Zahl der Zellen mit positivem Signal. Die zwei abgrenzbaren Populationen im oberen rechten Quadranten sind durch einen unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zellen während der Hochdruckbehandlung bedingt. Dies ist auf den normalerweise diploiden Satz in der G0-Phase bzw. auf einen tetraploiden Satz während der Zellteilung zurückzuführen. Die zu vermutende dritte Population mit dem höchsten Signal resultiert aus Zellfragmenten.

Eine Übersicht über die einzelnen Ergebnisse bei der Doppelmessung von Chondrozyten mit AN und PI gibt die folgende Tabelle 8:

Druck in MPa	Vital in %	STA in %	Nur AN-pos. in %	STA in %	Nur PI-pos. in %	STA in %	AN- und PI-pos. in %	STA in %
0	96,24	1,97	1,71	1,83	0,57	0,04	1,48	0,15
50	96,01	2,33	1,79	2,00	0,57	0,13	1,64	0,38
100	94,90	1,51	1,79	1,40	0,68	0,19	2,65	0,17
150	47,86	4,69	5,74	1,58	6,12	2,84	40,28	1,19
200	0,48	0,05	3,45	0,64	4,19	1,48	91,89	2,07

Tabelle 8: Chondrozyten in Suspension nach HDD-Behandlung (0-200 MPa, 10 min, 37 °C). FACS-Messwerte (Mittelwert und Standardabweichung) bei der Doppelmessung mit AN und PI. Vital bedeutet, dass die Zellen weder ein AN- noch ein PI-Signal aufwiesen. AN=Annexin V, PI=Propidiumiodid, STA=Standardabweichung.

3.3.4 FACS-Messungen hochdruckinkubierter Chondrosarkomzellen in Suspension

Die Morphologie der Chondrosarkomzellen war im Vergleich zu Chondrozyten deutlich inhomogener mit einer verstärkten Variabilität in Zellgröße und Rauigkeit. Bei Chondrosarkomzellen war die Morphologie nach einer HHD-Behandlung bis einschliesslich 50 MPa nahezu unverändert (Abb. 48 A,B). Nach 100 MPa liess sich eine zweite, veränderte Zellpopulation abgrenzen (Abb. 48 C).

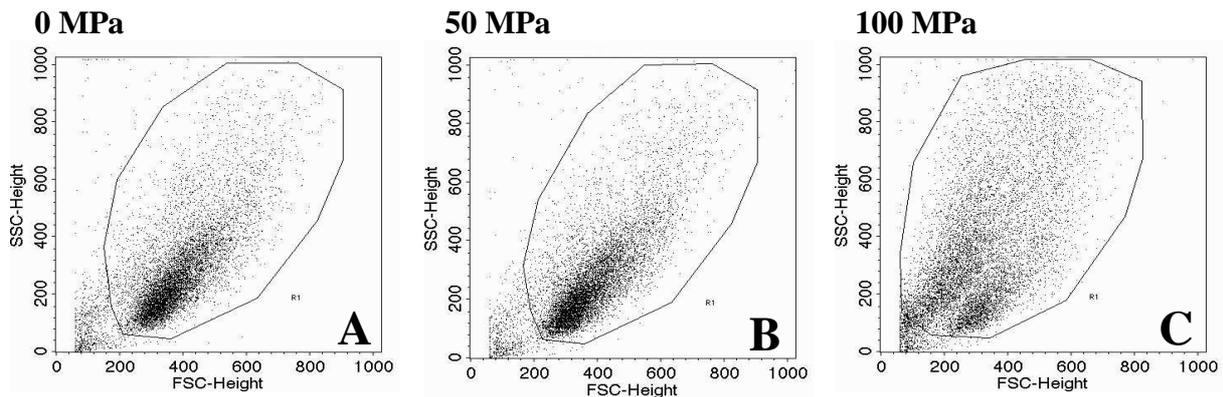


Abb 48 A-C: Morphologie von Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (0-100 MPa). Die Größe der Zellen ist auf der X-Achse (FSC-Height), die Oberflächenbeschaffenheit bzw. Rauigkeit auf der Y-Achse (SSC-Height) dargestellt. Bis 50 MPa zeigte sich keine wesentliche Änderung der Zellgrösse und Oberflächenbeschaffenheit. Ab 100 MPa liess sich deutlich eine zweite Zellpopulation nachweisen, die sich kleiner und inhomogener darstellte.

Ab 150 MPa kam es zu deutlichen Änderungen, die Zellen wurden kleiner, die Oberflächenbeschaffenheit bzw. Rauigkeit nahm zu und die Morphologie der Zellen verschob sich zugunsten der veränderten Population (Abb. 49 A). Nach 200 MPa zeigten die Zellen die gleichen, weiter verstärkten Änderungen (Abb. 49 B).

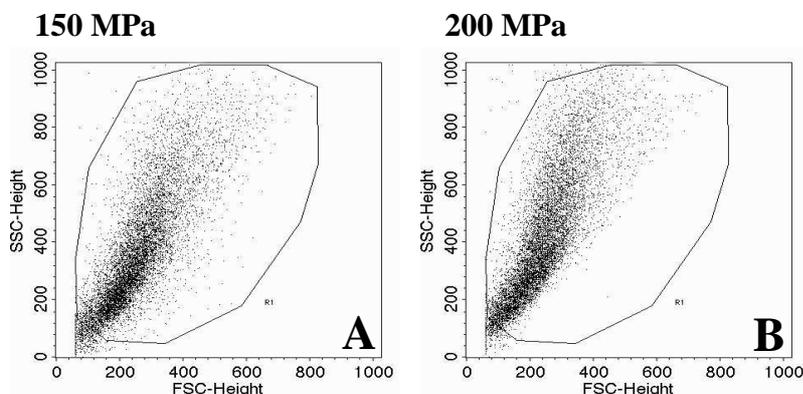


Abb. 49 A,B: Morphologie von Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (150-200 MPa). Die Größe der Zellen ist auf der X-Achse (FSC-Height), die Oberflächenbeschaffenheit auf der Y-Achse (SSC-Height) dargestellt. Nach 150 MPa wurden alle Zellen kleiner und die Oberfläche inhomogener, deutlicher ausgeprägt nach 200 MPa.

Bei der alleinigen Messung der Annexin V-Bindung zeigten Chondrosarkomzellen bis 50 MPa kein steigendes AN-Signal im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb 50 A,B).

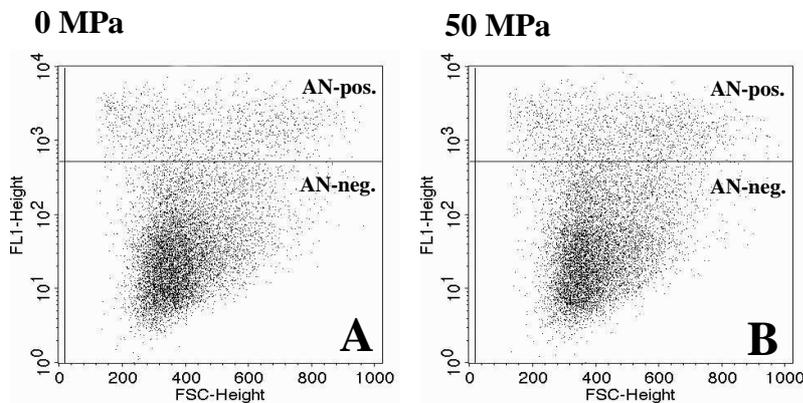


Abb. 50 A,B: Annexin V-Bindung von Chondrosarkomzellen. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Signale oberhalb der Trennlinie zeigen AN-positive Zellen an, Signale darunter AN-negative Zellen. Bis einschliesslich 100 MPa zeigt sich keine wesentliche Zunahme AN-positiver Zellen.

Ab 100 MPa stieg die AN-Bindungsrate an und erreichte nach 200 MPa 85,17 % (+/- 16,13 %) (Abb. 51 A-C). Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

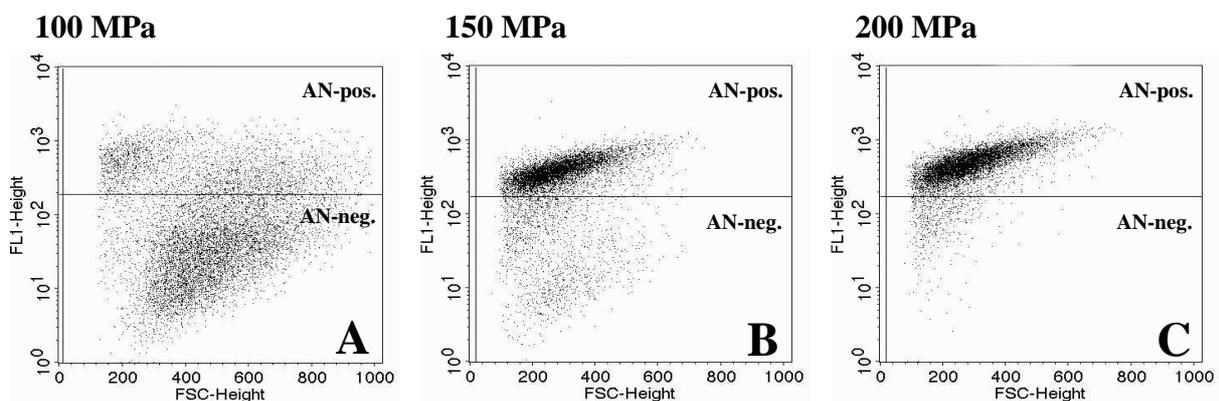


Abb. 51 A-C: Annexin V-Bindung von Chondrosarkomzellen. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Ab 150 MPa liess sich deutlich eine zweite, AN-positive Zellpopulation erkennen, die bereits die meisten Zellen einnahm.

Bei der alleinigen Messung der PI-Bindung wiesen bereits in der Nullkontrolle durchschnittlich 8,99 % (+/- 4,24 %) der Chondrosarkomzellen eine PI-Fluoreszenz auf (Abb. 52 A). Die Rate stieg auf 14,27 % (+/- 6,64 %) bei 100 MPa (Abb. 52 C).

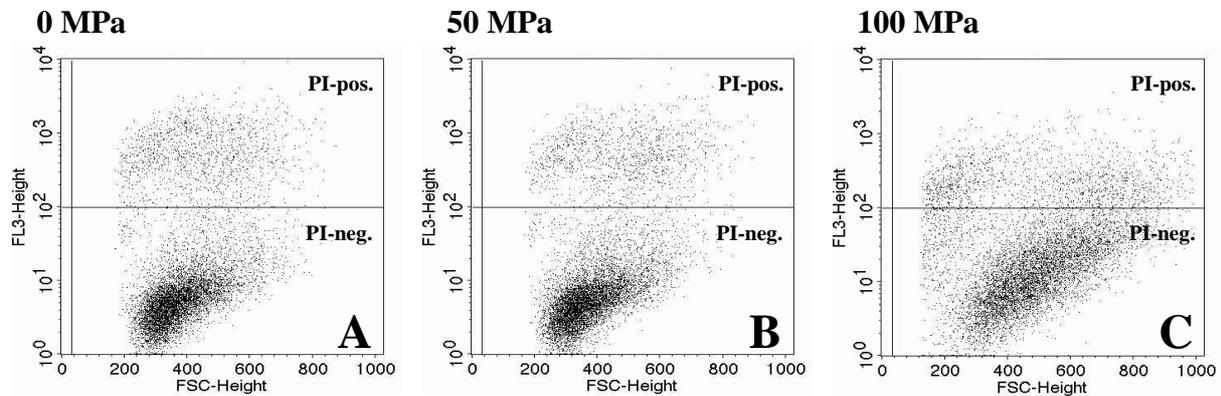


Abb. 52 A-C: Propidiumiodid-Bindung von Chondrosarkomzellen. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Signale oberhalb der Trennlinie zeigen PI-positive Zellen an, Signale darunter PI-negative Zellen. Bis 100 MPa stieg der Anteil PI-positiver Zellen auf knapp 15 % an.

Ab 150 MPa kam es zu einem verstärkten Anstieg PI-positiver Zellen, nach 200 MPa wiesen 79,81 % (+/- 9,07 %) der Zellen eine PI-Fluoreszenz auf (Abb. 53 A,B). Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

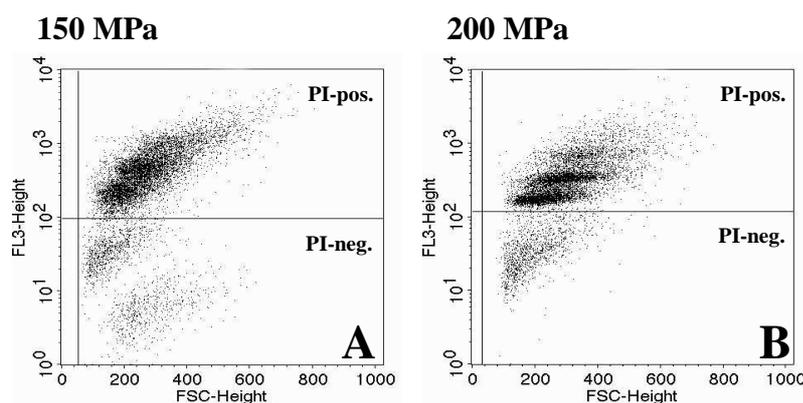


Abb. 53 A,B: Propidiumiodid-Bindung von Chondrozyten. Die Zellgröße (X-Achse, FSC-Height) ist gegen die Fluoreszenz (Y-Achse, FL1-Height) aufgetragen. Ab 150 MPa liess sich deutlich eine zweite, PI-positive Zellpopulation erkennen (I), die nach 200 MPa die meisten Zellen einnahm (J). Die dritte erkennbare Population ist durch einen tetraploiden DNA-Satz während der Zellteilung zu erklären. Das Signal ist durch die Aufnahme von PI während eines Teilungszyklus entstanden.

Bei der Doppelmarkierung der Chondrosarkomzellen mit AN und PI zeigte sich bis 100 MPa eine leichte Zunahme der Zellen, die eine Doppelmarkierung aufwiesen (Abb. 54 A-C).

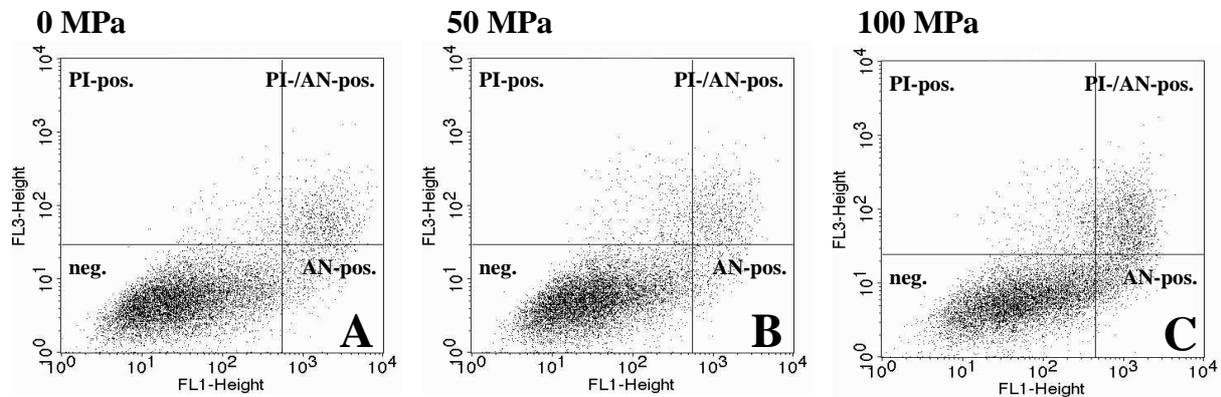


Abb. 54 A-C: Annexin V- und Propidiumiodid-Bindung von Chondrosarkomzellen. Die Annexin V-Fluoreszenz ist auf der X-Achse (FL1-Height), die Propidiumiodid-Fluoreszenz auf der Y-Achse (FL3-Height) aufgetragen. Zellen im unteren linken Quadranten weisen keine Fluoreszenz auf. Zellen im unteren rechten Quadranten sind AN-positiv und Zellen im oberen linken Quadranten PI-positiv. Zellen, die sich im oberen rechten Quadranten darstellen sind sowohl AN- als auch PI-positiv.

Ab 150 MPa sank die Zahl unmarkierter Zellen deutlich bis nach 200 MPa nur noch 5,29 % (+/- 1,43 %) der Zellen weder eine PI-, AN-, noch eine Doppelfluoreszenz aufwiesen.

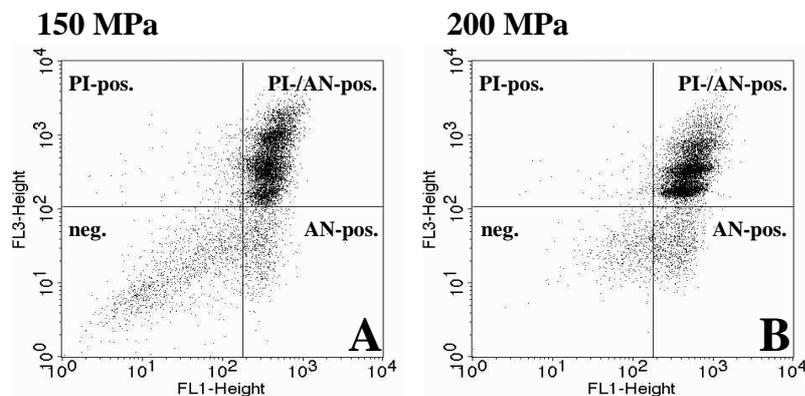


Abb. 55 A,B: Annexin V- und Propidiumiodid-Bindung von Chondrosarkomzellen. Die Annexin V-Fluoreszenz ist auf der X-Achse (FL1-Height), die Propidiumiodid-Fluoreszenz auf der Y-Achse (FL3-Height) aufgetragen. Zellen im unteren linken Quadranten weisen keine Fluoreszenz auf. Zellen im unteren rechten Quadranten sind AN-positiv und Zellen im oberen linken Quadranten PI-positiv. Zellen, die sich im oberen rechten Quadranten darstellen sind sowohl AN- als auch PI-positiv. Ab 150 MPa stieg deutlich die Zahl der Zellen mit positivem Signal. Die zwei abgrenzbaren Populationen im oberen rechten Quadranten sind durch einen unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zellen während der Hochdruckbehandlung bedingt. Dies ist auf den normalerweise diploiden Satz in der G₀-Phase bzw. auf einen tetraploiden Satz während der Zellteilung zurückzuführen. Die vermutende dritte Population mit dem höchsten Signal resultiert aus Zellfragmenten.

Eine Übersicht über die einzelnen Ergebnisse bei der Doppelmarkierung von Chondrosarkomzellen mit AN und PI gibt die folgende Tabelle 9:

Druck in MPa	Vital in %	STA in %	Nur AN-pos. in %	STA in %	Nur PI-pos. in %	STA in %	AN- und PI-pos. in %	STA in %
0	85,06	6,53	5,31	1,69	2,40	1,56	7,18	3,66
50	84,62	7,52	4,69	2,24	3,95	2,69	6,75	3,34
100	77,07	12,29	8,22	5,49	4,12	1,28	10,60	5,92
150	19,67	7,37	8,60	1,31	2,97	0,32	68,76	8,47
200	5,29	1,43	13,05	6,58	4,19	5,18	77,47	12,01

Tabelle 9: Chondrosarkomzellen in Suspension nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). FACS-Messwerte (Mittelwert und Standardabweichung) bei der Doppelmarkierung mit AN und PI. Vital bedeutet, dass die Zellen weder ein AN- noch ein PI-Signal aufwiesen. AN=Annexin V, PI=Propidiumiodid, STA=Standardabweichung.

3.4 Konfokale Lasermikroskopie hochdruckbehandelter Zellen

Im konfokalen Lasermikroskop liessen sich die Auswirkung der Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C) auf die Membranen von Chondrosarkomzellen und Chondrozyten deutlich erkennen. Unbehandelte Zellen waren rund und homogen, wobei Chondrosarkomzellen kleiner als Chondrozyten waren (Abb. 56 und 58). Nach einer Behandlung bei 150 MPa zeigte sich eine deutliche Größenzunahme der Chondrosarkomzellen, wobei sich starke Membranunregelmäßigkeiten in Form von Blasen und Knospen zeigten (Abb. 59). Nach 200 MPa wiesen beiden Zelllinien zerstörte Membranen und desintegrierte subzelluläre Bestandteile auf, die Chondrozyten zeigten im Vergleich zu den Chondrosarkomzellen keine Größenzunahme (Abb. 57 und 60).

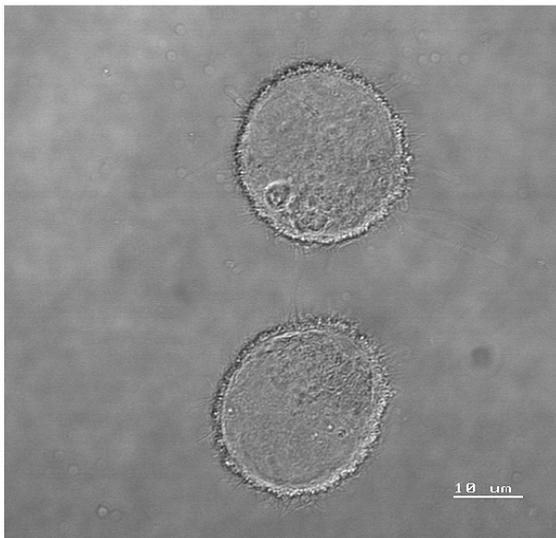


Abb. 56: Unbehandelte Chondrozyten. Die Zellen erscheinen rund und gleichmäßig, die Zellmembran ist intakt.

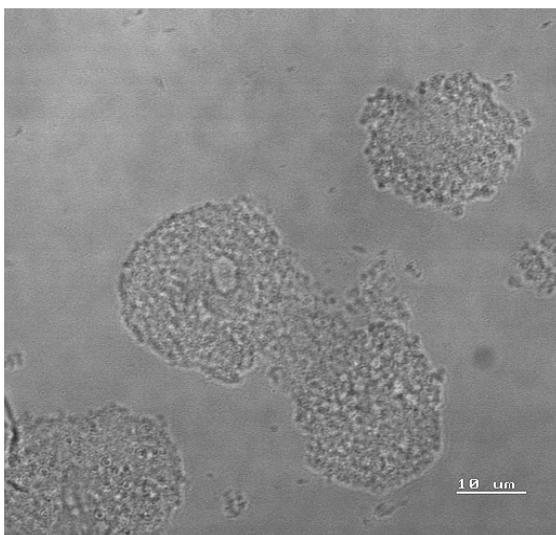


Abb. 57: Chondrozyten nach HHD-Behandlung bei 200 MPa. Die Zellen sind inhomogen und die Zellmembran ist zerstört.

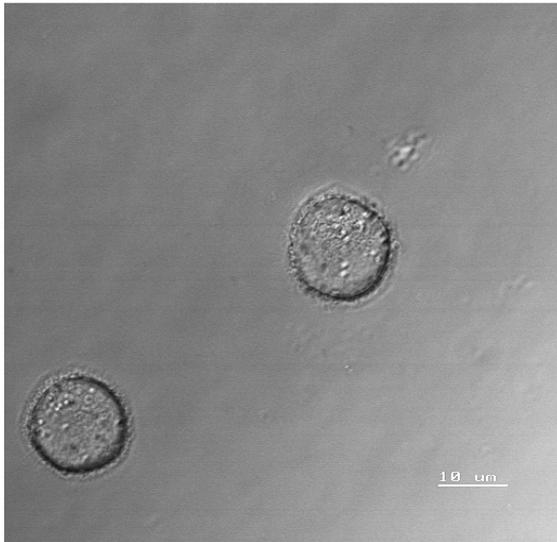


Abb. 58: Unbehandelte Chondrosarkomzellen. Die Zellen erscheinen rund und gleichmäßig, die Zellmembran ist glatt und intakt.

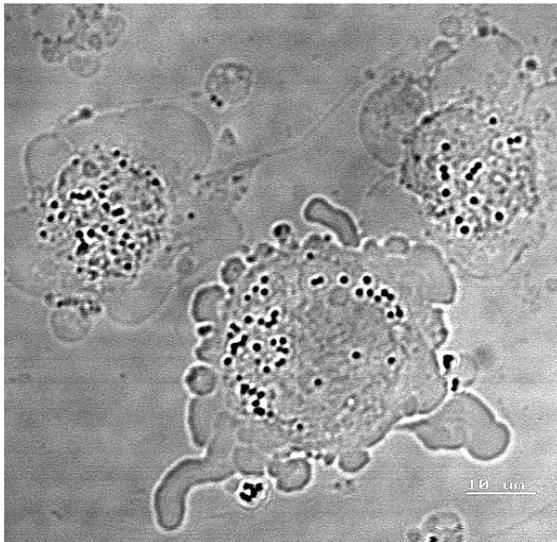


Abb. 59: Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung bei 150 MPa. Es sind kontrastreiche Granula zu erkennen, Zellveränderungen zeigen sich in Form von Ausstülpungen, auch lässt sich eine deutliche Zunahme des Zelldurchmessers erkennen.

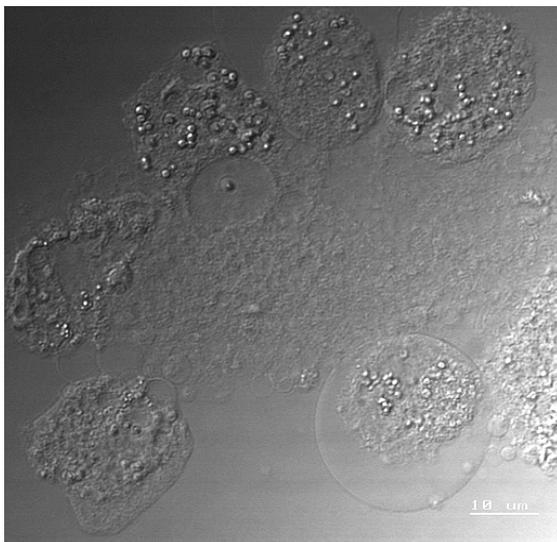


Abb. 60: Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung bei 200 MPa. Die Zellen sind inhomogen und zerstört.

3.5 Biomechanische Untersuchungen von Knorpelgewebe nach Hochdruckbehandlung

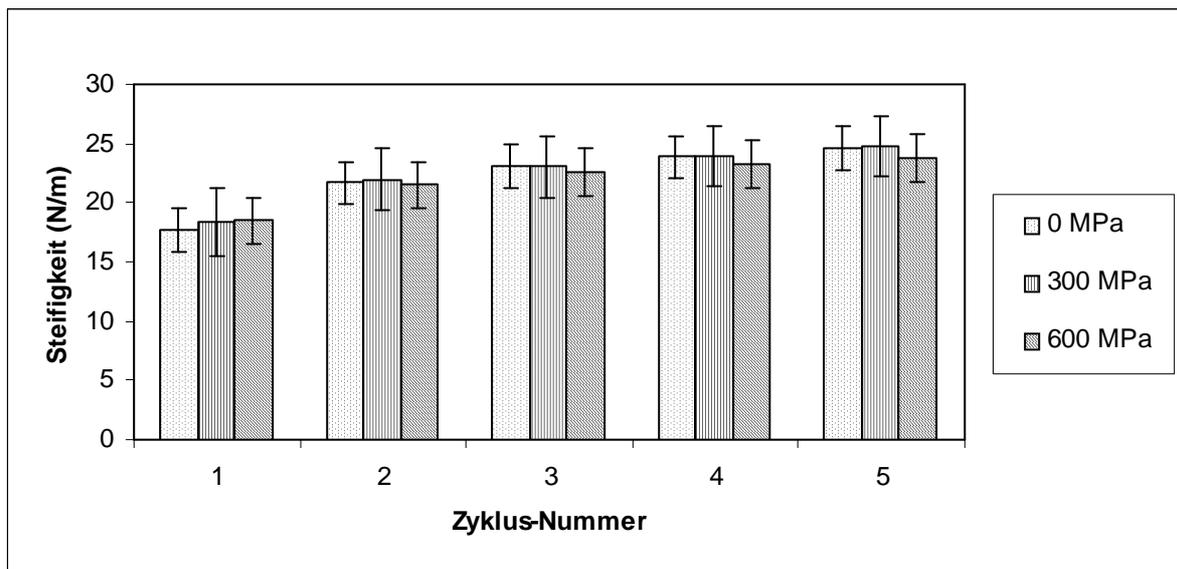
3.5.1 Lateraler Meniskus

Die Steifigkeit (N/m) der Kontrollproben aus dem lateralen Meniskus stieg von Zyklus zu Zyklus innerhalb der fünf Test-Zyklen, wobei sich die Charakteristik einer Sättigungskurve entwickelte, d. h. der Anstieg der Steifigkeit fiel von Zyklus zu Zyklus geringer aus. Die Proben nach einer Behandlung bei 300 und 600 MPa (10 min, 20 °C) zeigten das gleiche Verhalten. Die Steifigkeit lag nach dem ersten Test-Zyklus bei den behandelten Proben etwas höher als bei den Kontrollproben, dieser Unterschied verlor sich jedoch in den folgenden Test-Zyklen. In den bei 600 MPa behandelten Proben lag die Steifigkeit ab dem zweiten Test-Zyklus geringfügig unterhalb derer der Kontrollproben (Grafik 5). Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede in der Steifigkeit gegenüber unbehandelten Proben.

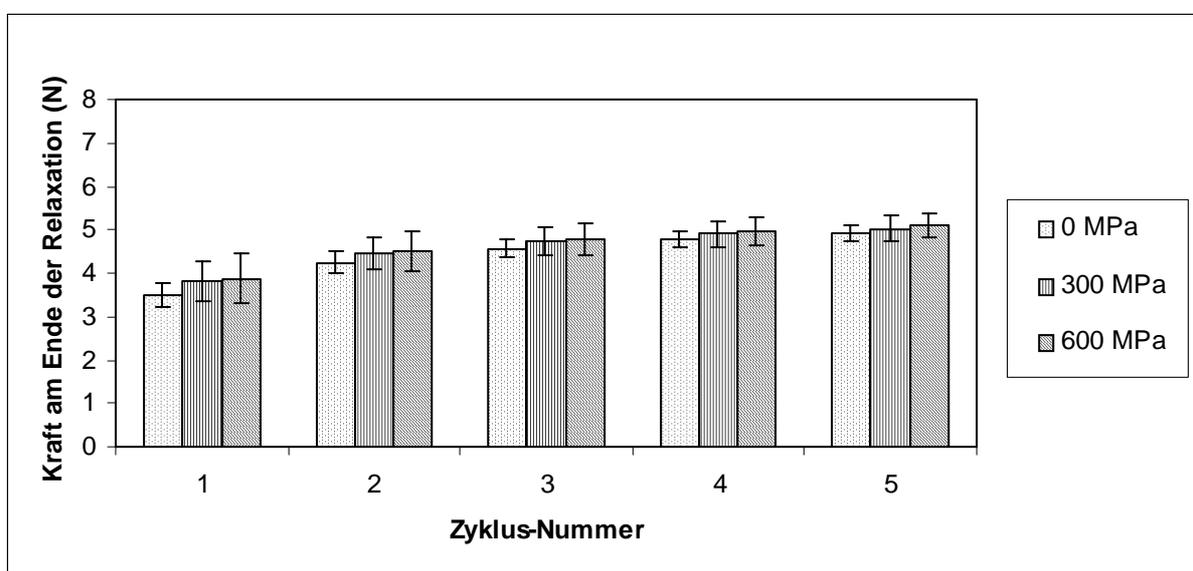
Die Kraft am Ende der Relaxation (N) der Kontrollproben aus dem lateralen Meniskus stieg ebenfalls von Zyklus zu Zyklus an, wobei sich auch hier die Charakteristik einer Sättigungskurve zeigte. Die Proben nach einer Behandlung bei 300 und 600 MPa (10 min, 20 °C) zeigten das gleiche Verhalten, wobei die Kraft am Ende der Relaxation (N) in allen Test-Zyklen geringfügig höher als in den Kontrollproben war (Grafik 6). Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede im Relaxationsverhalten gegenüber unbehandelten Proben.

Die Eindringtiefe des Stempels bis zum Erreichen der Maximalkraft von 7,0 N (in mm) sank sowohl in den Kontrollproben, als auch in den behandelten Proben aus dem lateralen Meniskus von Zyklus zu Zyklus. Auch hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben. Lediglich bei den mit 600 MPa inkubierten Proben lagen die Werte der Eindringtiefe ab dem dritten Testzyklus geringfügig oberhalb der für die Kontrollproben ermittelten Werte (Grafik 7).

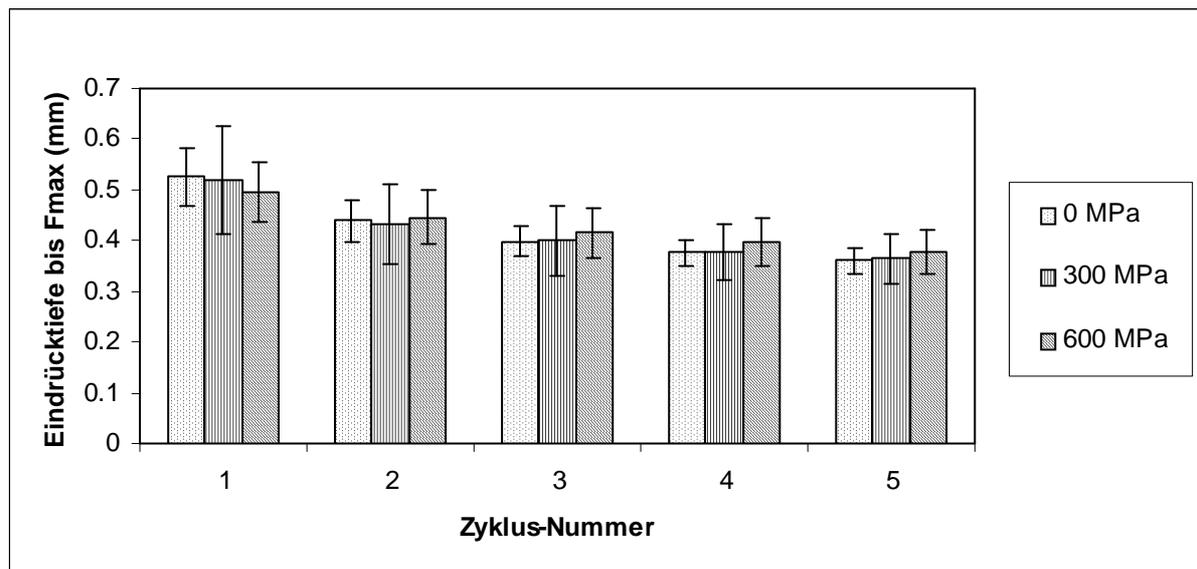
Die einzelnen Messergebnisse und Mittelwerte der biomechanischen Tests von unbehandelten und behandelten Proben aus dem lateralen Meniskus sind dem Anhang zu entnehmen.



Grafik 5: Lateraler Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Es zeigte sich von Testzyklus zu Testzyklus eine Zunahme der Steifigkeit in allen Proben. Es konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten und HHD-behandelten Proben gefunden werden.



Grafik 6: Lateraler Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Es zeigte sich von Testzyklus zu Testzyklus eine Zunahme der Kraft am Ende der Relaxation in allen Proben. Es konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten und HHD-behandelten Proben gefunden werden.



Grafik 7: Lateraler Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Es zeigte sich von Testzyklus zu Testzyklus eine Abnahme der Eindrücktiefe des Stempels bis zum Erreichen der Maximalkraft (7 N) in allen Proben. Es konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten und HHD-behandelten Proben gefunden werden.

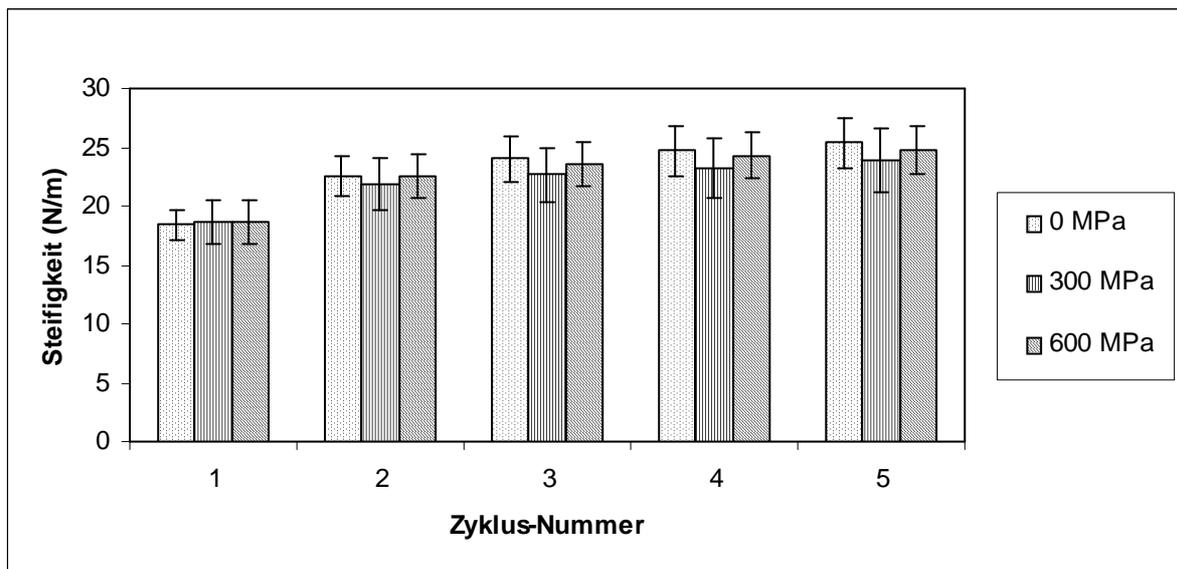
3.5.2 Medialer Meniskus

Die Steifigkeit (N/m) der Kontrollproben aus dem medialen Meniskus stieg ebenso von Zyklus zu Zyklus wie bei den Proben aus dem lateralen Meniskus, auch hier mit der Charakteristik einer Sättigungskurve. Die Proben nach einer Behandlung bei 300 und 600 MPa (10 min, 20 °C) zeigten das gleiche Verhalten. Die Steifigkeit lag nach dem ersten Test-Zyklus bei den behandelten Proben etwas über der Steifigkeit der Kontrollproben, ab dem zweiten Test-Zyklus lag sie darunter. Der Unterschied zwischen den mit 600 MPa inkubierten Proben und den Kontrollproben war dabei geringer als zwischen den bei 300 MPa behandelten Proben und den Kontrollproben (Grafik 8). Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede in der Steifigkeit gegenüber unbehandelten Proben.

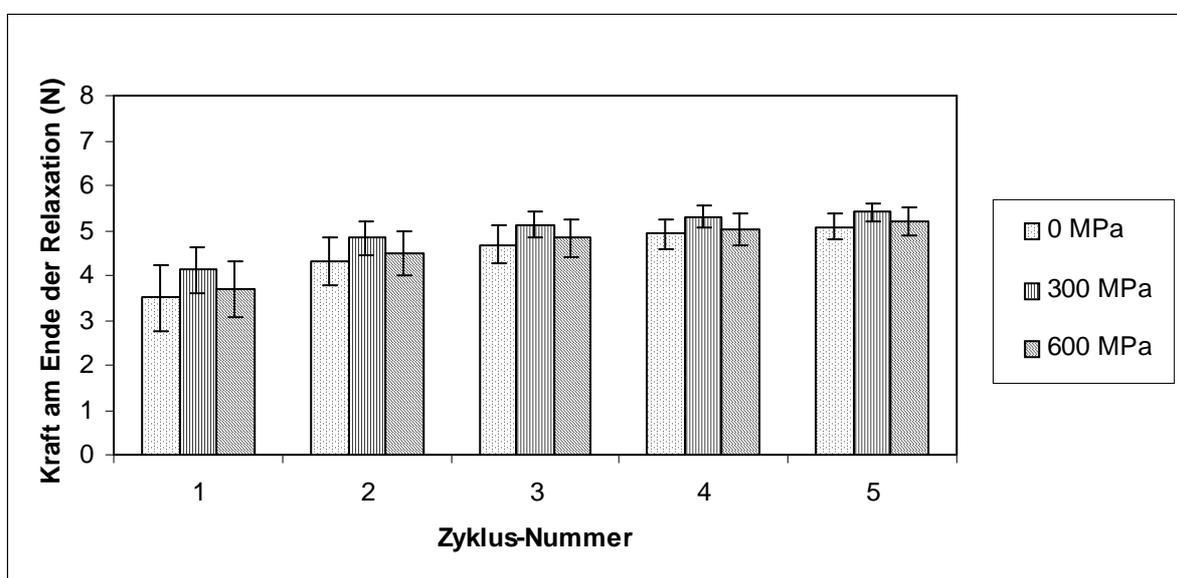
Die Kraft am Ende der Relaxation (N) in den Kontrollproben aus dem medialen Meniskus stieg ebenfalls von Zyklus zu Zyklus an, wobei sich auch hier die Charakteristik einer Sättigungskurve zeigte. Die bei 300 und 600 MPa (10 min, 20 °C) behandelten Proben zeigten das gleiche Verhalten, wobei die Kraft in allen fünf Test-Zyklen geringfügig oberhalb derer der Kontrollproben lag. Der Unterschied gegenüber den Kontrollproben war bei den mit 300 MPa behandelten Proben größer als bei den mit 600 MPa inkubierten Proben (Grafik 9). Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede im Relaxationsverhalten gegenüber unbehandelten Proben.

Die Eindringtiefe des Stempels bis zum Erreichen der Maximalkraft von 7,0 N (in mm) sank sowohl in den Kontrollproben als auch in den behandelten Proben aus dem medialen Meniskus von Zyklus zu Zyklus. Auch hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben (Grafik 10).

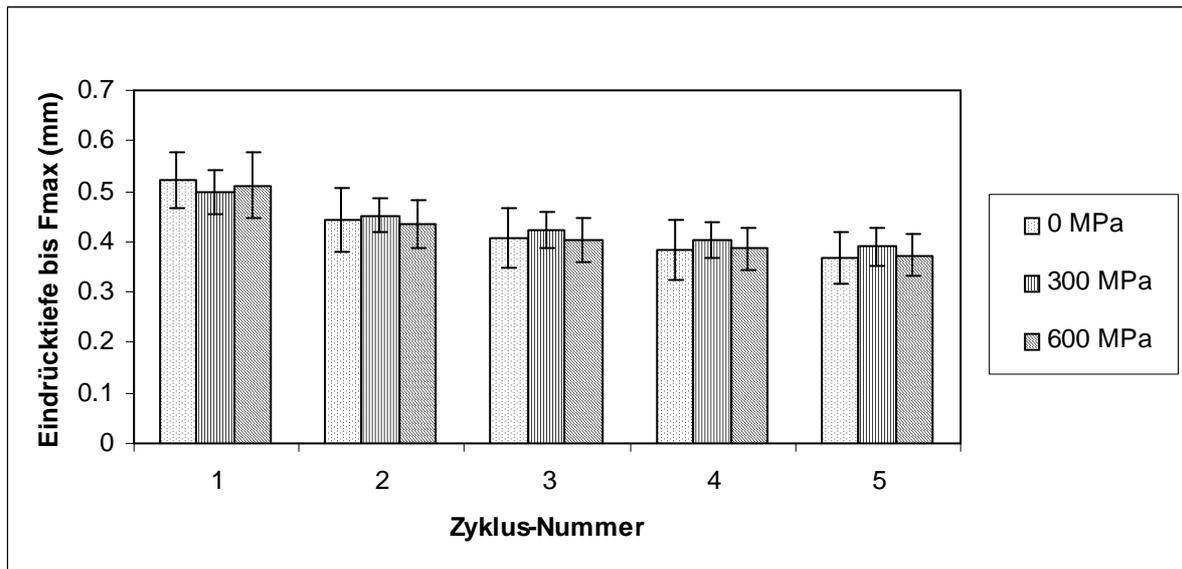
Die einzelnen Messergebnisse und Mittelwerte der biomechanischen Tests von unbehandelten und behandelten Proben aus dem medialen Meniskus sind dem Anhang zu entnehmen.



Grafik 8: Medialer Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Genau wie in den Proben des lateralen Meniskus zeigte sich von Testzyklus zu Testzyklus eine Zunahme der Steifigkeit in allen Proben aus dem medialen Meniskus. Es konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten und HHD-behandelten Proben gefunden werden.



Grafik 9: Medialer Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Analog zu den Proben des lateralen Meniskus zeigten auch die Proben aus dem medialen Meniskus eine Zunahme der Kraft am Ende der Relaxation von Testzyklus zu. Es konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten und HHD-behandelten Proben gefunden werden.



Grafik 10: Medialer Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. In allen Proben zeigte sich eine von Testzyklus zu Testzyklus abnehmende benötigte Eindrücktiefe des Stempels bis zum Erreichen der Maximalkraft (7 N), analog zu Proben aus dem lateralen Meniskus. Es konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten und HHD-behandelten Proben gefunden werden.

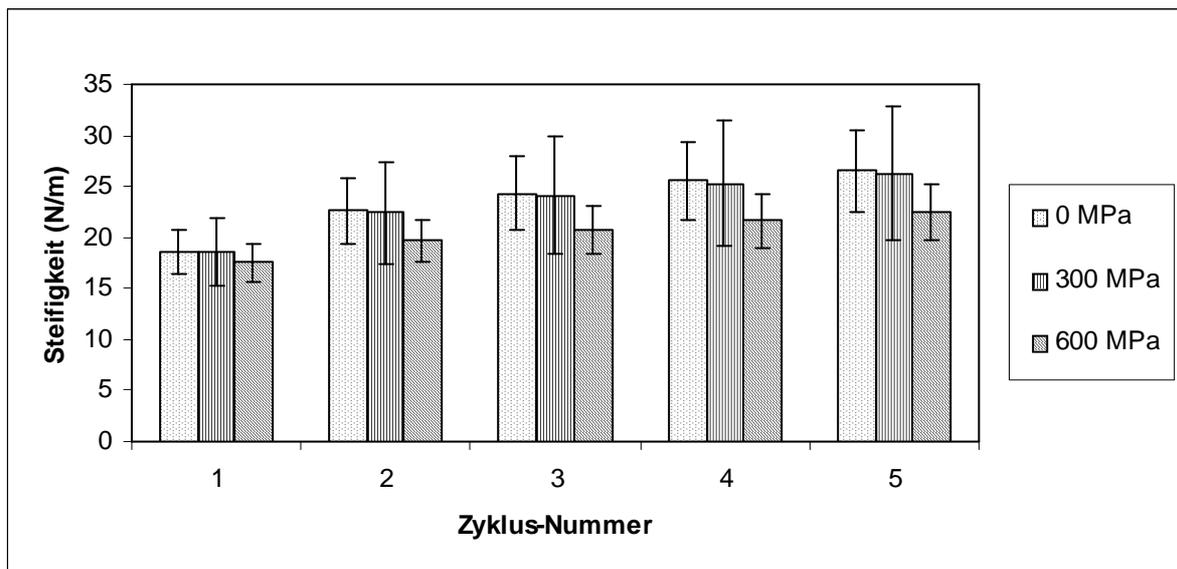
3.5.3 Lateraler Kondylus

Die Steifigkeit (N/m) der Kontrollproben aus dem lateralen Kondylus stieg von Zyklus zu Zyklus, wie bei Meniskus-Proben aufgezeigt. Die bei 300 und 600 MPa (10 min, 20 °C) behandelten Proben zeigten das gleiche Verhalten. Es zeigte sich nach 300 MPa kein signifikanter Unterschied in der Steifigkeit gegenüber unbehandelten Proben, bis zum 5. Test-Zyklus war die Steifigkeit der Kontrollproben und der bei 300 MPa behandelten Segmente nahezu identisch. In den bei 600 MPa behandelten Proben zeigte sich ab dem 2. Testzyklus eine signifikante Reduktion der Steifigkeit um etwa 15 %, die in dem gleichen Ausmaß bis zum 5. Testzyklus bestehen blieb (Grafik 11).

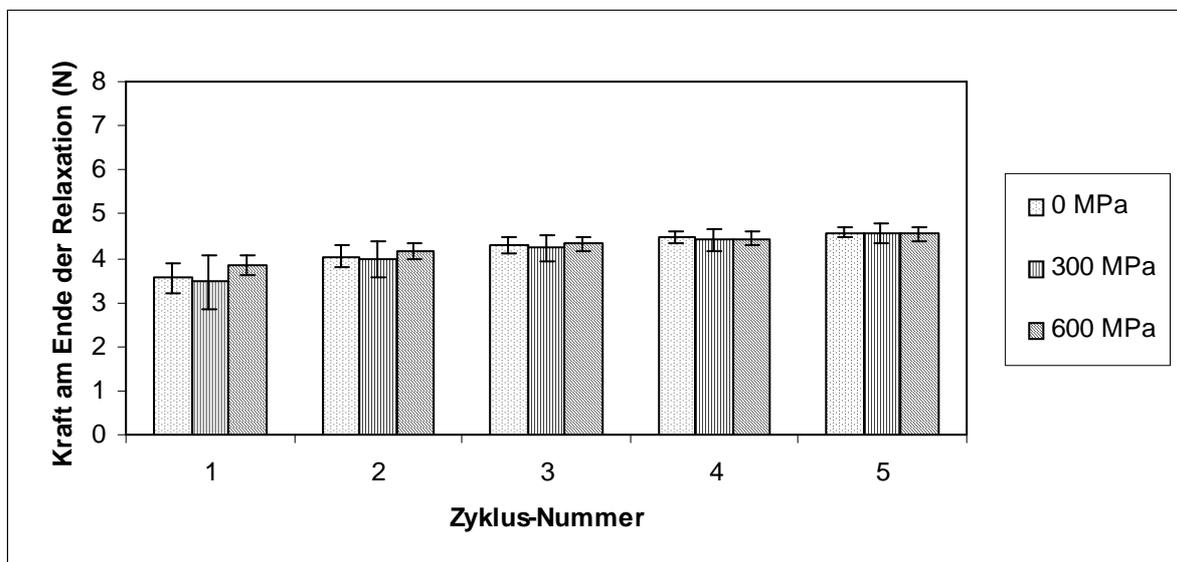
Die Kraft am Ende der Relaxation (N) in den Kontrollproben aus dem lateralen Kondylus stieg ebenfalls von Zyklus zu Zyklus an, wobei sich auch hier die Charakteristik einer Sättigungskurve entwickelte. Die bei 300 und 600 MPa (10 min, 20 °C) behandelten Proben zeigten das gleiche Verhalten. Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede im Relaxationsverhalten gegenüber unbehandelten Proben, bis zum 5. Test-Zyklus war die Kraft am Ende der Relaxation (N) in allen drei Gruppen nahezu identisch (Grafik 12).

Die Eindrücktiefe des Stempels bis zum Erreichen der Maximalkraft von 7,0 N (in mm) sank sowohl in den Kontrollproben als auch in den behandelten Proben aus dem lateralen Kondylus von Zyklus zu Zyklus. Zwischen den Kontrollproben und den bei 300 MPa behandelten Proben zeigte sich in allen 5 Testzyklen kein signifikanter Unterschied in der Eindrücktiefe. Bei den mit 600 MPa behandelten Segmenten lag die Eindrücktiefe nach dem 1. Testzyklus knapp 10 % oberhalb derer der Kontrollproben. Dieser Unterschied wuchs stetig von Zyklus zu Zyklus. Nach dem 5. Testzyklus lag der Wert der Eindrücktiefe für die bei 600 MPa behandelten Segmente ca. 40 % über dem Wert der unbehandelten Proben (Grafik 13).

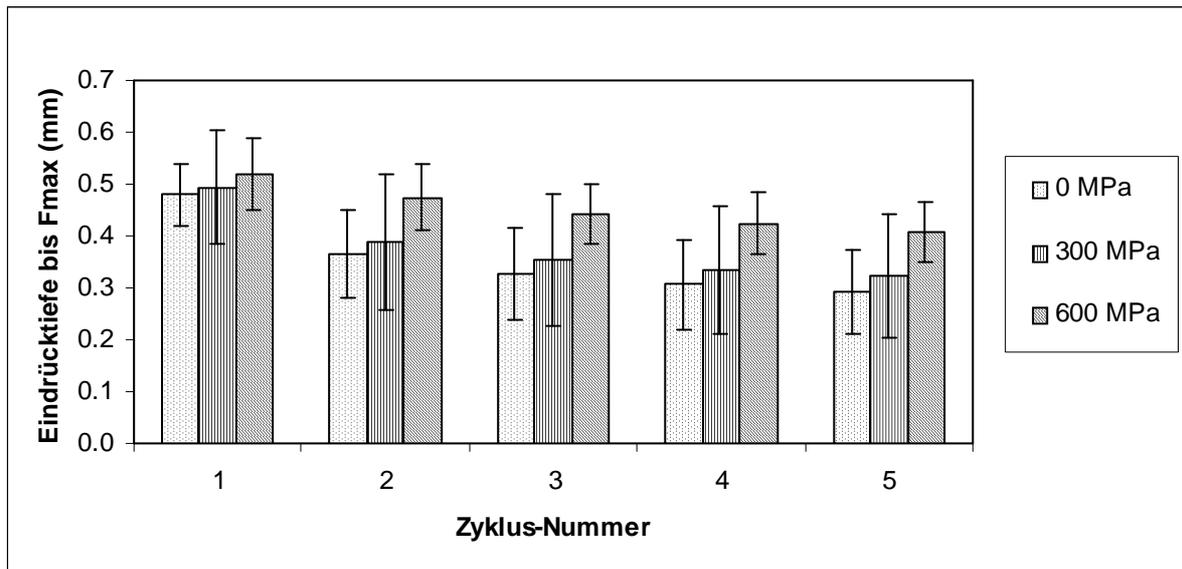
Die einzelnen Messergebnisse und Mittelwerte der biomechanischen Tests von unbehandelten und behandelten Proben aus dem lateralen Kondylus sind dem Anhang zu entnehmen.



Grafik 11: Lateraler Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Die Steifigkeit aller Proben aus dem lateralen Kondylus stieg von Testzyklus zu Testzyklus, wie bei Meniskus-Proben aufgezeigt. Nach Behandlung bei 300 MPa waren keine Unterschiede gegenüber unbehandelten Proben nachweisbar. In den bei 600 MPa behandelten Proben zeigte sich ab dem 2. Testzyklus eine signifikante Reduktion der Steifigkeit um etwa 15 %, die in dem gleichen Ausmaß bis zum 5. Testzyklus bestehen blieb.



Grafik 12: Lateraler Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Die Kraft am Ende der Relaxation stieg ebenfalls in allen Proben aus dem lateralen Kondylus von Testzyklus zu Testzyklus an. Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede im Relaxationsverhalten gegenüber unbehandelten Proben.



Grafik 13: Lateraler Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Die zum Erreichen der Maximalkraft (7 N) benötigte Eindrücktiefe des Stempels sank in allen Proben von Testzyklus zu Testzyklus. Zwischen den Kontrollproben und den bei 300 MPa behandelten Proben zeigte sich in allen 5 Testzyklen kein signifikanter Unterschied. Bei den mit 600 MPa behandelten Segmenten lag die Eindrücktiefe nach dem 1. Testzyklus knapp 10 % oberhalb derer der Kontrollproben. Dieser Unterschied wuchs stetig von Zyklus zu Zyklus. Nach dem 5. Testzyklus lag der Wert der Eindrücktiefe für die bei 600 MPa behandelten Segmente ca. 40 % über dem Wert der unbehandelten Proben. Die Unterschiede waren vom 2. bis zum 5. Testzyklus signifikant.

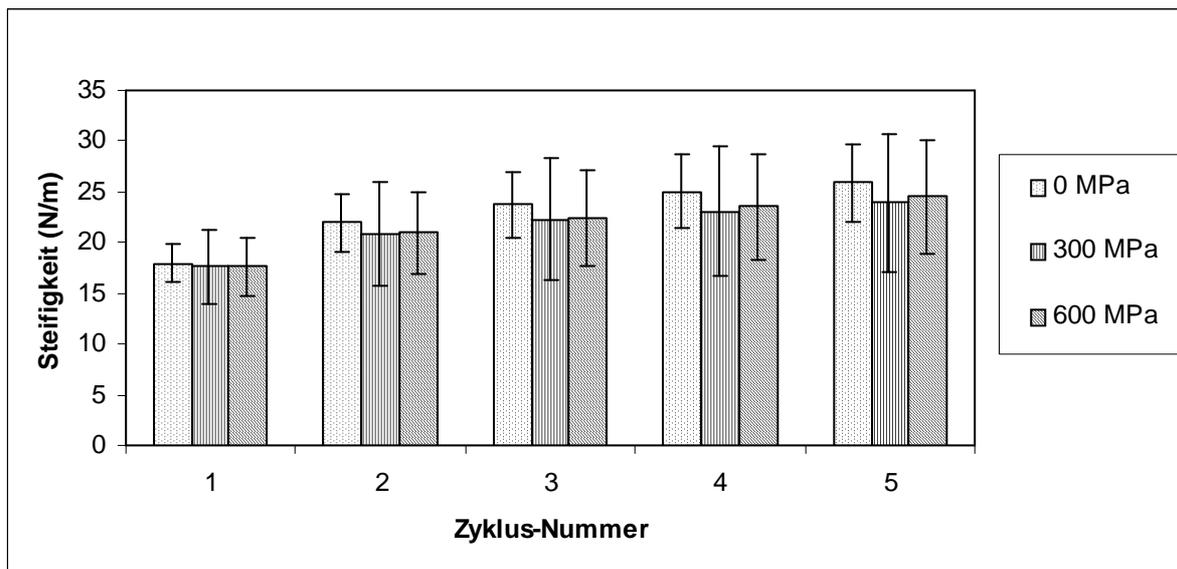
3.5.4 Medialer Kondylus

Die Steifigkeit (N/m) der Kontrollproben, der bei 300 und der bei 600 MPa behandelten Proben (10 min, 20 °C) aus dem medialen Kondylus stieg von Zyklus zu Zyklus. Die Steifigkeit der unbehandelten und der behandelten Proben (300 und 600 MPa) war nach dem 1. Testzyklus nahezu identisch. Ab dem zweiten Zyklus lag die Steifigkeit der hochdruck-behandelten Segmente leicht unterhalb derer der Kontrollproben (max. 8 %), wobei dieser Unterschied nicht signifikant war. Zwischen den mit 300 und 600 MPa behandelten Proben zeigten sich keine Unterschiede (Grafik 14).

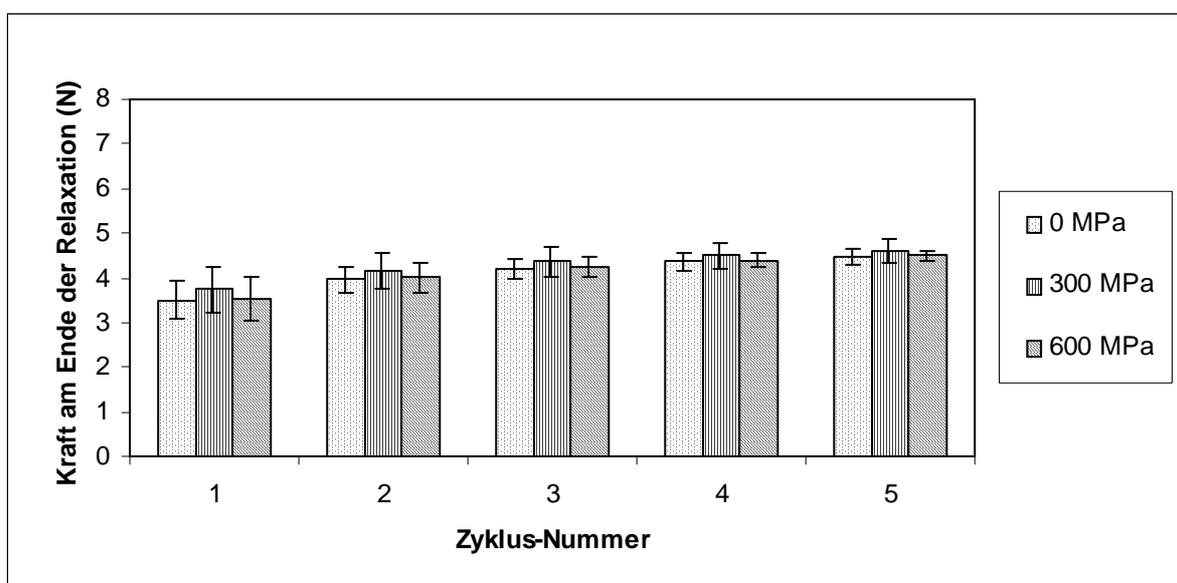
Die Kraft am Ende der Relaxation (N) in den Kontrollproben, sowie in den bei 300 und bei 600 MPa behandelten Proben (10 min, 20 °C) aus dem medialen Kondylus stieg ebenfalls von Zyklus zu Zyklus. Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Unterschiede im Relaxationsverhalten gegenüber den Kontrollproben, bis zum 5. Testzyklus war die Kraft am Ende der Relaxation (N) in allen drei Gruppen nahezu identisch (Grafik 15).

Die Eindringtiefe des Stempels bis zum Erreichen der Maximalkraft von 7,0 N (in mm) sank sowohl in den Kontrollproben als auch in den behandelten Proben aus dem medialen Kondylus von Zyklus zu Zyklus. Die Eindringtiefe der behandelten Proben lag in allen 5 Testzyklen oberhalb derer der Kontrollproben, deutlicher bei den mit 300 als bei den mit 600 MPa behandelten Segmenten. Zeigten sich nach dem 1. Testzyklus nur geringe Unterschiede zu den Kontrollen, so vergrößerte sich der Unterschied stetig bis zum 5. Zyklus. Hier lag der Wert für die Eindringtiefe bei den mit 300 MPa behandelten Proben ca. 30 % über dem Wert der Kontrollen. Zwischen unbehandelten und bei 600 MPa behandelten Proben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Grafik 16).

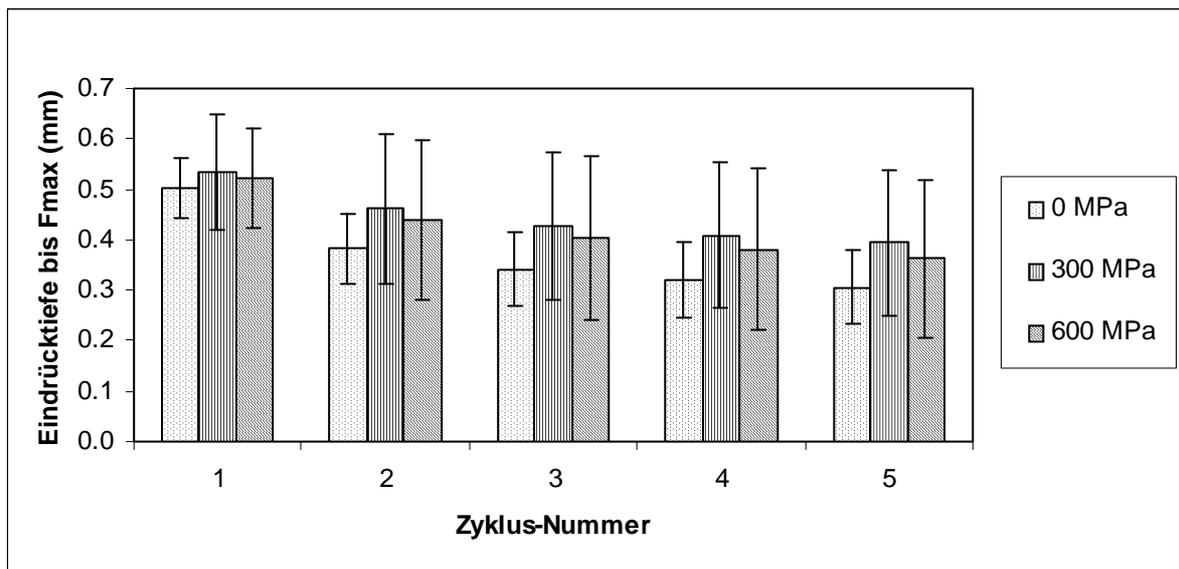
Die einzelnen Messergebnisse und Mittelwerte der biomechanischen Tests von unbehandelten und behandelten Proben aus dem medialen Kondylus sind dem Anhang zu entnehmen.



Grafik 14: Medialer Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Die Stiffigkeit aller Proben aus dem medialen Kondylus stieg von Testzyklus zu Testzyklus an. Ab dem zweiten Zyklus lag die Stiffigkeit der HHD-behandelten Segmente leicht unterhalb derer der Kontrollproben (max. 8 %), wobei dieser Unterschied nicht signifikant war. Zwischen den mit 300 und 600 MPa behandelten Proben zeigten sich keine Unterschiede.



Grafik 15: Medialer Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Die Kraft am Ende der Relaxation stieg in allen Proben Kontrollproben von Testzyklus zu Testzyklus leicht an. Es zeigten sich weder nach 300 noch nach 600 MPa Unterschiede im Relaxationsverhalten gegenüber den Kontrollproben.



Grafik 16: Medialer Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Knorpelproben fünf direkt hintereinanderfolgenden Testzyklen unterzogen. Die zum Erreichen der Maximalkraft (7 N) benötigte Eindrücktiefe des Stempels sank in allen Proben von Testzyklus zu Testzyklus. Die Werte der behandelten Proben lagen in allen 5 Testzyklen oberhalb derer der Kontrollproben, deutlicher bei den mit 300 als bei den mit 600 MPa behandelten Segmenten. Nach dem 5. Testzyklus lag der Wert für die Eindrücktiefe bei den mit 300 MPa behandelten Proben ca. 30 % über dem Wert der Kontrollen.

3.6 Immunhistochemische Färbungen von Knorpelgewebe nach Hochdruckbehandlung

3.6.1 Meniskus-Knorpel

Die Schnitte der Meniskus-Proben zeigten die typische Histologie von Faserknorpel, mit teils längs, teils schräg und teils senkrecht angeschnittenen Fasern, was besonders gut in den Bildern der Kontrollfärbung erkennbar war (Abb. 67). In den immunhistochemischen Anfärbungen der von hochdruckbehandelten (600 MPa, 10 min, 20 °C) und unbehandelten Meniskus-Proben gewonnenen Kryo-Schnitte waren in allen Fällen die spezifisch angefärbten Kollagene und Proteoglykane nachweisbar. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede im Verteilungsmuster. Die Kollagene (I, II und III) waren sowohl in den Kontrollproben, als auch in den HHD-behandelten Proben nachweisbar (Abb. 61 bis 63). Ebenfalls konnten die Proteoglykane Versican, Link-Protein und Aggrecan in allen Proben immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 64 bis 66). Sowohl in unbehandelten, wie auch in HHD-behandelten Proben wiesen die Proteoglykane eine unveränderte Anfärbbarkeit und ein unverändertes Verteilungsmuster auf. Die Kontrollfärbungen (mit PBS) zeigten kein spezifisches Signal, was die Spezifität der immunhistochemischen Färbung bewies (Abb. 67). Die in den folgenden Abbildungen dargestellten immunhistologischen Schnitte sind mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen worden. Eine spezifische Anfärbbarkeit resultierte in einer graubräunlichen (z. B. Versican, Abb. 64) bis schwarzen (z. B. Kollagen I, Abb 61) Färbung.

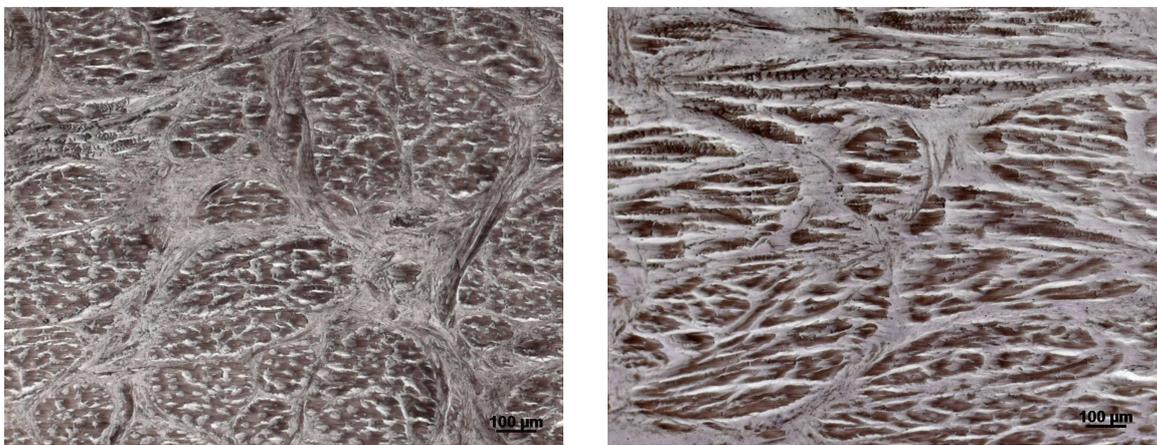


Abb. 61: Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen I in Meniskus-Gewebe. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster von Kollagen I. Durch eine etwas andere Schnittrichtung erscheint die rechte Abbildung vergrößert. 73

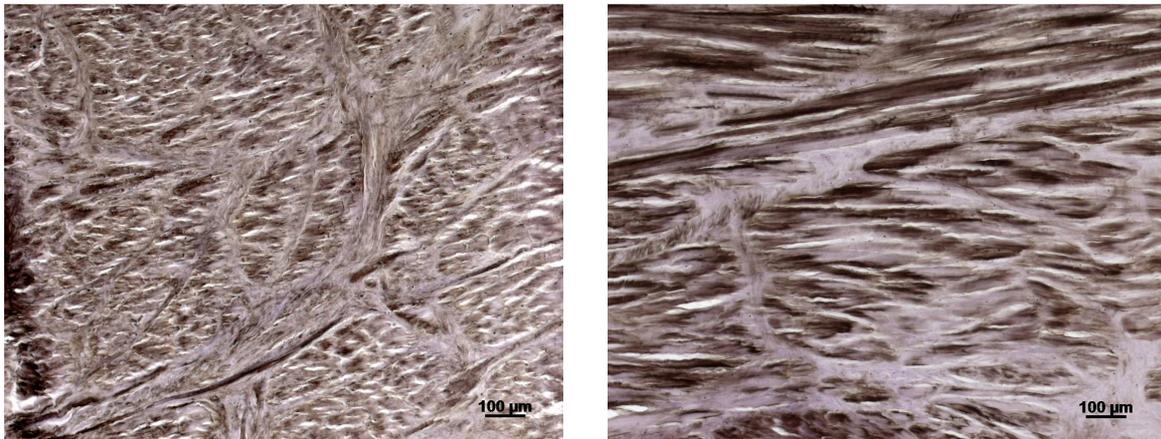


Abb. 62: Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen II in Meniskus-Gewebe. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster von Kollagen II. Durch eine etwas andere Schnitttrichtung erscheint die rechte Abbildung vergrößert.

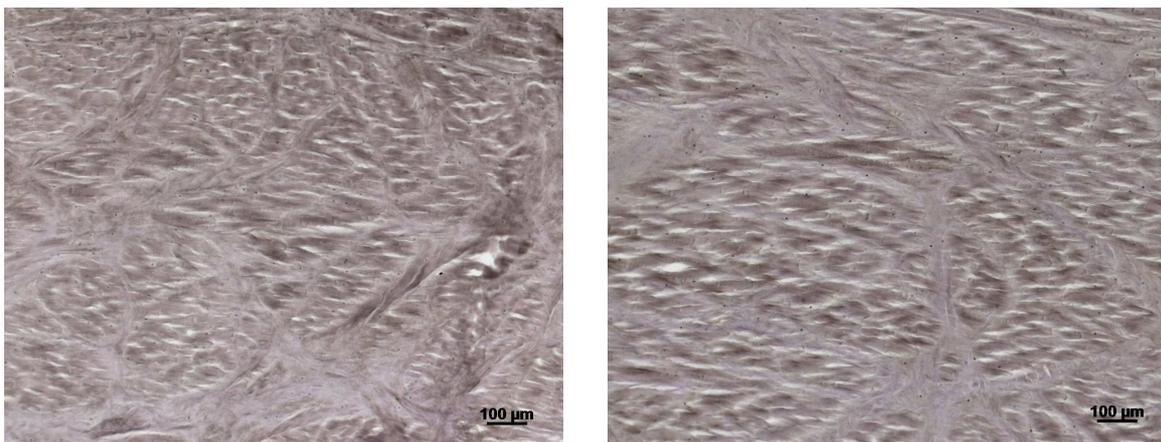


Abb. 63: Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen III in Meniskus-Gewebe. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster von Kollagen

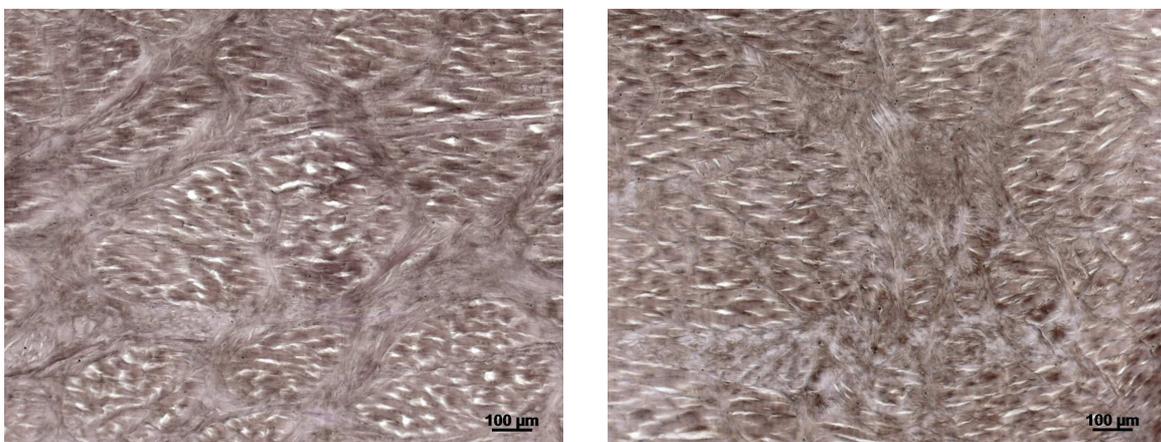


Abb. 64: Immunhistochemische Anfärbung des Proteoglykans Versican in Meniskus-Gewebe. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster.

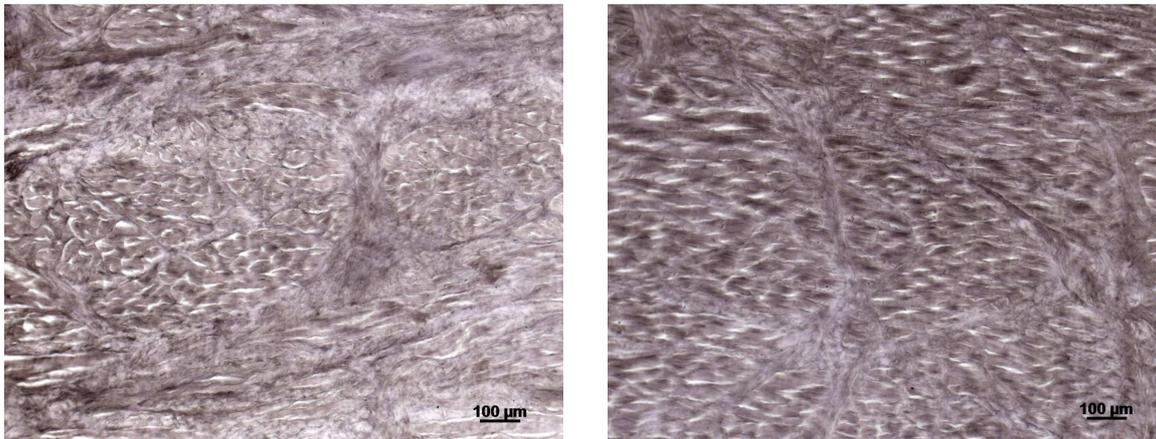


Abb 65: Immunhistochemische Anfärbung des Proteoglykans Link-Protein in Meniskus-Gewebe. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster.

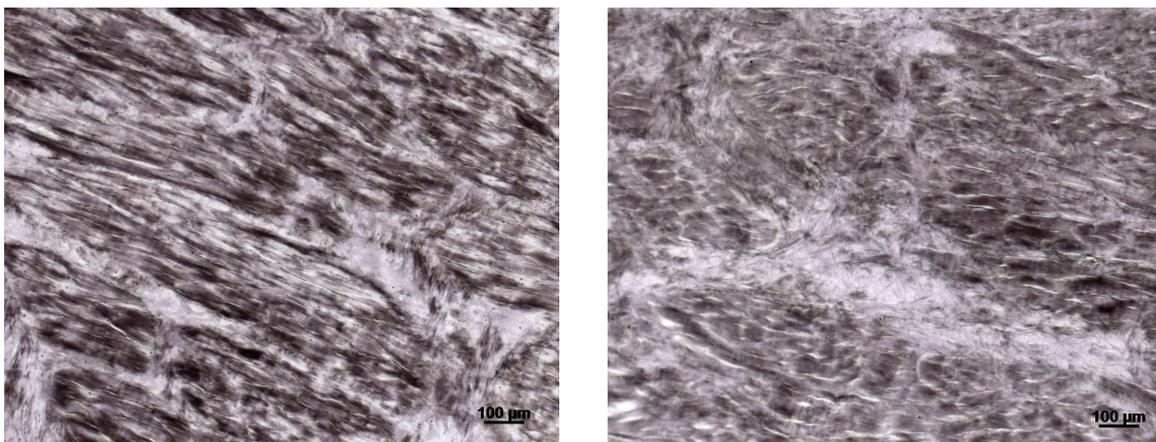


Abb 66: Immunhistochemische Anfärbung des Proteoglykans Aggrecan in Meniskus-Gewebe. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster. Durch die Schnittrichtung sind die Fasern links eher längs und rechts eher quer getroffen.

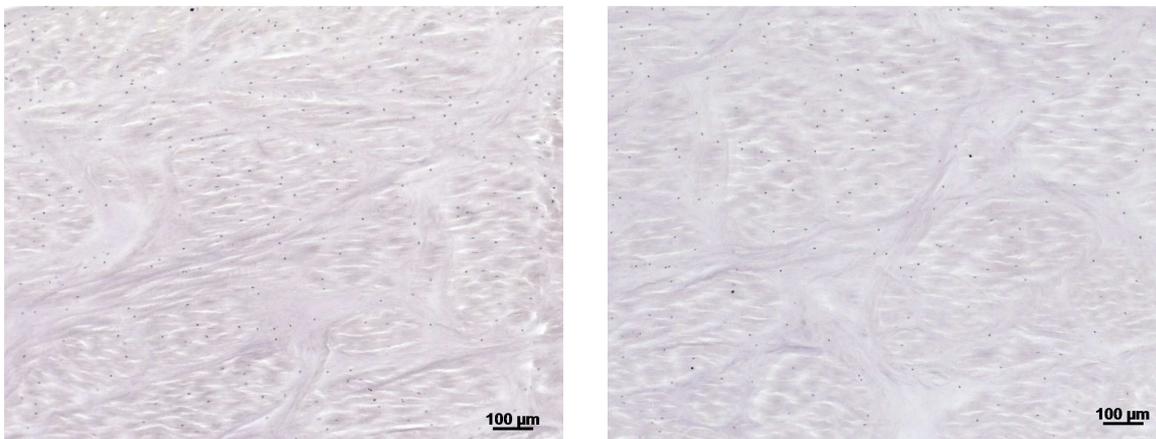


Abb 67: „Kontrollfärbung“ (mit PBS) von Meniskus-Gewebe. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich keine Signalanreicherung, was die Spezifität der vorangegangenen Färbungen bewies.

3.6.2 Gelenkknorpel

Die Schnitte der osteochondralen Kondylus-Proben zeigten die typische Histologie von hyalinem Knorpel, sowie vom angrenzenden subchondralen Knochen. Dies war besonders gut auf den Bildern der Kontrollfärbungen erkennbar (Abb. 74). In den immunhistochemischen Anfärbungen der von hochdruckbehandelten (600 MPa, 10 min, 20 °C) und unbehandelten osteochondralen Segmenten gewonnenen Kryo-Schnitte waren in allen Fällen die spezifisch angefärbten Kollagene und Proteoglykane nachweisbar. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede im Verteilungsmuster. Kollagen I war in entsprechenden Abschnitten des subchondralen Knochen sowohl in den Kontrollproben, als auch in den HHD-behandelten Proben signalintensiv nachweisbar (Abb 68). Im Gelenkknorpel bzw. in endostalen Abschnitten zeigten die Kollagene II und III in allen Proben keine Unterschiede in der Anfärbbarkeit und im Verteilungsmuster (Abb. 69 und 70). Die Proteoglykane Versican, Link-Protein und Aggrecan waren in unbehandelten und HHD-behandelten Proben unverändert anfärbbar. Sie stellten sich in Form einer diffus-fleckigen, bräunlich bis schwarzen Färbung ohne Unterschiede im Verteilungsmuster dar (Abb. 71-73). Die Kontrollfärbungen zeigten kein spezifisches Signal, was die Spezifität der immunhistochemischen Färbungen bewies (Abb. 74). Die auf manchen Abbildungen erkennbaren Querstreifen sind Schnittartefakte, die durch das Messer während der Anfertigung der Kryoschnitte hervorgerufen wurden. Die in den folgenden Abbildungen dargestellten immunhistologischen Schnitte sind mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen worden.

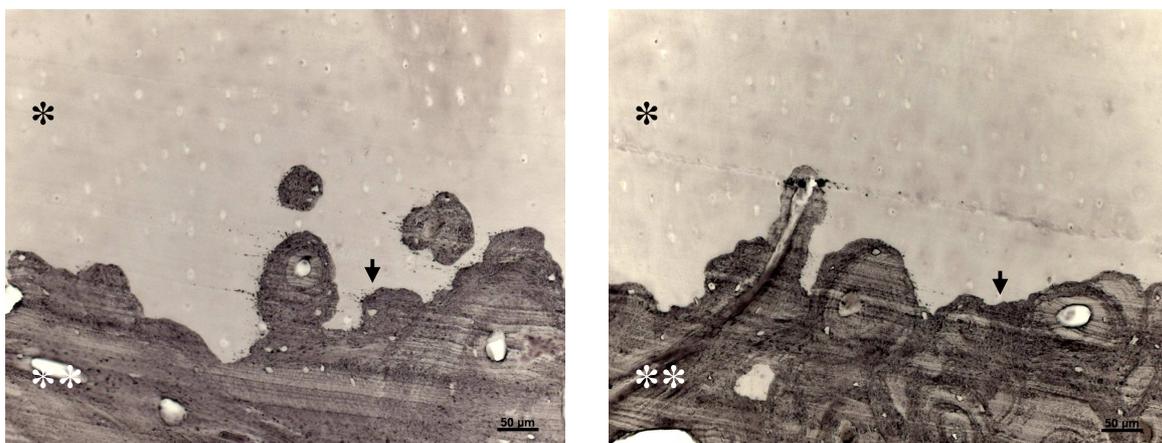


Abb 68: Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen I in osteochondralen Gelenkknorpel-Segmenten. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Kollagen I war im Knochen in allen Proben ohne Änderung des Verteilungsmusters nachweisbar. *=Knorpel, **=Knochen, Pfeilspitze=Grenzlamelle.

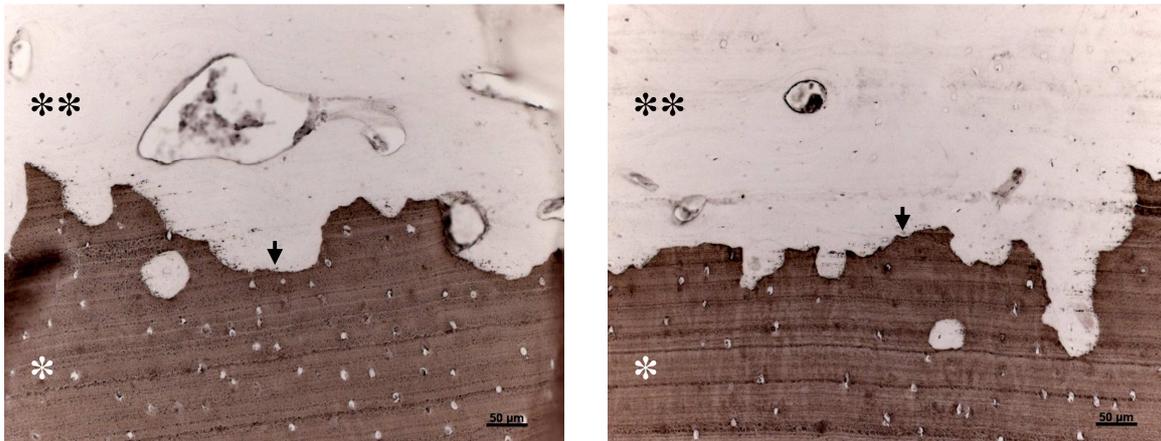


Abb 69: Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen II in osteochondralen Gelenkknorpel-Segmenten. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Kollagen II war im hyalinen Knorpel deutlich in allen Proben ohne Änderung des Verteilungsmusters nachweisbar. *=Knorpel, **=Knochen, Pfeilspitze=Grenzlamelle.

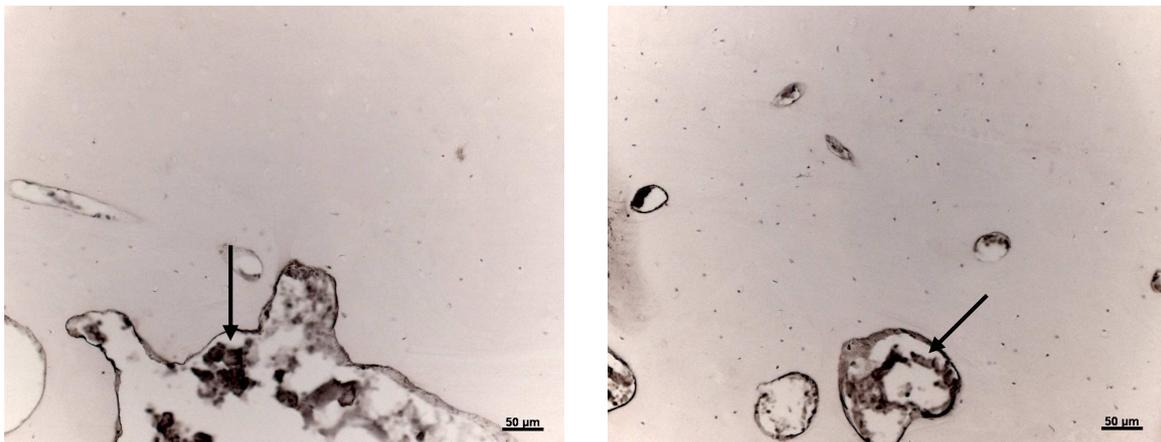


Abb 70: Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen III in osteochondralen Gelenkknorpel-Segmenten. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Kollagen III war in allen Proben im Knochen, speziell im endostalen Bereich (Pfeile) und im Mrakraum nachweisbar.

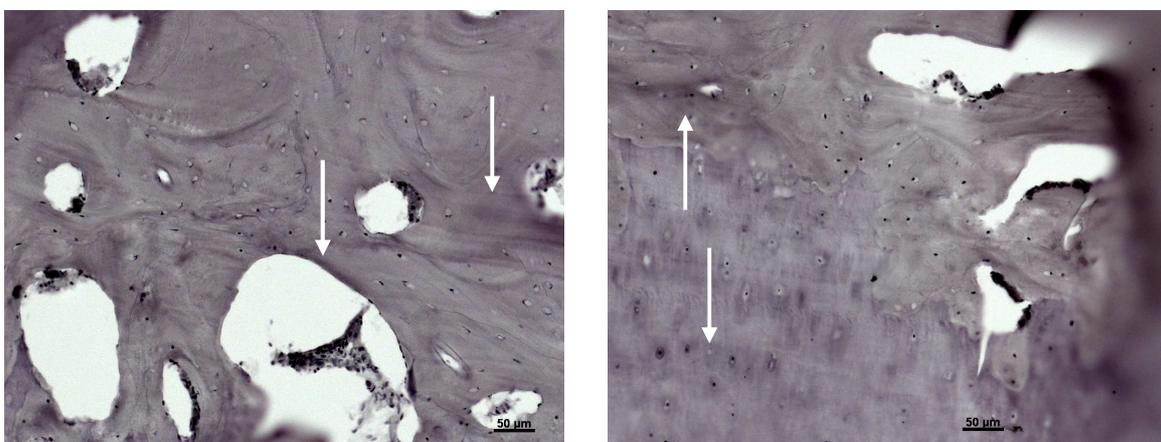


Abb 71: Immunhistochemische Anfärbung von Versican in osteochondralen Gelenkknorpel-Segmenten. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Versican ließ sich im Knochen in in allen Proben ohne Veränderung des Verteilungsmusters diffus nachweisen (Pfeile).

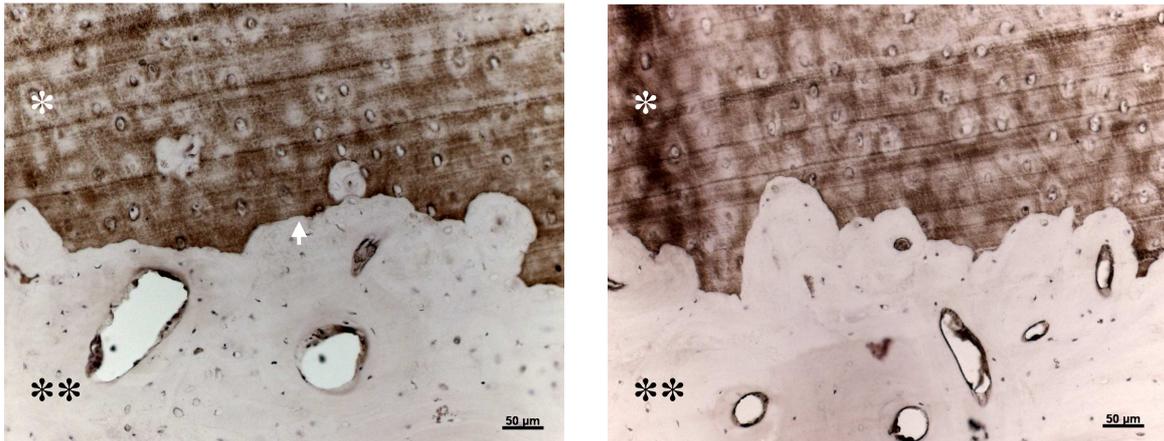


Abb 72: Immunhistochemische Anfärbung von Link Protein in osteochondralen Gelenkknorpel-Segmenten. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). In allen Proben zeigte sich im Knorpel ein deutliches, diffus-fleckiges Signal ohne Veränderung im Verteilungsmuster. *=Knorpel, **=Knochen, Pfeilspitze=

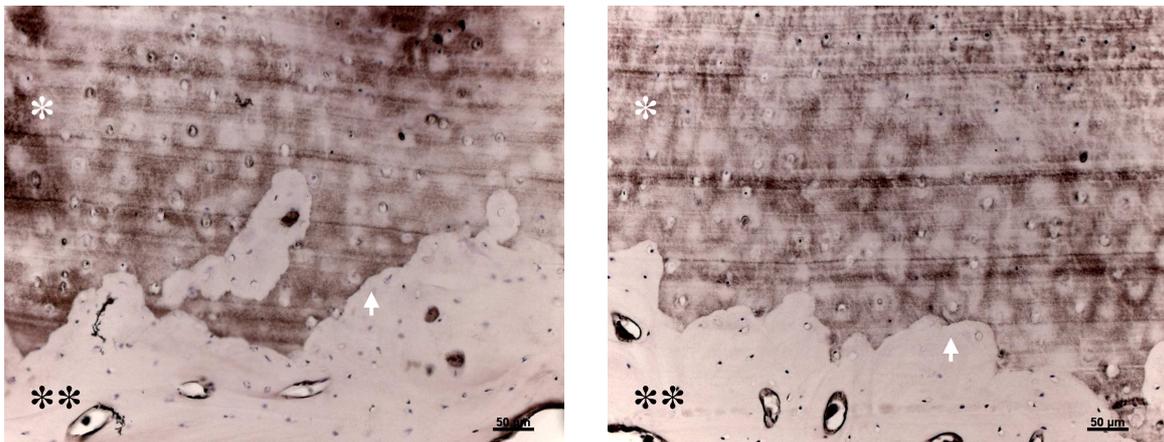


Abb 73: Immunhistochemische Anfärbung von Aggrecan in osteochondralen Gelenkknorpel-Segmenten. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Aggrecan war in allen Proben im Knorpel deutlich, diffus-fleckig anfärbbar. Es zeigte sich keine Veränderung im Verteilungsmuster. *=Knorpel, **=Knochen. Pfeilspitze=Grenzlamelle.

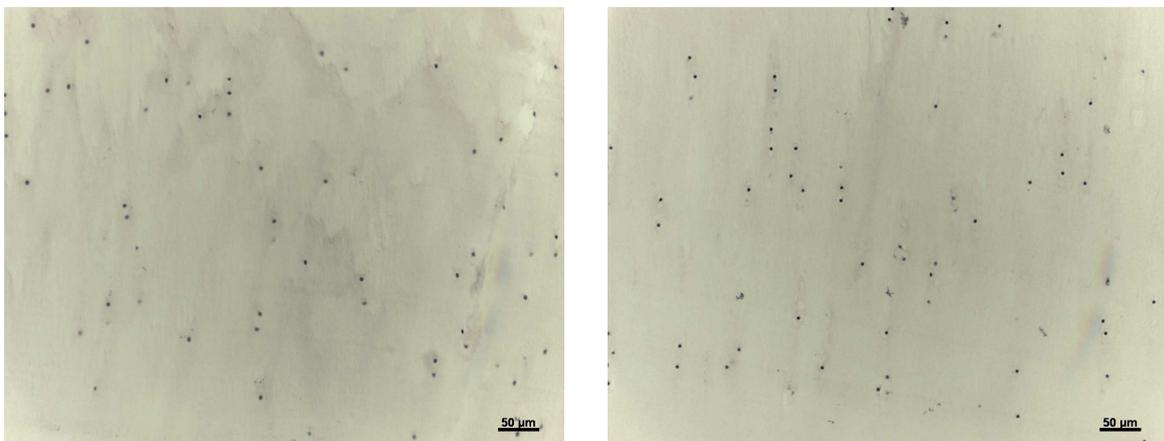


Abb 74: „Kontrollfärbung“ (mit PBS) von hyalinem Knorpel. Links Kontrollprobe (0 MPa), rechts nach HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C). Es zeigte sich kein spezifisches Signal, was die Spezifität der vorangegangenen Färbungen bewies.

4. Diskussion

Die Rekonstruktion von tumorbefallenen osteochondralen Segmenten des Stützapparates stellt eine zentrale Herausforderung in der orthopädischen Chirurgie dar. Hierzu haben sich unter anderem die Methoden der Autoklavierung und der Bestrahlung des betroffenen Segmentes mit anschließender autologer Reimplantation etabliert. Vorteile dieser autologen Rekonstruktion sind die „passgenaue“ Wiederherstellung des betroffenen Skelettabschnitts, das Entfallen eines Infektionsrisikos und eine schnellere Graft-Einheilung, da er aus körpereigenem Gewebe besteht [Böhm et al., 2003: 363]. Durch beide genannten Verfahren können tumorbefallene Knochensegmente devitalisiert werden, um eine konsekutive Reimplantation zu ermöglichen. Beide Methoden beinhalten jedoch gravierende Nachteile und Komplikationen, wie den Verlust biomechanischer Stabilität und Veränderungen biologischer Eigenschaften [Knaepler et al., 1991: 194-199; Knaepler et al., 1994: 44-49; Sugimoto et al., 1991: 492-497; Zoricic et al., 2002: 121-128]. Die Entwicklung alternativer Verfahren ist auf Grund dieser zum Teil deutlichen Komplikationen notwendig. In der Lebensmittelindustrie wird seit längerem hydrostatischer Hochdruck (HHD) zur Haltbarmachung verschiedener Nahrungsmittel eingesetzt, um Keime unter Erhalt von Geschmack und Vitaminen abzutöten [Cheftel et al., 1997: 212-230; Gould, 2001: 464-470; Hoover et al., 1989: 100-104]. Dieses Verfahren wurde bis jetzt noch nicht in der orthopädischen Chirurgie eingesetzt, um Tumorzellen ex vivo zu inaktivieren und das betroffene Segment zu reimplantieren. Bisher liegen keine Ergebnisse zu der Auswirkung von HHD auf Zellvitalität und Apoptose-Induktion bei Chondrozyten und Chondrosarkomzellen vor. Ebenfalls sind die Effekte einer HHD-Behandlung auf die biomechanischen und biologischen Eigenschaften von Knorpelgewebe unbekannt.

4.1 Allgemeine Wirkungsweise von hydrostatischem Hochdruck

Das grundsätzliche Verhalten von biologischen Systemen unter Hochdruck erfolgt nach dem Le Chatelier'schen Prinzip: Druck fördert Prozesse, die von negativen Volumenänderungen begleitet sind und inhibiert umgekehrt Prozesse, die mit einer Volumenzunahme einhergehen [Masson et al., 2001: 85]. Kovalente Bindungen werden nicht von Hochdruck angegriffen, auch Wasserstoffbrückenbindungen sind nahezu druckresistent [Masson et al., 2001: 85]. Unter den nicht-kovalenten Bindungen beeinflusst hydrostatischer Hochdruck die hydro-

phoben Wechselwirkungen, auch ionische Bindungen werden gespalten [Masson et al., 2001: 85]. Diese Angriffspunkte erklären die Druckempfindlichkeit von Proteinen, da die von Hochdruck angegriffenen Bindungs-Typen für die Quartär- und Tertiärstruktur von Proteinen verantwortlich sind [Mozhaev et al., 1996: 81; Gross et al., 1994: 617-630]. Abhängig von Druckhöhe [Ohmori et al. 1992: 1285], Druckdauer [Horgan et al., 1983: 65], Temperatur [Casadei et al., 2002: 5970; Cheftel 1995: 75-90] und chemischen Umgebungsbedingungen [Weemaes et al., 1998: 2785] werden durch Druckeinwirkung der Reihe nach die Quartär-, Tertiär- und letztendlich auch die Sekundärstruktur betroffen [Meyer-Pitroff 2003: 296], sowie Enzymaktivität und Enzymspezifität moduliert [Horgan et al., 1983: 65; Masson et al., 2001: 85; Ohmori et al. 1992: 1285].

Die Anwesenheit von Wasser bzw. flüssigen Medien ist ausgesprochen wichtig für die Wirkung von Hochdruck. Zum einen penetrieren Wassermoleküle verstärkt in polar-apolare Zwischenräume und zwischen geladene Gruppen. Durch diese Hydratation erweitern sich die Abstände zwischen apolaren Gruppen und die Oberfläche von Makromolekülen wird größer. Zum anderen bewirkt Hochdruck eine Strukturierung von Wassermolekülen, was zu deren Verdichtung führt [Mentré et al., 2001: 21-23]. In höheren Druckbereichen beginnen Proteine zu denaturieren. Sie ändern unter Druckeinwirkung ihren Zustand von der nativen globulären Form zu einer geschmolzen globulären Form und schließlich zu einer entfalteten, sogenannten „coil“-Form [Mentré et al., 2001: 23]. Ohne Anwesenheit eines flüssigen Umgebungsmediums sind Proteine jedoch enorm druckresistent, so dass sogar ein Druck von 1 GPa keine Strukturalterationen hervorruft [Mentré et al., 2001: 3]. Eine wichtige Rolle scheint dabei die Geschwindigkeit des Druckaufbaus zu spielen. Wong et al. (1988) beobachteten das die Denaturierung von Chymotrypsinogen bei raschem Druckaufbau bei 370 MPa einsetzte und bei 760 MPa abgeschlossen war. Bei langsamen Druckaufbau begann sie hingegen erst bei 550 MPa und war bei 880 MPa vollständig abgeschlossen [Wong et al., 1988: 1]. In den vorliegenden Versuchen wurde die Geschwindigkeit von Druckauf- und -abbau stets konstant gehalten, so dass sich hier keine Differenzen für die beiden untersuchten Zelllinien ergaben.

Durch die Anwendung in der Lebensmittelindustrie sind die Auswirkungen von HHD auf Abtötung und Wachstumshemmung von Bakterien, Sporen und Viren weitreichend untersucht worden. Zur Nahrungsmittelprozessierung werden normalerweise hydrostatische Drücke von 300-700 MPa eingesetzt [O'Reilly et al., 2000: 4890]. Mikroorganismen werden durch verschiedene Prozesse wie Membranveränderungen, Enzymmodulation und Transkriptions-

inhibition inaktiviert [Abe et al., 1999: 447-453]. Angriffspunkte sind äußere und innere Membranen, Enzyme und das Zytoskelett [Casadei et al., 2002: 5965]. Membranschäden spielen hierbei eine bedeutende Rolle. Der Verlust der physikalischen Integrität durch Hochdruckeinwirkung kann z. B. durch Aufnahme von Trypanblau oder dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid nachgewiesen werden, welche eine intakte Zellmembran nicht permeieren können [Pagán et al., 2000: 2830-2831]. Prinzipiell werden bei eukaryotischen Zellen die gleichen Bestandteile durch hydrostatischen Hochdruck angegriffen wie bei Prokaryoten. Auch wurde die Synthese stressspezifischer Proteine wie Hsp 70, Hsp 90 und TGF- β unter subletalem Hochdruckeinfluss beobachtet [Elo et al., 2000: 617; Kaarniranta et al., 1998: 2323; Takahashi et al., 1997: 150].

4.2 Vitalität und Morphologie humaner Chondrozyten und Chondrosarkomzellen nach Hochdruckbehandlung

Die Grundvoraussetzung für eine mögliche Anwendung von HHD in der orthopädischen Chirurgie ist die sicher zu erzielende Abtötung aller malignen Zellen durch eine entsprechende Hochdruckbehandlung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass humane Chondrozyten und Chondrosarkomzellen (SW1353) durch HHD bis 350 MPa (10 min, 37 °C) sicher inaktiviert werden konnten. Hierbei konnten Unterschiede zwischen beiden Zellreihen in der Resistenz gegenüber Hochdruck beobachtet werden. Ebenfalls waren Differenzen zwischen Zellen in Suspension und adhärennten Zellen aufzeigbar. Humane Chondrozyten in Suspension wurden ab einem hydrostatischen Druck von 225 MPa (10 min bei 37 °C) abgetötet, die 50 %-Überlebensrate lag bei 154,75 +/- 4,5 MPa. In Suspension befindliche humane Chondrosarkomzellen (SW1353) bedurften eines höheren Druckes von 350 MPa (10 min bei 37 °C) um sicher inaktiviert zu werden, wobei die 50 %-Überlebensrate nur unwesentlich höher bei 159 +/- 3,84 MPa lag.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Diehl et al. (2003) bei der Hochdruckbehandlung (10 min bei 37 °C) von Fibroblasten, Osteoblasten, Osteosarkom- (SAOS-2), Leukämie- (U-937) und Ovarialkarzinomzellen (OV-MZ-6). Die 50 %-Überlebensraten der malignen Zellen lagen bei 170-193 MPa und damit etwa 20 % oberhalb derer der Chondrosarkomzellen. Bei den beiden benignen Zelllinien lagen die Werte mit 130-145 MPa leicht unter der Rate der Chondrozyten. Die malignen Zelllinien wurden vollständig zwischen 250 und 350 MPa, die Fibro- und Osteoblasten bei etwa 25 % geringerem Druck inaktiviert [Diehl et al., 2003: 1852-1853].

Takano et al. (1997) behandelten Lymphoblasten für 30 min (37 °C) mit Drücken bis 250 MPa. Oberhalb von 250 MPa waren alle Zellen tot. Die 50 %-Überlebensrate lag in einem ähnlichen Druckbereich, wie er in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde [Takano et al., 1997: 155-156]. Yamaguchi und Mitarbeiter (1997) untersuchten die Auswirkungen von HHD (30 min, 37 °C) auf Ehrlich Aszites Tumorzellen. Vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen kam es bis nach 100 MPa zu keinem Effekt, oberhalb von 130 MPa nahm die Zahl toter Zellen allerdings signifikant zu. Nach der Implantation derart behandelter Tumorzellen in Mäuse, kam es nach einer Behandlung bei über 130 MPa zu keiner weiteren Proliferation des Tumors [Yamaguchi et al., 1997: 258-260]. Ebenfalls wurde für MEL Zellen (murine erythroleukemia cells) eine Hemmung der Proliferation im Bereich von 80-110 MPa nachgewiesen [Matsumoto et al., 1998: 87]. Goldman et al. (2000) eliminierten Lungenmetastasen erfolgreich durch eine Hochdruckbehandlung bei 120 MPa (15 min). Sie kombinierten die Inkubation allerdings mit einer Zugabe von *N*-Acetyl-L-Cystein, so dass hieraus keine direkt vergleichbaren Ergebnisse resultieren [Goldman et al., 2000: 351-354].

Tumorzellen sind resistenter gegenüber einer Hochdruckinaktivierung als benigne Zellen, wie verschiedene Arbeiten gezeigt haben [Diehl et al., 2003: 1852-1854; Diehl et al., 2004: 370-372; Dibb et al., 1981: 169-173]. Diese Beobachtungen wurden anhand der vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Interessanterweise lag die Zahl vitaler Chondrozyten bis zu einem Druck von 125 MPa oberhalb der vitaler Chondrosarkomzellen. Erst ab Drücken über 150 MPa zeigten sich mehr lebende maligne Zellen. Hierbei schienen lediglich wenige resistente Zellen Drücke von bis zu 350 MPa zu überstehen, über 96 % der Chondrosarkomzellen waren bei 250 MPa bereits tot.

Sowohl Chondrozyten als auch Chondrosarkomzellen, die auf mit Fibronectin beschichtete 96-Wells ausgesät und in adhärentem Zustand der Hochdruckbehandlung zugeführt wurden, zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der HHD-Inkubation. Beide Zelllinien wurden bei 200 MPa (10 min, 37 °C) sicher inaktiviert. Die 50 %-Überlebensraten zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Chondrozyten und Chondrosarkomzellen (121,25 +/- 7,7 Mpa bzw. 122,5 +/- 5,2 MPa). Fibronectin (FN) diente in den vorliegenden Versuchen zur Imitation der *in vivo* Extrazellulärmatrix von Knorpelgewebe. FN ist ein Bindeprotein, welches Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, sowie Matrix-Matrix-Interaktionen vermittelt [Loeser, 2000: 109; White et al., 2003: 251]. Der FN-Rezeptor ist das in Chondrozyten am stärksten exprimierte Integrin [Enomoto et al., 1993: 276; Loeser, 2002:

119; van der Kraan et al., 2002: 631-632]. *In vivo* ist FN für die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen notwendig und an der Formation von Knochengewebe beteiligt, wie verschiedene Arbeiten aufgezeigt haben [Garcia et al., 1998: 48-49; Weiss et al., 1980: 2074 und 1981: 634-636]. Mit FN beschichtete Kulturgefäße zeigten eine beschleunigte und verbesserte Adhäsion von Chondrozyten [Bhati et al., 2001: 79-81; Imoto et al., 2002: 41-43]. Die Beobachtung, dass adhärenente Zellen vulnerabler auf Hochdruck reagieren als Zellen in Suspension machten auch Diehl und Mitarbeiter (2004). Sie untersuchten den Einfluss von HHD (10 min, 37 °C) auf Ovarialkarzinom-, Fibrosarkom-, Osteosarkom-, und Mammakarzinomzellen. Ab Drücken von 250 MPa zeigten sich keine vitalen adhärenenten Zellen mehr. Hingegen benötigten die gleichen Zelllinien Drücke oberhalb von 350 MPa zur Inaktivierung, wenn sie in Suspension behandelt wurden. Die 50 %-Überlebensraten lagen mit 94-105 MPa für die verschiedenen adhärenenten Zelllinien unterhalb der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Rate von etwa 122 MPa [Diehl et al., 2004: 370-372]. Die Beobachtung, dass die physiologische Zelladhärenz die Hochdruckwirkung nicht reduziert, sondern sogar die Empfindlichkeit gegenüber Hochdruck steigert, ist bedeutsam für die Inaktivierung von Tumoren in Knorpelgewebe. *In vivo* sind die meisten Tumorzellen in die Knorpelmatrix eingebettet und liegen nicht in Suspension vor. Lediglich maligne Zellen, die den Tumorzellverband verlassen haben sind in nicht adhärenentem Zustand erreichbar.

Neben verschiedensten Ursachen für die letale Wirkung von HHD auf Zellen bedingt möglicherweise eine früh einsetzende Schädigung des stark ausgebildeten Zytoskeletts adhärenenter Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zu Zellen in Suspension. Die Struktur des Zytoskeletts scheint als erstes von Druck betroffen zu sein, wobei bereits relativ moderate Drücke von 20 bis 40 MPa eine Desorganisation seiner Komponenten bewirken [Mentré et al., 2001: 49-50]. Bereits in den 30er Jahren wurde beobachtet, dass Zellen, die reich an zytoskelettalen Elementen sind, sehr empfindlich gegenüber Hochdruck sind [Brown 1934: 335]. Neben der Oberflächenadhäsion bilden Chondrozyten und Chondrosarkomzellen im Monolayer Zellausläufer und Zell-Zell-Kontakte aus. Hierdurch ist auch eine im Verhältnis zu runden Zellen in Suspension größere Oberfläche adhärenenter Zellen bedingt, die eine größere Angriffsfläche für Druckwirkungen bietet. Auch haben an den Untergrund adhärenente Zellen keinen „Platz zum ausweichen“, wodurch eine eventuell durch Scherbewegungen bedingte, frühere Zerstörung der Zellmembran induziert werden könnte. Das für die hier gefundenen Unterschiede die Expression von Hitzeschockproteinen eine frühe Schädigung des Zytoskeletts bewirkt hat, ist auf Grund der zu kurzen Druckaufbau-Zeit unwahrscheinlich.

Hitzeschockproteine spielen als molekulare Chaperone eine wichtige Rolle im Erhalt der Integrität zytoskelettaler Strukturen [Hartl et al., 1992: 293; Liang et al., 1997: 1431].

Die Wirkung von HHD auf biologische Membranen ist ein weiterer Faktor, der zu einem Vitalitätsverlust von Zellen führt. Die drucksensibelsten Membranen scheinen die des Endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns zu sein. [Mentré et al., 1999: 356]. Eine bedeutende Rolle kommt dabei dem Verlust der Membranfluidität zu [Meyer-Pitroff 2003: 296]. Phospholipid-Bilayers ändern unter steigendem Druck ihren Zustand von flüssig-kristallin hin zu gelartig, verbunden mit einer dichteren Anordnung der Fettsäureketten [MacDonald 1984: 47; Mentré et al., 2001: 35]. Die gleichen Vorgänge lassen sich bei herabgesetzten Temperaturen beobachten [Mentré et al., 1999: 356-357]. Ursache dieser Veränderung ist die zunehmende Hydratation der Kopfgruppen und der polar-apolaren Zwischenräume [Bernsdorff et al., 1997: 1264]. Wie bereits erwähnt erleichtert hydrostatischer Hochdruck die Penetration von Wassermolekülen zwischen interagierende ionische oder hydrophobe Domänen, wo sie sich in eine strukturiertere Form, die dichter als die des „normalen“ Wassers ist, organisieren. Die Zustandsänderung von flüssig-kristallin hin zu gelartig führt dabei zu Undichtigkeiten in der Membran, wie Smelt et al. (1998) und Perrier-Cornet et al. (1999) durch einen Verlust von intrazellulären Natrium-, Kalium- und Calciumionen aufzeigten [Perrier-Cornet et al., 1999: 1-4; Smelt et al., 1998: 152]. Auch die Beobachtung, dass Stresssituationen die Bildung von Desaturase induzieren, einem Enzym, welches die Membranfluidität erhöht, belegen die Rolle der Membranfluidität bei der Wirkungsweise von HHD [Vigh et al., 1993: 9090].

Eine Schlüsselfunktion unter dem Aspekt der Membranschädigung kommt dem Cholesterol, natürlicher Membranbestandteil, zu. Es reduziert möglicherweise die Freiheit der Kopfgruppen und reguliert so die Membranfluidität, was wiederum zu einer erhöhten Druckresistenz führt [Bernsdorff et al., 1997: 1264]. Reis et al. (1996) kamen nach ihren Experimenten zu dem Schluss, dass Cholesterol eine wichtige Rolle darin spielt, Membranen gegen Änderungen der Umgebungseinflüsse, wie gegen hydrostatischen Hochdruck, unempfindlicher zu machen [Reis et al., 1996: 5]. Auch Beney et al. (1997) konnten in ihren Versuchen nachweisen, dass ein höherer Cholesterol-Anteil zu steigender Druckresistenz von Membranen führt [Beney et al., 1997: 1258]. Auch werden Membranen mit höheren Anteilen gesättigter Fettsäuren geringer durch Hochdruck angegriffen, so dass gesättigten Fettsäuren ein ähnlicher Effekt wie dem Cholesterol zugeschrieben werden kann [Mentré et al., 1999:

358]. Eine weitere Rolle spielt die Verteilung und Art von Doppelbindungen innerhalb der Fettsäureketten. Bernsdorff et al. (1997) zeigten, dass Doppelbindungen Wassermoleküle daran hindern, in den beweglichen Anteil der Ketten zu penetrieren [Bernsdorff et al., 1997: 1264]. Die Sensibilität von Membranen gegenüber Druck steigt dabei, je weiter die Doppelbindungen von der Oberfläche entfernt sind. Ein erhöhter Anteil von *cis*-Doppelbindungen gegenüber *trans*-Bindungen steigert hingegen die Druckresistenz [Kaneshina et al., 1998: 1-6]. Eine weitere Ursache für die Zerstörung der Zellmembran könnte die rasche Expansion von Gasen während der Dekompression sein, die unter Hochdruck eine größere intrazelluläre Löslichkeit besitzen, was von Park et al. (2002) für Helium beschrieben wurde [Park et al., 2002: 1462]. Ähnliche Beobachtungen machten Enomoto und Mitarbeiter (1997) bezüglich CO₂ und N₂O, deren Expansion bei rapider Dekompression von 40 atm einen Zelltod verursachte [Enomoto et al., 1997: 1133].

Für die Unterschiede in der Druckresistenz von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen, wie auch von anderen benignen und malignen Zelllinien, könnte somit eine ungleiche Membranzusammensetzung im Hinblick auf Cholesterol, Fettsäuren, Doppelbindungen und Proteinausstattung verantwortlich sein. Auch der Anteil intrazellulär gelöster Gase könnte zwischen den Zelllinien differieren.

Der Verlust von mit der Zellmembran assoziierten Funktionen besitzt ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Inaktivierung von Mikroorganismen oder Zellen [Ulmer et al., 2002: 1088; Wouters et al., 1998: 509]. In den meisten biologischen Systemen wird ein pH-Abfall während einer Hochdruckinkubation beobachtet. Molina-Gutierrez et al. (2002) machten hierfür neben einer beschleunigten Dissoziation schwacher organischer Säuren und einer erhöhten Membranpermeabilität die Inaktivierung von pH-Homöostase regulierenden Enzymen verantwortlich [Molina-Gutierrez et al., 2002: 4399]. Verschiedene Arbeiten zeigten eine erhöhte Sensibilität von Bakterien gegenüber Druck mit sinkendem pH des Suspensionsmediums [Alpa et al., 2000: 33; Garcia-Graells et al., 1998: 1566; Molina-Gutierrez et al., 2002: 4401-4403]. So könnte auch die Abtötung von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen durch eine Inaktivierung der pH-Homöostase durch HHD beschleunigt worden sein.

Die morphologischen Beobachtungen an Chondrozyten und Chondrosarkomzellen zeigten bei den nach der HHD-Behandlung für 24 h rekultivierten Zellen einen druckabhängigen Verlust

ausgebildeter Zellausläufer und der Adhärenz, bis sich bei 200 MPa schließlich alle Zellen abgerundet darstellten. Das gleiche Phänomen des „rounding“ der Zellen konnte auch bei den adhärennten Zellen direkt nach der Hochdruckinkubation beobachtet werden. Das „rounding“ und die Retraktion der Zellausläufer, zwei auch von anderen Autoren beobachtete Phänomene der HHD-Behandlung [Bourns et al., 1988: 380; Crenshaw et al., 1996: 285; Crenshaw et al., 1996: 277; Parkkinen et al., 1995: 495; Wilson Jr. et al., 2001: 652-655], begannen bei den adhärennten Chondrozyten bereits nach 50 MPa, bei den adhärennten Chondrosarkomzellen nach 100 MPa. In beiden Zellreihen verstärkten sich diese Effekte mit steigenden Drücken, bis nach 200 MPa alle Zellen vollständig abgerundet waren. In der konfokalen Lasermikroskopie zeigten sich ab 150 MPa desintegrierte subzelluläre Bestandteile und zerstörte Membranen, wie sie auch zuvor beschrieben wurden [Diehl et al., 2004: 371-372].

Für diese bei Chondrozyten und Chondrosarkomzellen beobachtete Änderung der morphologischen Zellgestalt ist eine Schädigung des Zytoskeletts die Grundlage. Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von HHD (4000 und 8000 psi (ca. 27,8 und 55,6 MPa), 20 min) auf das Zytoskelett von PC-12 Phäochromozytomzellen. Dabei zeigte sich ein mit steigendem Druck zunehmendes „rounding“, eine zunehmende Retraktion der Zellausläufer, sowie die Abnahme und weitgehende Zerstörung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten [Wilson Jr. et al., 2001: 652-655]. Die Retraktion von Zellausläufern, welche bei Chondrozyten von Parkkinen et al. (1995) beschrieben wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden [Parkkinen et al., 1995: 495]. Die in der konfokalen Lasermikroskopie belegte Größenzunahme von Chondrosarkomzellen, die bei 150 MPa behandelt wurden, bestätigt vorangegangene Beobachtungen [Wilson Jr. et al., 2001: 655]. Möglicherweise ist auch hierfür eine Zerstörung des Zytoskeletts verantwortlich. Ein „rounding“ von Zellen geht mit einem zunehmenden Vitalitätsverlust einher [Dibb et al., 1981: 169-173]. Maligne Zellen sind dabei resistenter gegenüber eines „rounding“ (ab 110 MPa) als benigne Zellen (ab 70 MPa) [Dibb et al., 1981: 169-173]. In den vorliegenden Untersuchungen bei primär adhärennten Zellen war die zunehmende Retraktion der Zellausläufer und das Abrunden mit steigenden Drücken ebenfalls früher und ausgeprägter bei Chondrozyten als bei Chondrosarkomzellen zu beobachten. Auch waren die morphologischen Veränderungen mit einem steigenden Anteil avitaler Zellen verbunden, wie im Trypanblautest nachgewiesen. Allerdings zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Zelllinien in dem zur vollständigen Inaktivierung benötigten Druckniveau.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse des Trypanblau-Tests. So konnte ein mit der Aufnahme von Propidiumiodid (PI) verbundener Zelltod von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen im FACS nach HHD-Behandlung (10 min bei 37 °C) nachgewiesen werden, wobei die exakten Zahlen vergleichbar mit den Ergebnissen des Trypanblau-Tests waren. Interessanterweise zeigte sich in der grafischen Auswertung bei Chondrozyten und auch bei Chondrosarkomzellen eine zweite Zellpopulation nach 150 und 200 MPa, die ein doppelt so hohes PI-Signal aufwies. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass manche Zellen im Zellzyklus ruhen und einen diploiden DNA-Satz aufweisen und manche sich in Teilung befinden, damit einen tetraploiden DNA-Satz besitzen. Da PI mit DNA-Doppelsträngen interkaliert, erklären sich die zwei Populationen, wobei die tetraploiden Zellen eine doppelt so hohe PI-Intensität aufweisen. Die tetraploide Population der Chondrosarkomzellen ist größer als die der Chondrozyten, was durch die deutlich höhere Teilungsrates bedingt ist. Darüber hinaus besitzen Tumorzellen einen aneuploiden DNA-Satz.

Eine signifikante Apoptose-Induktion durch HHD, wie sie für verschiedene eukaryotische Zellen und für humane Lymphoblasten beschrieben wurde [Frey et al., 2004: 459; Takano et al., 1997: 155-158], konnte in der vorliegenden Arbeit für Chondrozyten und Chondrosarkomzellen anhand der Bestimmung von Annexin V nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist durch die Messung 24 h nach der HHD-Behandlung ein Teil apoptotischer Zellen der Detektion entgangen, da sie innerhalb dieser Zeit von Apoptose in Nekrose übergegangen sind. Die Frühphase der Apoptose dauert nur wenige Minuten, allerdings sind Apoptosekörper und damit apoptotische Zellen noch nach Stunden nachzuweisen [Roach et al., 2004: 266]. Die meisten apoptotischen Zellen werden *in vivo* phagozytiert. Findet keine Phagozytose statt, so sind apoptotische Zellen prolongiert nachweisbar, unterliegen dann jedoch einer sekundären Nekrose, bei der die Integrität der Zellmembran verloren geht und die Zelle lysiert [Roach et al., 2004: 266-267]. Diese sekundäre Nekrose der Zelle könnte es somit erlauben, dass Propidiumiodid in die zerstörte Zelle eindringt und in der durchflusszytometrischen Messung ein Doppelsignal (AN und PI) auslöst. Damit würde die primär apoptotische Zelle den nekrotischen Zellen zugeordnet werden. Allerdings zeigten verschiedene Arbeiten das Maximum einer induzierten Apoptose erst nach 24 h, weshalb auch in den vorliegenden Untersuchungen die Messung nach 24 h erfolgte. Takano et al. (1997) beschrieben einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate in Lymphoblasten nach 8 h, wenn die Zellen bei 100 MPa behandelt wurden (30 min, 37 °C). Die höchste Apoptoserate von bis zu 40 % wurde dabei nach 24 h festgestellt [Takano et al., 1997: 156-158]. In den

vorliegenden Ergebnissen lag die höchste Rate apoptotischer Zellen für Chondrozyten bei 5,7 % (150 MPa, 10 min, 37 °C) und für Chondrosarkomzellen bei 13,1 % (200 MPa, 10 min, 37 °C), bei welchen bereits in unbehandelten Proben über 5 % der Zellen apoptotisch waren. Möglicherweise wird eine längere Druckbehandlungszeit als 10 min benötigt, um in Chondrozyten und Chondrosarkomzellen eine signifikante Apoptose zu induzieren. Verschiedene Arbeiten wiesen eine vermehrte Expression von proapoptotischen Faktoren wie TNF- α und Interleukinen (IL) bei bereits 20 oder 50 MPa nach [Takahashi et al., 1998: 231; Westacott et al., 2002: 125]. TNF- α und IL-1 können eine Apoptose in Chondrozyten hervorrufen [Aizawa et al., 2001: 785; Chen et al., 2000: 364; Schuerwegh et al., 2003: 681]. Allerdings betrug bei diesen Versuchen die Behandlungsdauer 2 h und mehr. So scheint weniger die Druckhöhe allein, die bei überschreiten eines Grenzwertes die Zelle direkt zerstört, als mehr die Dauer der Druckbehandlung apoptotische Signale in Zellen auszulösen.

Insgesamt zeigten humane Chondrozyten und Chondrosarkomzellen ein ähnliches Verhalten in Hinblick auf die Vitalität nach einer Hochdruckinkubation. Lediglich das absolute Inaktivierungsniveau von Chondrosarkomzellen in Suspension lag mit 350 MPa deutlich über dem Chondrozyten (225 MPa), wobei dies hauptsächlich auf einzelne druckresistente Tumorzellen zurückzuführen war. Innerhalb der Transformation von benignen zu malignen Zellen könnten Änderungen in der Enzymausstattung oder des Zytoskeletts erfolgt sein, die eine erhöhte Druckresistenz einzelner Tumorzellen bewirken. *In vivo* sind Knorpelzellen adhärente Zellen. Im Rahmen der malignen Transformation erlangen Tumorzellen die Fähigkeit, einen Zell- bzw. Gewebeverband zu verlassen und sind generell weniger adhäsiv [Ruoslahti 1999: 1], was zu der erhöhten Druckresistenz von Chondrosarkomzellen in Suspension führen könnte. In den Versuchen mit adhären Zellen, in denen die Inaktivierungsniveaus von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen identisch waren, wurden vor der HHD-Behandlung durch einen Waschschrift nicht adhärente Zellen entfernt. So könnten Tumorzellen, die sich eventuell der normalen Adhärenz entzogen haben und damit möglicherweise druckresistenter wären, in der Auswertung nicht mit einbezogen worden sein.

Ob die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Auswirkungen einer HHD-Behandlung auf Chondrozyten und Chondrosarkomzellen bis zu einem bestimmten Druckniveau reversibel sind, wie bei Hochdruck-Untersuchungen für MEL Zellen aufgezeigt, bleibt in weiteren Versuchen zu klären. [Matsumoto et al., 1998: 87; Mentré et al., 1999: 354-360].

4.3 Knorpelgewebe: Funktionen, biochemische und biomechanische Grundlagen von Gelenkknorpel und Meniskus

Neben der sicheren Inaktivierung von malignen Zellen, die auch durch Autoklavieren oder Bestrahlen erreichbar ist, wäre ein Erhalt der biologischen und biomechanischen Eigenschaften des behandelten Gewebes wünschenswert. Hierdurch wäre im Rahmen einer autologen Skelettrekonstruktion eine grössere initiale Stabilität und eine beschleunigte Inkorporation des Grafts zu erreichen. Durch die beiden o. g. Verfahren kann der Erhalt der Biologie und der Biomechanik jedoch nicht gewährleistet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch HHD nicht nur Chondrosarkomzellen abgetötet werden, sondern auch, dass die biomechanischen und biologischen Eigenschaften von Gelenkknorpel (osteocondrale Zylinder) und von Faserknorpel (Meniskus-Segmente) erhalten bleiben. Bevor diese Resultate diskutiert werden, soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die biologischen und biomechanischen Grundlagen von Gelenkknorpel und von Meniskusknorpel gegeben werden.

Es gibt drei Hauptarten von Knorpelgewebe: hyalinen Knorpel, elastischen Knorpel und Faserknorpel. Hyaliner Knorpel ist die häufigste Knorpelart und findet sich an Gelenkflächen, in Epiphysenfugen, sowie in der Trachea, an Rippenenden und am Nasenseptum [Junqueira et al., 1996: 181; Mow 1997: 114]. Faserknorpel findet sich ausser im Meniskus im Anulus fibrosus der Disci intervertebrales und in der Symphysis pubica [Junqueira et al., 1996: 188; Mow 1997: 114]. Elastischer Knorpel kommt in der Ohrmuschel, im äußeren Gehörgang, in der Tuba auditiva, in der Epiglottis und in einigen Kehlkopfknorpeln vor [Junqueira et al., 1996: 187].

Gelenkknorpel ist auf hohe Druck- und Stossbelastungen ausgerichtet, wobei die auftretenden Kräfte gleichmäßig auf den angrenzenden Knochen übergeleitet und Kontaktkräfte im Gelenk reduziert werden. Dabei erlaubt Gelenkknorpel durch seine glatte Oberfläche eine nahezu abriebfreie Bewegung der gegenüberliegenden Flächen zueinander [Mow 1997: 113-116]. Der Meniskus besitzt wichtige biomechanische Funktionen im Kniegelenk. Er überträgt Kraft auf eine größere Fläche des Gelenkknorpels, stabilisiert das Gelenk, absorbiert Stöße während dynamischer Krafteinwirkung, ähnlich wie ein „Bremsklotz“ und hilft möglicherweise bei der Gelenklubrikation. Diese Funktionen ermöglichen dem Gelenkknorpel die glatte, nahezu

abriebfreie Artikulation und die gleichmäßige Kraftverteilung auf den angrenzenden subchondralen Knochen. Zusätzlich gewährleistet der Meniskus eine Reststabilität bei Kreuz- oder Seitenband-Insuffizienzen [Bessette 1992: 35-37; Fithian et al., 1990: 19].

Beide Knorpelarten können als multiphasisches Material betrachtet werden, wobei die beiden Hauptkomponenten eine fluide Phase aus Wasser (70 %) und Elektrolyten, und eine solide Phase (Matrix) aus Kollagenen (20 %), Proteoglykanen (8 %) und anderen Proteinen sind. Eingelagert befinden sich Chondrozyten (2 %) [Mow et al., 1984: 377-385; Mow et al., 1992: 67-86]. Die quantitativ größte organische Fraktion bilden die Kollagene, gefolgt vom Proteoglykan Aggrecan und anderen Proteoglykan-Aggregaten [Hardingham et al., 1992: 861-869; Heinegard et al., 1989: 2042-2047]. Quantitativ kleinere Gruppen beinhalten Link-Protein [Hardingham 1979: 237], Versican [Grover et al., 1993: 361], Biglycan, Fibromodulin [Fisher et al., 1991: 14371], Decorin [Danielson et al., 1993: 146], Thrombospondin [Heinegard et al., 1989: 2042-2047] und andere. Link-Protein und Versican spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Statik des Knorpels, indem sie zahlreiche Bindungen untereinander, sowie mit Aggrecan und Hyaluronan stabilisieren [Hardingham 1979: 237; Matsumoto et al., 2003: 41205; Shi et al., 2004: 12060]. Versican stimuliert darüber hinaus die Proliferation von Chondrozyten [Zhang et al., 1999: 445].

Gelenkknorpel besitzt von den verschiedenen Kollagenen vor allem Kollagen Typ II, mit geringeren Anteilen der Typen V, VI, IX und XI. Im Gegensatz hierzu findet sich im Meniskus zu etwa 90 % Kollagen Typ I, in geringeren Mengen auch Typ II, III, V und VI, so dass sich insbesondere durch die Verteilung von Kollagen I und II diese beiden Knorpelgewebe biochemisch voneinander unterscheiden [Benjamin et al., 2004: 1; Eyre 1980: 1315-1319; Eyre et al., 1983: 265; Furukawa et al., 1980: 79; McDevitt et al., 1990: 8; Mow et al., 1984: 377-385]. Die Grundstruktur der Kollagene besteht aus einer Tripel-Helix. Die hochorganisierte Struktur scheint spezifisch Zugspannungsbeanspruchungen entgegenzuwirken, so ist Kollagen entscheidend für die Zugfestigkeit von Knorpel verantwortlich [Elliott et al., 2002: 223; Korhonen et al., 2002: 903; Li et al., 1999: 673].

Die großen aggregierenden Proteoglykane Aggrecan, Versican und Link-Protein machen im Knorpel etwa 50-85 % der Proteoglykane aus. Nichtaggregierende Proteoglykane sind Biglykan und Decorin, die einen Anteil von etwa 10 % ausmachen. Weitreichende Interaktionen zwischen Kollagenen und Proteoglykanen untereinander, sowie zwischen

beiden Gruppen selbst, können den Metabolismus von Chondrozyten, die Kollagen-Fibrillogenese und die Kollagen-Netzwerkorganisation modulieren [Muir 1983: 613-618]. Die Fraktion der Proteoglykane und hierbei insbesondere Aggrecan ist für die Druckfestigkeit von Knorpel verantwortlich [Korhonen et al., 2002: 903; Li et al., 1999: 673].

Ultrastrukturell kann Gelenkknorpel in drei separate Zonen eingeteilt werden, die superfizielle tangentielle Zone (10-20 % der Dicke), die mittlere Zone, (40-60 % der Knorpeldicke) und die tiefe Zone (30 % der Dicke) [Clark 1985: 17-19; Mow et al., 1974: 449-452]. Unter der tiefen Zone befindet sich die Tidemark, an die sich kalzifizierter Knorpel anschließt, der in den subchondralen Knochen übergeht. Die Kollagenfaserbündel der tiefen Zone stoßen durch die Tidemark und insertieren im kalzifizierten Knorpel, sowie im subchondralen Knochen und gewährleisten damit die chondrale Verankerung auf dem darunter liegenden Knochen [Bullough et al., 1983: 72-76]. Eine ungleiche Zusammensetzung von Kollagenen und Proteoglykanen in den einzelnen Zonen und der sich von der Oberfläche zu tieferen Zonen hin reduzierende Wassergehalt verursachen unterschiedliche biomechanische Eigenschaften der einzelnen Zonen [Franzen et al., 1981: 535; Jurvelin et al., 2000: 669; Mow et al., 1984: 377-385; Muir et al., 1970: 554-558; Roth et al., 1980: 1102; Schinagl et al., 1999: 499].

Die Struktur vom Meniskus weist ebenfalls Schichten auf, allerdings differiert sie vom Gelenkknorpel. Die Oberflächenschicht des Meniskus, welche mit dem Gelenkknorpel artikuliert, besteht aus feinen Fibrillen in einer zufälligen, netzartig verwebten Matrix. Etwa 100 µm unterhalb der Oberflächenschicht finden sich seilartige Kollagenfibrillen-Bündel, die um die Zirkumferenz des Meniskus angeordnet sind. Kleinere Fasern laufen radial zu diesen Bündeln und verbinden sie [Aspden et al., 1985: 371-376; Procter et al., 1989: 771-776; Skaggs et al., 1994: 176]. Diese Organisation findet sich jeweils in den äußeren zwei Drittel des Meniskus, während die innerste Schicht vorwiegend zufällig angeordnete Fasern und Proteoglykane enthält und der Struktur von hyalinem Knorpel ähnelt [Yasui 1978: 391].

4.4 Überlegungen zur Minimierung von Fehlerquellen bei der biomechanischen Testung von Knorpelgewebe

Vor der Durchführung der biomechanischen Untersuchungen von Knorpelgewebe nach HHD-Behandlung wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der möglichst geringe Fehlerquellen beinhaltet. Durch die Auswahl von bovinem Knorpel als Versuchsgewebe konnte ein

störender Alterseinfluss minimiert werden, da Schlachtrinder zum Zeitpunkt der Schlachtung alle jung und etwa gleich alt sind. Durch die getrennte Auswertung von Proben aus dem medialen und lateralen Meniskus bzw. Kondylus und die zuvor definierten Entnahmestellen wurde den unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften des medialen und lateralen Gelenkkompartimentes Rechnung getragen. In den Versuchen mit Gelenkknorpel wurde die knöcherne Grenzlamme unter dem Knorpel belassen und der Knorpel nicht abgelöst. Einerseits kommen osteochondrale Segmente der Situation *in vivo* näher, zum anderen neigt Knorpelgewebe dazu, anzuschwellen, wenn es vom subchondralen Knochen entfernt wird, was wiederum Änderungen der biomechanischen Eigenschaften bewirken würde [Mow et al., 1997: 126]. Zur Testung der mechanischen Eigenschaften wurde ein Kugeleindrück-/Relaxationsversuch durchgeführt. Dabei wurde bewusst eine Kugel (Radius 2,5 mm) als Drucküberträger gewählt. In der Literatur beschriebene Testverfahren bedienen sich fast ausschließlich eines Stempels mit einer planen Fläche als Drucküberträger. Ein derartiges Modell berücksichtigt jedoch nicht die physiologische Inkongruenz der Knorpeloberfläche. Ebenso kommt es an den seitlichen Enden eines planen Stempels beim Eindrücken in den Knorpel zu unerwünschten Kanteneffekten. Das bedeutet, dass an der Kante des planen bzw. eckigen Stempels das Gewebe nicht gleichmässig komprimiert werden kann und sich, bedingt durch die viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels, Gewebe am Rand dieser Kante hochdrückt. Beides sind Fehlerquellen, welche die Ergebnisse einer Testung verfälschen können. Eine Kugel hingegen passt sich einerseits der inkongruenten Oberfläche des Knorpels besser an, zudem können unerwünschte Kanteneffekten minimiert werden.

4.5 Knorpelgewebe nach Hochdruckbehandlung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Meniskussegmente nach einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung (10 min, Raumtemperatur) mit bis zu 600 MPa keine signifikanten Änderungen ($p=0,05$) ihrer biomechanischen Eigenschaften aufwiesen. Gelenkknorpel-Segmente zeigten lediglich eine signifikante Zunahme der Eindrücktiefe nach 300 MPa in Proben aus dem medialen Kondylus und nach 600 MPa in Proben aus dem lateralen Kondylus. Diese Änderungen könnten allerdings auch probenspezifisch, d. h. durch bereits zuvor beeinträchtigten Knorpel, hervorgerufen worden sein, da sich in Proben des medialen Kondylus nach 600 MPa und in Proben des lateralen Kondylus nach 300 MPa keine signifikanten Änderungen gegenüber unbehandelten Proben zeigten. Interessanterweise ist diese Zunahme der Eindrücktiefe in allen behandelten Proben mehr oder weniger zu

beobachten gewesen, wohingegen Relaxation und Steifigkeit weder nach 300 noch nach 600 MPa signifikante Veränderungen aufwiesen. Zu ähnlichen Resultaten kamen andere Autoren, die für Knochen und Sehnen keinen signifikanten Verlust der mechanischen Stabilität nach einer HHD-Behandlung feststellten [Diehl et al., 2001: 121; Diehl et al., 2005: eingereicht; Steinhauser et al., 2006: 130]. Auffallend war eine von Zyklus zu Zyklus zunehmende Steifigkeit in allen behandelten und unbehandelten Proben, die anfangs größer war und zum fünften Zyklus hin geringer wird, in etwa in Form einer Sättigungskurve. Entsprechend nehmen die Relaxation und die Eindrücktiefe von Zyklus zu Zyklus ab. Diese Versteifung lässt sich durch die viskoelastischen Eigenschaften von Knorpelgewebe erklären. Der Fluss interstitieller Flüssigkeit, der durch die Druckbelastung des Stempels induziert wird, bewirkt eine Kompaktation der Matrix und damit eine Versteifung der Probe [Holmes et al., 1985: 206-207; Mow et al., 1984: 377-385; Mow et al., 1992: 67-86]. Wird die auf die Probe einwirkende Kraft entfernt, wie in den vorliegenden Versuchen nach 60 s Haltezeit, so wird die interstitielle Flüssigkeit durch den am Punkt der ehemaligen Krafteinwirkung entstehenden geringeren hydrostatischen Druck dorthin zurückfließen. Die gewählte Entspannungszeit von 60 s reicht jedoch nicht aus, um das ursprüngliche Volumen an interstitieller Flüssigkeit an diesem Punkt wieder zu erreichen, so dass bei der erneuten Belastung die Kraft auf die bereits kompaktierte Matrix trifft. So entsteht von Zyklus zu Zyklus eine Versteifung der Probe an dem Punkt der Kraftapplikation. Entsprechend sinken durch diese Kompaktation die Relaxation und die benötigte Eindrücktiefe, um F_{\max} zu erreichen. Durch die Volumenverdrängung interstitieller Flüssigkeit und die Kompaktation der Matrix erklärt sich auch der nicht lineare Abfall der Kraft während der Relaxation, da das Volumen, welches verdrängt wird, nach Erreichen der Maximalkraft von Beginn der Haltezeit an stetig absinkt. In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Knorpelsegmente des medialen gegenüber denen des lateralen Meniskus, sowie Knorpelsegmente des medialen gegenüber denen des lateralen Kondylus in allen Testzyklen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,05$) in der Biomechanik aufwiesen, nicht in Kontrollproben und auch nicht in behandelten Proben. Auch Athanasiou et al. (1991) fanden bei bovinen Knorpelproben annähernd gleiche mechanische Materialeigenschaften für lateralen und medialen Kondylus [Athanasiou et al., 1991: 336].

Dies ist bemerkenswert, da die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix des Knorpels und damit das mechanische Materialverhalten nicht nur von Spezies zu Spezies und je nach Alter des Individuums variiert, sondern ebenfalls von Region zu Region, die untersucht wird

[Akizuki et al., 1986: 379; Athanasiou et al., 1991: 334-339; Elliott et al., 2002: 225-226; Jurvelin et al., 2000: 669; Rasanen et al., 1996: 519]. Verschiedene Arbeiten zeigten nicht nur Unterschiede zwischen lateralen und medialen Kondylen und Menisken in ihren biochemischen und mechanischen Eigenschaften [Esquisatto et al., 1997: 433; Stephan et al., 1998: 213], sondern auch regionale Differenzen innerhalb eines Kondylus oder Meniskus [Esquisatto et al., 1997: 433; Kiviranta et al., 1987: 801 und 1987: 265; Mow et al., 1997: 146]. Hierbei spielt insbesondere die Belastung und deren Verteilung auf das Gewebe eine entscheidende Rolle, wobei Kompartimente mit höherer Belastung eine dickere Knorpelschicht zeigen [Armstrong et al., 1995: 25; Athanasiou et al., 1991: 331; Little et al., 1997: 49]. So lassen sich auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies erklären, da Vierfüßler im Vergleich zum Menschen und selbst untereinander eine andere Belastungsverteilung innerhalb der Gelenke aufweisen.

Im Gelenkknorpel war Kollagen Typ II und im angrenzenden subchondralen Knochen Kollagen Typ I und III sowohl in unbehandelten, als auch in HHD-behandelten Proben (600 MPa, 10 min, 20 °C) immunhistochemisch nachweisbar. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Signalintensität und im Verteilungsmuster. In den Meniskus-Segmenten waren alle drei Kollagene in behandelten und unbehandelten Proben nachweisbar, ebenfalls ohne Signal- und Verteilungsunterschiede. Die gleichen Beobachtungen konnten in allen Proben für die Proteoglykane Aggrecan, Link Protein und Versican gemacht werden. Die immunhistochemischen Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten der biomechanischen Tests, da die Struktur und Verteilung der Matrixkomponenten für die mechanischen Eigenschaften des Knorpels maßgeblich verantwortlich ist. Dieser primäre, frühe Erhalt der Stabilität und der Struktur des Knorpels ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Reimplantation extrakorporal devitalisierten Gewebes.

Die beiden routinemäßig zur Devitalisierung von Grafts eingesetzten Verfahren der Autoklavierung oder Bestrahlung führen hingegen zu einem deutlichen Verlust an mechanischer Stabilität und zu einer verzögerten Osteointegration [Knaepler et al., 1991: 194-196; Pelker et al., 1987: 237]. Darüber hinaus weist die Bestrahlung eine fragliche Kanzerogenität und Mutagenität auf [Knaepler et al., 1994: 800-801]. Die meisten Arbeiten untersuchten bislang die Anwendungsmöglichkeiten der extrakorporalen Tumordevitalisierung an Knochensegmenten. In der Literatur finden sich jedoch nur wenige Arbeiten, welche die Auswirkungen einer Bestrahlung oder Autoklavierung auf biomechanische und

histologische Eigenschaften von Knorpelgewebe untersucht haben. Leider wurden darin diese beiden Verfahren in der Anwendung bzw. Prozessierung von Allografts, nicht von Autografts evaluiert. Die publizierten Arbeiten zeigten allerdings z. T. gravierende Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften und auf die Matrix des Knorpels. Donald et al. (1996) fanden eine um 50-80 % herabgesetzte Steifigkeit von Knorpelgewebe nach einer Hochdosis-Bestrahlung [Donald et al., 1996:297]. Shelton et al. (1998) wiesen auf das Potential von Sterilisationsverfahren hin, das Kollagenetzwerk zu schädigen [Shelton et al., 1998: 165], was durch eine weitere Arbeitsgruppe bestätigt wurde [Cheung et al., 1990: 581]. In einer anderen Studie wurden bereits nach einer Behandlung mit 50 Gy morphologische Veränderungen im Knorpelgewebe nachgewiesen [Cornelissen et al., 1993: 343]. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der immunhistochemisch keine Veränderungen des Knorpelstromas dokumentiert werden konnten. Yahia et al. (1993) untersuchten den Effekt einer Radiatio auf die biomechanischen Eigenschaften von Menisken. Hierbei zeigte sich eine signifikante Abnahme der viskösen und elastischen Eigenschaften des Meniskus, so dass die Autoren von der Anwendung einer Bestrahlung zur Prozessierung von Meniskus-Allografts abrieten [Yahia et al., 1993: 211]. Gegensätzlich dazu konnten in der vorliegenden Arbeit auch für Menisken weder biomechanisch, noch immunhistochemisch negative Auswirkungen einer HHD-Behandlung nachgewiesen werden.

Die Auswirkungen der Bestrahlung und der Autoklavierung auf Knochengewebe sind besser untersucht, da diese klinisch routinemäßig zur extrakorporalen Devitalisierung tumorbefallener Autografts oder zur Prozessierung von Allografts eingesetzt werden. So zeigten beispielsweise Hofmann et al. (2003) eine deutliche Reduktion der Biege- und Scherfestigkeit von Knochenpins nach einer Bestrahlung mit 2,0 Mrad (20000 Gy) [Hofmann et al., 2003: 480]. Untersuchungen an humanem Knochen wiesen eine Reduktion der Stabilität (work to fracture) auf nur noch 5 % nach, wenn der Knochen mit einer Hoch-Dosis Bestrahlung behandelt wurde (90 kGy), wie sie beispielsweise zur sicheren viralen Inaktivierung benötigt wird [Currey et al., 1997: 111]. Die Autoklavierung von Knochen führt zu teils noch deutlicheren Stabilitätseinbußen. Ein Verlust der Kompressions- und Frakturstabilität von bis zu 80 % wurde aufgezeigt [Speirs et al., 1999: 489; Viceconti et al., 1996: 63]. Die Behandlung erfolgte dabei nach den in Europa gültigen Richtlinien (132 °C für mindestens 1 h). Eine zusätzliche Verminderung der osteoinduktiven Fähigkeiten derart behandelter Grafts wurde belegt [Munting et al., 1988: 34]. Die mechanischen und biologischen Alterationen führen zu hohen Komplikationsraten in Form von frühen Frakturen, Infektionen, fehlender

Osteointegration des Grafts und zu einer beschleunigten Resorption [Böhm et al., 2003: 356-362; Park et al., 1999: 520; Sabo et al., 1999: 276-280; Sanjay et al., 1997: 294; Sys et al., 2002: 175]. Gegensätzlich hierzu stellten zwei andere Autoren fest, dass eine HHD-Behandlung von Knochensegmenten mit 600 MPa (20 min, 20 °C) die initialen biomechanischen Eigenschaften des Knochens nicht signifikant veränderte und die biologischen Eigenschaften von Extrazellulär-Proteinen erhalten blieben. Elektronenmikroskopisch ließen sich keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Knochensegmenten aufzeigen [Diehl et al., 2001: 121; Steinhauser et al., 2006: 130].

Für Sehnen wurde ebenfalls ein signifikanter Verlust an biomechanischer Stabilität direkt nach einer Bestrahlung aufgezeigt [De Deyne et al., 1991: 51; Rasmussen et al., 1994: 188]. In einer Studie mit niedrig-dosiert (20 kGy) bestrahlten Knochen/Sehnen-Allografts für die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes zeigte sich nach einer Serie von Belastungszyklen eine Verlängerung der Grafts um 27 %. Zugleich nahm die Zugfestigkeit um über 20 % ab [Curran et al., 2004: 1131]. Hingegen konnte nachgewiesen, dass eine HHD-Behandlung von Sehnen (600 MPa, 20 min, Raumtemperatur) die biomechanischen Eigenschaften und die immunhistochemische Anfärbarkeit von Kollagen Typ I und Versican unbeeinflusst lässt [Diehl et al., 2005: eingereicht]. Diese Beobachtungen können in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Ebenso wie im Meniskus besteht in Sehnen der strukturelle Anteil hauptsächlich aus Kollagen Typ I, so dass sich durch das in beiden Fällen unveränderte Verteilungsmuster des Kollagens nach einer HHD-Behandlung die erhaltene Zugfestigkeit ableiten lässt.

4.6 Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, liessen sich humane Chondrozyten und Chondrosarkomzellen mit hydrostatischem Hochdruck bis 350 MPa (10 min, 37 °C) sicher abtöten. Die biomechanischen und immunhistochemischen Eigenschaften von Gelenkknorpel und Meniskus wurden durch eine HHD-Behandlung bei 300 nicht, und bei 600 MPa nur leicht negativ beeinflusst. Diese vielversprechenden Ergebnisse müssen in weiteren Versuchen ausgeweitet werden. Die Hochdruckinkubation von ganzen humanen tumorbefallenen Knochensegmenten, die in eigenen Arbeiten durchgeführt wurde, zeigte, dass auch über einen längeren Zeitraum keine vitalen malignen Zellen mehr kultiviert werden konnten. Durchzuführende Tierversuche sollten Aufschluss darüber geben, wie sich malignes autologes

Gewebe, das extrakorporal durch HHD devitalisiert wird, nach einer Reimplantation verhält, insbesondere im Hinblick auf Rezidive, Revitalisierung und Integrationsverhalten. Klinische Ergebnisse vieler Arbeiten [s. Einleitung] konnten zeigen, dass auch bestrahltes oder autoklaviertes Knochengewebe trotz der durch diese Behandlungsverfahren verschlechterten biologischen Eigenschaften prinzipiell nach einer Implantation einwächst und das tote Knochengewebe als Matrix für Zellrepopulation und Revaskularisierung dienen kann. Ob und wie sich hochdruckbehandeltes Knochengewebe besiedeln lässt, wird derzeit ebenfalls in eigenen Arbeiten untersucht. Das Hauptproblem bei durch derzeit gängige Verfahren devitalisiertem Knorpel besteht in einer Degeneration und Resorption nach der Reimplantation. Die Arbeit von Ahmed et al. (2003) hat gezeigt, dass die Reimplantation ganzer extrakorporal devitalisierter Gelenke prinzipiell möglich ist, jedoch wurde auch in dieser Studie eine Resorption des Knorpels nachgewiesen [Ahmed et al., 2003: 170]. Möglicherweise kann die Besiedlung mit autologen Chondrozyten eine Resorption des Knorpels verhindern. Dass sich Chondrozyten auf devitalisiertem Knorpel ansiedeln lassen und dabei ihre Vitalität und Funktion beibehalten wurde bewiesen [Kelley et al., 2002: 267-269]. Ob und wie sich hochdruckbehandelter Knorpel als Scaffold verwenden lässt und sich darauf Chondrozyten ansiedeln lassen, bleibt in weiteren Versuchen zu klären.

Es könnten sich auch Einsatzmöglichkeiten von HHD bei der allogenen Meniskus-Transplantation bieten. Eine Meniskektomie, die durch Verletzungen des Kniegelenks bzw. des Meniskus notwendig werden kann, führt langfristig zu einem Verlust und zur Degradation des Gelenkknorpels. Damit verbunden ist die Entstehung einer Arthrose mit Funktionseinschränkung und Schmerz des Kniegelenks [Cicutini et al., 2002: 1954; Noyes et al., 2004: 1392; Verdonk 2002: 118]. Um diesen Verlauf zu hemmen bzw. positiv zu beeinflussen wird auf die Möglichkeit der allogenen Meniskustransplantation zurückgegriffen, die nachweislich zu einer Schmerzreduktion und Funktionsverbesserung führt, was inzwischen auch durch Langzeitergebnisse belegt wurde [Graf et al., 2004: 129; Noyes et al., 2004: 1392; Verdonk 2002: 118]. Die routinemäßige Prozessierung von Meniskus-Allografts erfolgt durch Tiefgefrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedoch verbleibt hiernach ein Restrisiko für die Übertragung von Infektionskrankheiten wie Hepatitis B und C oder HIV, auch wurden vitale Tumorzellen in einem tiefgefrorenen Graft nachgewiesen [Hofmann et al., 1995: 163-164; Palmer et al., 1999: 333; Weyts et al., 2003: 661-663]. Aus diesem Grund sind einige Gewebebanken dazu übergegangen, Meniskus-Allografts zusätzlich zu sterilisieren, meist in Form einer Bestrahlung [Springfield 1997: 12]. Um jedoch HIV und

andere Viren sicher zu eliminieren sind hohe Strahlendosen notwendig, welche die Grafts, wie bereits dargelegt, stark in ihren mechanischen und biologischen Eigenschaften kompromittieren [Campbell et al., 1999: 517; Pelker et al., 1987: 236-238; Smith et al., 2001:815; Yahia et al., 1993: 211]. Der Einsatz von HHD an Stelle einer Bestrahlung könnte hier vielversprechend sein, da sich alle Zellen ab 350 MPa abtöten lassen. Daneben wurde auch die Abtötung der humanpathogenen Viren HIV, HVA, HSV und CMV durch HHD um 400 MPa nachgewiesen [Jurkiewicz et al., 1995: 6935-6936; Kingsley et al., 2002: 1605; Meyer-Pitroff 2003: 297-299; Nakagami et al., 1992: 255; Nakagami et al., 1996: 475]. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, sind in diesen Druckbereichen keine negativen Auswirkung auf die Biomechanik zu erwarten. Dass bestrahlte bzw. tiefgefrorene Meniskus-Allografts nach der Implantation von synovialen Zellen ausgehend revitalisiert werden, konnte in verschiedenen Arbeiten aufgezeigt werden [Arnoczky et al., 1992: 428; Goble et al., 1999: 146; Rodeo et al., 2000: 1071; Wada et al., 1998: 250]. Um das in vivo- und Revitalisierungs-Verhalten hochdruckbehandelter Meniskus-Allografts zu evaluieren, sollten weiterführende Versuche durchgeführt werden. Auch muss kritisch angemerkt werden, dass noch keine Daten bezüglich der Fähigkeit von HHD zur Abtötung von Hepatitis B und C, oder von EBV vorliegen.

Die bislang vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich mit der hydrostatischen Hochdruckbehandlung eine neue, vielversprechende Alternative zur Autoklavierung oder Bestrahlung von Knorpelgewebe entwickeln könnte.

5. Zusammenfassung

Die Rekonstruktion von tumorbefallenen osteochondralen Segmenten des Bewegungsapparates stellt eine zentrale Herausforderung in der orthopädischen Chirurgie dar. Um tumorbefallene Segmente nach einer Resektion zu devitalisieren und im Anschluss zu reimplantieren werden diese Segmente in erster Linie intraoperativ autoklaviert oder bestrahlt. Beide Verfahren bringen jedoch deutliche Nachteile mit sich, insbesondere den Verlust biomechanischer und/oder biologischer Eigenschaften, somit ist die Entwicklung alternativer Verfahren auf Grund dieser zum Teil deutlichen Komplikationen unbedingt notwendig. Die hydrostatische Hochdruckbehandlung (HHD), die in der Lebensmittelindustrie zur Inaktivierung von Keimen in Nahrungsmitteln etabliert wurde, fand bislang noch keinen Einzug in die orthopädische Chirurgie, obwohl präklinische Arbeiten gezeigt haben, dass durch eine Behandlung mit HHD unterschiedliche benigne und auch maligne Zelltypen abgetötet werden können. Diese initialen Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit für humane Chondrozyten und Chondrosarkomzellen in Kultur bestätigt werden. Beide Zelltypen wurden durch eine HHD-Behandlung bei >350 MPa (10 min, 37 °C) inaktiviert. Zellen, die in Suspension behandelt wurden, waren dabei druckresistenter als Zellen, die zum Zeitpunkt der HHD-Behandlung an das Matrixprotein Fibronectin gebunden waren. Tumorzellen in Suspension zeigten sich resistenter als benigne Chondrozyten, im adhärenen Zustand fand sich kein Unterschied. Interessanterweise konnte in den vorliegenden Experimenten nach kurzzeitiger HHD-Einwirkung keine signifikante Apoptoseinduktion in den Zellen nachgewiesen werden.

Biomechanische Tests wurden an HHD-behandelten osteochondralen Gelenkknorpel- und Meniskussegmenten in Form eines Stress-/Relaxationsversuches durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Knorpelproben keine signifikante Veränderung der mechanischen Eigenschaften nach einer HHD-Behandlung bei 300 MPa (10 min, 20 °C) und lediglich eine minimale Reduktion nach 600 MPa. Durch Immunhistochemie wurde nachgewiesen, dass sich das Verteilungsmuster und die Antigenität von Kollagen I, II und III, sowie von Aggrecan, Versican und Link-Protein durch eine HHD-Behandlung (600 MPa, 10 min, 20 °C) nicht wesentlich ändert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Experimente mit HHD-behandelten Knochensegmenten und Sehnen. Zusammenfassend hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass sich humane Chondrozyten und Chondrosarkomzellen durch eine HHD-Behandlung abtöten lassen. Dies kann in einem Druckbereich erreicht werden, in dem keine

Verschlechterung der mechanischen und keine Veränderung bestimmter biologischer Eigenschaften von Knorpelgewebe auftritt.

6. Literaturverzeichnis

Abe F, Kato C, Horikoshi K. Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiol* 1999, 7: 447-453.

Ahmed AR, Watanabe H, Takagishi K. Reconstruction with autologous pasteurized whole knee joint I: experimental study in a rabbit model. *J Orthop Sci* 2003, 8: 170-179.

Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res* 2001, 19: 785-796.

Akizuki S, Mow VC, Muller F, Pita JC, Howell DS, Manicourt DH. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *J Orthop Res* 1986, 4: 379-392.

Akkus O, Rinnac CM. Fracture resistance of gamma radiation sterilized cortical bone allografts. *J Orthop Res* 2001, 19: 927-934.

Alpa H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Ray B. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2000, 60: 33-42.

Altman BA, De Bari A, Krajchich J. Massive allografts in the treatment of osteosarcoma and Ewing sarcoma in children and adolescents. *J Bone Joint Surg (Am)* 1995, 77: 54-64.

Armstrong CG, Mow VC. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J Bone Joint Surg Am* 1982, 64: 88-94.

Armstrong SJ, Read RA, Price R. Topographical variation within the articular cartilage and subchondral bone of the normal ovine knee joint: a histological approach. *Osteoarthritis Cartilage* 1995, 3: 25-33.

Arnoczky SP, DiCarlo EF, O'Brien SJ, Warren RF. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog. *Arthroscopy* 1992, 8: 428-436.

Aspden RM, Yarker YE, Hukins DW. Collagen orientations in the meniscus of the knee joint. *J Anat* 1985, 140 (Pt 3): 371-380.

Athanasίου KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 1991, 9: 330-340.

Bachrach NM, Mow VC, Guilak F. Incompressibility of the solid matrix of articular cartilage under high hydrostatic pressures. *J Biomech* 1998, 31: 445-451.

Beney L, Perrier-Cornet JM, Hayert M, Gervais P. Shape modification of phospholipidic vesicles induced by high pressure: Influence of bilayer compressibility. *Biophys J* 1997, 72: 1258-1263.

Benjamin M, Ralphs JR. Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol* 2004, 233: 1-45.

Bernsdorff C, Wolf A, Winter R, Gratton E. Effect of hydrostatic pressure on water penetration and rotational dynamics in phospholipid-cholesterol bilayers. *Biophys J* 1997, 72: 1264-1277.

Bessette GC. The meniscus. *Orthopedics* 1992, 15: 35-42.

Bhati RS, Mukherjee DP, McCarthy KJ, Rogers SH, Smith DF, Shalaby SW. The growth of chondrocytes into a Fibronectin-coated biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res* 2001, 56: 74-82.

Bohm P, Fritz J, Thiede S, Budach W. Reimplantation of extracorporeal irradiated bone segments in musculoskeletal tumor surgery: clinical experience in eight patients and review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* 2003, 387: 355-365.

Bohm P, Scherer MA. Incorporation of devitalized autografts in dogs. *Int Orthop* 1997, 21: 283-290.

Bourns B, Franklin S, Cassimeris L, Salmon ED. High hydrostatic pressure effects in vivo: changes in cell morphology, microtubule assembly, and actin organization. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988, 10: 380-390.

Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Frasch SC, Nakamura T, Henson PM. Polyamine regulation of plasma membrane phospholipid flip-flop during apoptosis. *J Biol Chem* 1999, 274: 28113-28120.

Bronckers AL, Goei W, van Heerde WL, Dumont EA, Reutelingsperger CP, van den Eijnde SM. Phagocytosis of dying chondrocytes by osteoclasts in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labelling. *Cell Tissue Res* 2000, 301: 267-272.

Brown DES. The effects of rapid changes in hydrostatic pressure upon the contraction of skeletal muscle. *J Cell Comp Physiol* 1934, 5: 335-346.

Bullough PG, Jagannath A. The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function. *J Bone Joint Surg Br* 1983, 65: 72-78.

Campbell DG, Li P. Sterilization of HIV with irradiation: relevance to infected bone allografts. *Aust N Z J Surg* 1999, 69: 517-521.

Casadei MA, Manas P, Niven G, Needs E, Mackey BM. Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68: 5965-5972.

Chapman PG, Villar RN. The bacteriology of bone allografts. *J Bone Joint Surg (Br)* 1992, 74: 398-399.

Cheftel J. Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol Int* 1995, 1: 75-90.

Cheftel JC, Culioli J. Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science* 1997, 46: 211-236.

Chen WM, Chen TH, Huang CK, Chiang CC, Lo WH. Treatment of malignant bone tumours by extracorporeally irradiated autograft-prosthetic composite arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 2002, 84: 1156-1161.

Chen Y, Wang A, Zhou J, Qiu G, Zhang J. Apoptosis of chondrocytes in cartilage. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2000, 22: 364-367.

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.

Cicutтини FM, Forbes A, Yuanyuan W, Rush G, Stuckey SL. Rate of knee cartilage loss after partial meniscectomy. *J Rheumatol* 2002, 29: 1954-1956.

Clark JM. The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage: a scanning electron microscopic study. *J Orthop Res* 1985, 3: 17-29.

Cornelissen M, Thierens H, De Ridder L. Radiation effects on the matrix synthesis in non-ossifying embryonic cartilage in vitro: a functional and morphological study. *Tissue Cell* 1993, 25: 343-350.

Crenshaw HC, Allen JA, Skeen V, Harris A, Salmon ED. Hydrostatic pressure has different effects on the assembly of tubulin, actin, myosin II, vinculin, talin, vimentin, and cytokeratin in mammalian tissue cells. *Exp Cell Res* 1996, 227: 285-297.

Crenshaw HC, Salmon ED. Hydrostatic pressure to 400 atm does not induce changes in the cytosolic concentration of Ca²⁺ in mouse fibroblasts: measurements using fura-2 fluorescence. *Exp Cell Res* 1996, 227: 277-284.

Cruz EO, Gebhardt MC, Jennings C, Springfiels DS, Mankin HJ. The results of transplantation of intercalary allografts after resection of tumors. *J Bone Joint Surg (Am)* 1997, 79-A: 97-106.

Curran AR, Adams DJ, Gill JL, Steiner ME, Scheller AD. The biomechanical effects of low-dose irradiation on bone-patellar tendon-bone allografts. *Am J Sports Med* 2004, 32: 1131-1135.

Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 1997, 15: 111-117.

Danielson KG, Fazzio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV. The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics* 1993, 15: 146-160.

Darzynkiewicz Z, Traganos F. (1998) Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1998, 62: 33-73.

De Deyne P, Haut RC. Some effects of gamma irradiation on patellar tendon allografts. *Connect Tissue Res* 1991, 27: 51-62.

Delacour H, Clery C, Masson P, Vidal DR. Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. *Ann Pharm Fr* 2002, 60: 38-43.

Dibb W, Morild E, Laerum OD. Effects of high hydrostatic pressure on normal and neoplastic rat cells in culture. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1981, 38: 169-176.

Diehl P, Hoehn G, Hadaller M, Grebner S, Gradinger R, Meyer-Pitroff R, Mittelmeier W. Einfluss der hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf die mechanischen Eigenschaften des Knochens. *BIOMaterialien* 2001, 2: 121.

Diehl P, Reuning U, Gollwitzer H, Magdolen U, Gerdesmeyer L, Schauwecker J, Tuebel J, Gradinger R, Mittelmeier W, Schmitt M. Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability. *Oncol Rep* 2004, 12: 369-373.

Diehl P, Schmitt M, Blumelhuber 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. *Oncol Rep* 2003, 10: 1851-1855.

Diehl P, Schmitt M, Steinhauser E, Heister C, Lehner S, Milz S, Link TM, Blumelhuber G, Gollwitzer H, Mittelmeier W. Biomechanical analysis of Achilles' tendons after high hydrostatic pressure treatment as a novel supporting technique in orthopedic surgery. 2005, *eingereicht zur Publikation*.

Donald PJ, Deckard-Janatpour K, Sharkey N, Lagunas-Solar M. The effects of irradiation dose on the stiffness of cartilage grafts. *Ann Plast Surg* 1996, 36: 297-303.

Drews O, Weiss W, Reil G, Parlar H, Wait R, Gorg A. High pressure effects step-wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics* 2002, 2: 765-774.

Elke R. Particle disease. Is tribology a topic in revision surgery? *Orthopade* 2001, 30: 258-265.

Elliott DM, Narmoneva DA, Setton LA. Direct measurement of the Poisson's ratio of human patella cartilage in tension. *J Biomech Eng* 2002, 124: 223-228.

Elo MA, Sironen RK, Kaarniranta K, Auriola S, Helminen HJ, Lammi MJ. Differential regulation of stress proteins by high hydrostatic pressure, heat shock, and unbalanced calcium homeostasis in chondrocytic cells. *J Cell Biochem* 2000, 79: 610-619.

Enomoto A, Nakamura K, Nagai K, Hashimoto T, Hakoda M. Inactivation of food microorganisms by high-pressure carbon dioxide treatment with or without explosive decompression. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997, 61: 1133-1137.

Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D. Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and Fibronectin. *Exp Cell Res* 1993, 205: 276-285.

Ernst DR, Race RE. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Meth* 1993, 41: 193-201.

Esquisatto MA, Pimentel ER, Gomes L. Extracellular matrix composition of different regions of the knee joint cartilage in cattle. *Anat Anz* 1997, 179: 433-437.

Eyre DR. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science* 1980, 207: 1315-1322.

Eyre DR, Wu JJ. Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett* 1983, 158: 265-270.

Fideler BM, Vangsnest CT Jr, Moore T, Li Z, Rasheed S. Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus: a study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. *J Bone Joint Surg (Am)* 1994, 76-A: 1032-1035.

Fisher LW, Heegaard AM, Vetter U, Vogel W, Just W, Termine JD, Young MF. Human biglycan gene. Putative promoter, intron-exon junctions, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1991, 266: 14371-14377.

Fithian DC, Kelly MA, Mow VC. Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop* 1990, 252: 19-31.

Franzen A, Inerot S, Hejderup SO, Heinegard D. Variations in the composition of bovine hip articular cartilage with distance from the articular surface. *Biochem J* 1981, 195: 535-543.

Frasch SC, Henson PM, Nagaosa K, Fessler MB, Borregaard N, Bratton DL. Phospholipid flip-flop and phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) co-localize to uropod rafts in formylated Met-Leu-Phe-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*. 2004, 279: 17625-17633.

Freitas TR, Gaspar LP, Caldas LA, Silva JL, Rebello MA. Inactivation of classical swine fever virus: association of hydrostatic pressure and ultraviolet irradiation. *J Virol Methods* 2003, 108: 205-211.

Frey B, Franz S, Sheriff A, Korn A, Bluemelhuber G, Gaipf US, Voll RE, Meyer-Pittroff, Herrmann M. Hydrostatic pressure induced death of mammalian cells engages pathways related to apoptosis or necrosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2004, 50: 459-467.

Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980, 62: 79-89.

Garcia AJ, Ducheyne P, Boettinger D. Effect of surface reaction stage on Fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res* 1998 40: 48-56.

Garcia-Graells C, Valckx C, Michiels CW. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66: 4173-4179.

Gibbs CJJ, Gajdusek DC, Latarjet R. Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru., Creutzfeld-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75: 6268-6270.

Goble EM, Kohn D, Verdonk R, Kane SM. Meniscal substitutes--human experience. *Scand J Med Sci Sports* 1999, 9: 146-157.

Goldman Y, Peled A, Shinitzky M. Effective elimination of lung metastases induced by tumor cells treated with hydrostatic pressure and N-acetyl-L-cysteine. *Cancer Res* 2000, 60: 350-358.

Gould GW. Preservation: past, present and future. *Br Med Bull* 2000, 56: 84-96.

Gould GW. New processing technologies: an overview. *Proc Nutr Soc* 2001, 60: 463-474.

Graf KW Jr, Sekiya JK, Wojtys EM Long-term results after combined medial meniscal allograft transplantation and anterior cruciate ligament reconstruction: minimum 8.5-year follow-up study. *Arthroscopy* 2004, 20: 129-140.

Gross M, Jaenicke R. Proteins under pressure: the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur J Biochem* 1994, 221: 617-630.

Grover J, Roughley PJ. Versican gene expression in human articular cartilage and comparison of mRNA splicing variation with aggrecan. *Biochem J* 1993, 291: 361-367.

Gu WY, Lai WM, Mow VC. Transport of fluid and ions through a porous-permeable charged-hydrated tissue, and streaming potential data on normal bovine articular cartilage. *J Biomech* 1993, 26: 709-723.

Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, Rosenwasser MP, Mow VC. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* 1994, 12: 474-484.

Hardingham TE. The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem J* 1979, 177: 237-247.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992,6: 861-870.

Hartl FU, Martin J, Neupert W. Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992, 21: 293-322.

Hashiguchi T, Yamaguchi T, Terada S. Cell-substratum adhesion is suppressed by high pressure. *Japanese Journal of Physiology* 1999, 49: 107-112.

Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989, 3: 2042-2051.

Hernigou P, Delephine G, Goutallier D. Infections apres allogreffes osseuses massives dans la chirurgie des tumeurs des membres – Frequence, facteurs favorisants, problemes therapeutiques. *Rev Chir Orthop Reparat Apparat Mot* 1991, 77: 6-13.

Hillmann A, Hoffmann C, Gosheger G, Rodl R, Winkelmann W, Ozaki T. Tumors of the pelvis: complications after reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003, 123: 340-344.

Hite BH. The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull W Va Agr Exp Sta* 1899, 58: 15.

Hofmann C, Schadel-Hopfner M, Berns T, Sitter H, Gotzen L. Influence of processing and sterilization on the mechanical properties of pins made from bovine cortical bone. *Unfallchirurg* 2003, 106: 478-482.

Hofmann GO, Kirschner MH, Wangemann T, Falk C, Mempel W, Hammer C. Infections and immunological hazards of allogeneic bone transplantation. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995, 114: 159-166.

Holmes MH, Lai WM, Mow VC. Singular perturbation analysis of the nonlinear, flow-dependent compressive stress relaxation behavior of articular cartilage. *J Biomech Eng* 1985, 107: 206-218.

Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr, D. Biological effects of high hydrostatic-pressure on food microorganisms. *Food Technology* 1989, 43: 99-107.

Horgan DJ, Kuypers R. Effect of high pressure on the regulation of phosphorylase activity in pre-rigor rabbit muscle. *Meat Sci* 1983, 8: 65-77.

Imoto E, Kakuta S, Hori M, Yagami K, Nagumo M. Adhesion of a chondrocytic cell line (USAC) to Fibronectin and its regulation by proteoglycan. *J Oral Pathol Med* 2002, 31: 35-44.

Junqueira LC, Carneiro J. Knorpel. In: "Histologie", bearbeitet von T. H. Schiebler, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996, 4. Auflage: 180-188.

Jurkiewicz E, Villas Boas M, Silva JL, Weber G, Hunsmann G, Clegg RM. Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 6935-6937.

Jurvelin JS, Arokoski JP, Hunziker EB, Helminen HJ. Topographical variation of the elastic properties of articular cartilage in the canine knee. *J Biomech* 2000, 33: 669-675.

Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi MJ, Goldring MB, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 2319-2324.

Kaneshina S, Ichimori H, Hata T, Matsuki H. Barotropic phase transitions of dioleoylphosphatidylcholine and stearyloleoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1374: 1-8.

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.

Kingsley DH, Hoover DG, Papafragkou E, Richards GP. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *J Food Prot* 2002, 65: 1605-1609.

Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ. Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum* 1987, 30: 801-809.

Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Helminen HJ. Topographical variation of glycosaminoglycan content and cartilage thickness in canine knee (stifle) joint cartilage. Application of the microspectrophotometric method. *J Anat* 1987, 150: 265-276.

Knaepler H, Haas H, Puschel HU. Biomechanical properties of heat and irradiation treated spongiosa. *Unfallchirurgie* 1991, 17: 194-199.

Knaepler H, von Garrel T, Gürtler L. Die allogene Knochentransplantation - eine aktuelle Standortbestimmung. *Dtsch Arztebl* 1994, 91: B-798-802.

Kobori H, Sato M, Tameike A, Hamada K, Shimada S, Osumi M. Ultrastructural effects of pressure stress to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*: A study by immunoelectron microscopy using frozen thin sections. *FEMS Microbiol Lett* 1995, 132: 253-258.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994, 84: 1415-1420.

Korhonen RK, Laasanen MS, Toyras J, Rieppo J, Hirvonen J, Helminen HJ, Jurvelin JS. Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation. *J Biomech* 2002, 35: 903-909.

Ku JL, Smith PA, Goldstein SA, Matthews LS. An experimental investigation of the fate of autogenous autoclaved bone grafts. *Orthop Trans* 1985, 9: 340.

Lai WM, Hou JS, Mow VC. A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. *J Biomech Eng* 1991, 113: 245-258.

Li LP, Soulhat J, Buschmann MD, Shirazi-Adl A. Nonlinear analysis of cartilage in unconfined ramp compression using a fibril reinforced poroelastic model. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 1999, 14: 673-682.

Liang P, MacRae TH. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1997, 110: 1431-1440.

Linn FC, Sokoloff L. Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum* 1965, 44 :481-894.

Little CB, Ghosh P. Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading. *Osteoarthritis Cartilage* 1997 5: 49-62.

Lizard G, Miguet C, Gueldry S, Monier S, Gambert P. Flow cytometry measurement of DNA fragmentation in the course of cell death via apoptosis. New techniques for evaluation of DNA status for the pathologist. *Ann Pathol* 1997, 17: 61-66.

Loeser RF. Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology* 2000, 37: 109-116.

Loeser RF. Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology* 2002, 39: 119-124.

Loo DT, Rillema JR. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 1998, 57: 251-264.

MacDonald AG. The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes. *Philos Trans R Soc Lond B* 1984, 304: 47-68.

Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumours. *Clin Orthop* 1996, 324: 86-97.

Mankin HJ, Thrasher AZ. Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1975, 57: 76-80.

Maroudas A, Schneiderman R. "Free" and "exchangeable" or "trapped" and "non-exchangeable" water in cartilage. *J Orthop Res* 1987, 5: 133-138.

Masson P, Tonello C, Balny C. High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J Biomed Biotech* 2001, 1:2: 85-88.

Matsumoto K, Shionyu M, Go M, Shimizu K, Shinomura T, Kimata K, Watanabe H. Distinct interaction of versican/Pg-M with hyaluronan and link protein. *J Biol Chem* 2003, 278: 41205-41212.

Matsumoto M, Yamaguchi T, Fukumaki Y, Yasunaga R, Terada S. High pressure induces G2 arrest in murine erythroleukemia cells. *J Biochem (Tokyo)* 1998, 123: 87-93.

McClements JM, Patterson MF, Linton M. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J Food Prot* 2001, 64: 514-522.

McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop* 1990, 252: 8-18.

Mentré P, Hamraoui L, Hui Bon Hoa G, Debey P. Pressure-sensitivity of endoplasmatic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. *Cell Mol Biol* 1999, 45: 353-362.

Mentré P, Hui Bon Hoa G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *Int Rev Cytol* 2001, 201: 1-84.

Meyer-Pittroff R. High pressure applications in medicine. Proceedings of the 2nd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Dortmund 2002: Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II. ISBN 3-540-00977-9, Springer 2003: 295-305.

Mishell BB, Shiigi SM. In: *Selected Methods in Cellular Immunology*, Freeman, San Francisco, 1980: 1-27

Mittelmeier H, Mittelmeier W, Gleitz M. Pyrost, a spongius, mineral bone substitute. Experimental bases and 13-year clinical experience in over 1000 cases. *Orthopade* 1998, 27: 126-135.

Mittelmeier W, Braun C, Gradinger R. Defect fractures of the tibia--various forms of bone replacement. *Chirurg* 1996, 67: 1087-1092.

Molina-Gutierrez A, Stippl V, Delgado A, Ganzle MG, Vogel RF. In situ determination of the intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during pressure treatment. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68: 4399-4406.

Moore A, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol* 1998, 57: 265-278.

Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984, 17: 377-394.

Mow VC, Lai WM. Some surface characteristics of articular cartilage. I. A scanning electron microscopy study and a theoretical model for the dynamic interaction of synovial fluid and articular cartilage. *J Biomech* 1974, 7: 449-456.

Mow VC, Ratcliffe A. Structure and Function of Articular Cartilage and Meniscus. In: “*Basic Orthopaedic Biomechanics*”, Ed by Mow VC, Hayes WC. Lippincott-Raven-Verlag Philadelphia New York, 1997, 2nd Edition: 113-177.

Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 1992, 13: 67-97.

Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P, Balny C. High pressure effects on protein structure and function. *Proteins Struct Func Gene* 1996, 24: 81-91.

Muir H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. *Biochem Soc Trans* 1983, 11: 613-622.

Muir H, Bullough P, Maroudas A. The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. *J Bone Joint Surg Br* 1970, 52: 554-563.

Munting E, Wilmart 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.

Nakagami T, Ohno H, Shigehisa T, Otake T, Mori H, Kawahata T, Morimoto M, Ueba N. Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure. *Transfusion* 1996, 36: 475.

Nakagami T, Shigehisa T, Ohmori T, Taji S, Hase A, Kimura T, Yamanishi K. Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *J Virol Methods* 1992, 38: 255-261.

Natarajan M, Bose JC, Rajkumar G. Proximal femoral reconstruction with custom mega prosthesis. *Int Orthop* 2003, 27: 175-179.

Noyes FR, Barber-Westin SD, Rankin M. Meniscal transplantation in symptomatic patients less than fifty years old. *J Bone Joint Surg Am* 2004 86-A: 1392-1404.

Oh S, Moon MJ. Inactivation of *Bacillus cereus* spores by high hydrostatic pressure at different temperatures. *J Food Prot* 2003, 66: 599-603.

Ohmori T, Shigesa T, Taji S, Hayashi R. Biomechanical effects of high hydrostatic pressure on the lysosome and proteases. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992, 56: 1285-1288.

O'Reilly CE, O'Connor PM, Kelly AL, Beresford TP, Murphy PM. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66: 4890-4896.

Pagán R, Mackey RM. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66: 2829-2834.

Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br* 1999, 81: 333-335.

Park CB, Clark DS. Rupture of the cell envelope by decompression of the deep-sea methanogen *Methanococcus jannaschii*. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68: 1458-1463.

Park IH, Kim PT, Ihn JC. Recycling of autogenous bone after intraoperative extracorporeal irradiation. *Abstract book of the 21st Triennial World Congress (18-23 April 1999) SICOT, Sydney, p 520.*

Parkkinen JJ, Lammi MJ, Inkinen R, Jortikka M, Tammi M, Virtanen I, Helminen HJ. Influence of short-term hydrostatic pressure on organization of stress fibers in cultured chondrocytes. *J Orthop Res 1995, 13: 495-502.*

Pelker RR, Friedlaender GE. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin North America 1987, 18: 235-239.*

Perrier-Cornet JM, Hayert M, Gervais P. Yeast mortality related to a high-pressure shift: Occurrence of cell membrane permeabilization. *J Appl Microbiol 1999, 87: 1-7.*

Procter CS, Schmidt MB, Whipple RR, Kelly MA, Mow VC. Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res 1989, 7: 771-782.*

Rasanen T, Messner K. Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. *J Biomed Mater Res 1996, 31: 519-524.*

Rasmussen TJ, Feder SM, Butler DL, Noyes FR. The effects of 4 Mrad of gamma irradiation on the initial mechanical properties of bone-patellar tendon-bone grafts. *Arthroscopy 1994, 10: 188-197.*

Reis O, Winter R, Zerda TW. The effect of high external pressure on DPPC-cholesterol multilamellar vesicles: a pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochim Biophys Acta 1996, 1279: 5-16.*

Reutelingsperger CP, Dumont E, Thimister PW, van Genderen H, Kenis H, van de Eijnde S, Heidendal G, Hofstra L. Visualization of cell death in vivo with the annexin A5 imaging protocol. *J Immunol Methods 2002, 265: 123-132.*

Roach HI, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis 2004, 9: 265-277.*

Rodeo SA, Seneviratne A, Suzuki K, Felker K, Wickiewicz TL, Warren RF. Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 2000, 82-A: 1071-1082.

Roth V, Mow VC. The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg Am* 1980, 62: 1102-1117.

Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res* 1999, 76: 1-20.

Sabo D, Brocai DRC, Eble M, Wannemacher M, Ewerbeck V. Influence of extracorporeal irradiation of autologous grafts of bone and joint. *J Bone Joint Surg (Br)* 1999, 81-B: 276-282.

Sanjay BK, Moreau PG, Younge DA. Reimplantation of autoclaved tumour bone in limb salvage surgery. *Int Orthop* 1997, 21: 291-297.

San Martin MF, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002, 42: 627-645.

Schinagl RM, Gurskis D, Chen AC, Sah RL. Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage. *J Orthop Res* 1997, 15: 499-506.

Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, van Offel JF, Bridts CH, De Clerck LS. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, 11: 681-687.

Setton LA, Mow VC, Muller FJ, Pita JC, Howell DS. Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 1994, 12: 451-463.

Shelton WR, Treacy SH, Dukes AD, Bomboy AL. Use of allografts in knee reconstruction: I. Basic science aspects and current status. *J Am Acad Orthop Surg* 1998, 6: 165-168.

Shi S, Grothe S, Zhang Y, O'Connor-McCourt MD, Poole AR, Roughley PJ, Mort JS. Link protein has greater affinity for versican than aggrecan. *J Biol Chem* 2004, 279: 12060-12066.

Sim FH, Beauchamp CP, Chao EY. Reconstruction of musculoskeletal defects about the knee for tumor. *Clin Orthop Relat Res* 1987, 221: 188-201.

Skaggs DL, Warden WH, Mow VC. Radial tie fibers influence the tensile properties of the bovine medial meniscus. *J Orthop Res* 1994, 12: 176-185.

Smelt JPPM. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci Technol* 1998, 9:152-158.

Smith RA, Ingels J, Lochemes JJ, Dutkowsky JP, Pifer LL. Gamma irradiation of HIV-1. *J Orthop Res* 2001, 19: 815-819.

Speirs AD, Hotz MA, Oxland TR, Haeusler R, Nolte LP. Biomechanical properties of sterilized human auditory ossicles. *J Biomech* 1999, 32: 485-491.

Springfield DS. Allograft reconstructions. *Semin Surg Oncol* 1997, 13: 11-17.

Steinhauser E, Diehl P, Hadaller M, Schauwecker J, Busch R, Gradinger R, Mittelmeier W. Biomechanical investigation of the effect of high hydrostatic pressure treatment on the mechanical properties of human bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006, 76: 130-135.

Stephan JS, McLaughlin RM Jr, Griffith G. Water content and glycosaminoglycan disaccharide concentration of the canine meniscus. *Am J Vet Res* 1998, 59: 213-216.

Sugimoto M, Takahashi S, Toguchida J, Kotoura Y, Shibamoto Y, Yamamuro T. Changes in bone after high-dose irradiation. Biomechanics and histomorphology. *J Bone Joint Surg Br* 1991, 73: 492-497.

Sys G, Uyttendaele D, Poffyn B, Verdonk R, Verstraete L. Extracorporeally irradiated autografts in pelvic reconstruction after malignant tumour resection. *Int Orthop* 2002, 26: 174-178.

Takahashi K, Kubo T, Arai Y, Kitajima I, Takigawa M, Imanishi J, Hirasawa Y. Hydrostatic pressure induces expression of interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha mRNA's in a chondrocyte-like cell line. *Ann Rheum Diss* 1998, 57: 231-236.

Takahashi K, Kubo T, Kobayashi K, Imanishi J, Takigawa M, Arai Y, Hirasawa Y. Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like cell line. *J Orthop Res* 1997, 15: 150-158.

Takano KJ, Takano T, Yamanouchi Y, Satou T. Pressure-induced apoptosis in human lymphoblasts. *Exp Cell Res* 1997, 235: 155-160.

Take J, Yamaguchi T, Mine N, Terada S. Caspase activation in high-pressure-induced apoptosis of murine erythroleukemia cells. *Jpn J Physiol* 2001, 51: 193-199.

Ulmer HM, Herberhold H, Fahsel S, Ganzle MG, Winter R, Vogel RF. Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68: 1088-1095.

van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, 10: 631-637.

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998, 31: 1-9.

van Laere K, Casier K, Uyttendaele D, Mondelaers W, De Sadeleer C, Simons M, Dierckx R. Technetium-99m-MDP scintigraphy and long-term follow-up of treated primary malignant bone tumors. *J Nucl Med* 1998,39: 1563-1569.

Verdonk R. Meniscal transplantation. *Acta Orthop Belg* 2002, 68: 118-127.

Viceconti M, Toni A, Brizio L, Rubbini L, Borrelli A. The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone. *Chir Organi Mov* 1996, 81: 63-68.

Vigh L, Los DA, Horvath I, Murata N. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 9090-9094.

Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G, Schmit-Neuerburg KP. Extracorporeal irradiation and incorporation of bone grafts. Autogeneic cortical grafts studied in rats. *Acta Orthop Scand* 1996, 67: 583-588.

Wachtel E, Maroudas A, Schneiderman R. Age-related changes in collagen packing of human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1243: 239-243.

Wada Y, Amiel M, Harwood F, Moriya H, Amiel D. Architectural remodeling in deep frozen meniscal allografts after total meniscectomy. *Arthroscopy* 1998, 14: 250-257.

Weemaes CA, Ludikhuyze LR, van den Broeck I, Hendrickx ME. Effect of pH on pressure and thermal inactivation of avocado polyphenol oxidase: a kinetic study. *J Agric Food Chem* 1998, 46: 2785-2792.

Weiss RE, Reddi AH. Synthesis and localization of Fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77: 2074-2078.

Weiss RE, Reddi AH. Appearance of Fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow. *J Cell Biol* 1981, 88: 630-636.

Westacott CI, Urban JP, Goldring MB, Elson CJ. The effects of pressure on chondrocyte tumour necrosis factor receptor expression. *Biorheology* 2002, 39: 125-132.

Weyts FA, Bos PK, Dinjens WN, van Doorn WJ, van Biezen FC, Weinans H, Verhaar JA. Living cells in 1 of 2 frozen femoral heads. *Acta Orthop Scand* 2003, 74: 661-664.

White DG, Hershey HP, Moss JJ, Daniels H, Tuan RS, Bennett VD. Functional analysis of Fibronectin isoforms in chondrogenesis: Full-length recombinant mesenchymal Fibronectin reduces spreading and promotes condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells. *Differentiation* 2003, 71: 251-261.

Wilson Jr RG, Trogadis JE, Zimmerman S, Zimmerman AM. Hydrostatic pressure induced changes in the cytoarchitecture of pheochromocytoma (PC-12) cells. *Cell Biol Int* 2001, 25: 649-665.

Wong PT, Heremans K. Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange in chymotrypsinogen: A Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* 1988, 956: 1-9.

Wouters PC, Galaasker E, Smelt JPPM. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64: 509-514.

Wuytack EY, Diels AM, Michiels CW. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol* 2002, 77: 205-212.

Yahia LH, Drouin G, Zukor D. The irradiation effect on the initial mechanical properties of meniscal grafts. *Biomed Mater Eng* 1993, 3: 211-221.

Yamaguchi T, Kuranoshita K, Fujii M, Yokokawa Y, Kimoto E. Inhibition of the proliferation of Ehrlich ascites tumor cells by hydrostatic pressure. *Cancer Biochemistry Biophysics* 1997, 15: 257-261.

Yasui K. Three-dimensional architecture of human normal menisci. *J Jpn Orthop Assoc* 1978, 52: 391-399.

Zhang Y, Cao L, Kiani C, Yang BL, Hu W, Yang BB. Promotion of chondrocyte proliferation by versican mediated by G1 domain and EGF-like motifs. *J Cell Biochem* 1999, 73: 445-457.

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* 2002, 56: 121-128.

7. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Reiner Gradinger für die Forschungsmöglichkeit an der Orthopädischen und Sportorthopädischen Klinik der Technischen Universität München bedanken. Für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für Hinweise und Anregungen geht gleicher Dank an Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Mittelmeier.

Ganz besonderer Dank gilt meinen wissenschaftlichen Betreuern Herrn Dr. med. Peter Diehl und Herrn Dr. med. Johannes Schauwecker, die mich unermüdlich mit Hilfe und Tatkraft unterstützten.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Manfred Schmitt für Hinweise und konstruktive Anregungen im zellbiologischen Arbeitsteil, sowie Frau Jutta Tübel, für die immer zuverlässigen und kompetenten Ratschläge und die stete Hilfsbereitschaft. Ebenso möchte ich Herrn Dr. ing. Erwin Steinhauser für Anregungen und für die ausgezeichnete Einarbeitung in die biomechanischen Aspekte der Arbeit und Frau Dipl.-Agr. Karin Mengele für die Unterstützung bei den Fluoreszenzmessungen danken.

Großer Dank geht auch an Herrn PD Dr. med. Stefan Milz für hilfreiche Ratschläge und die hervorragende Einarbeitung in den immunhistochemischen Arbeitsteil. Weiterer Dank geht an Frau PD Dr. Ute Reuning für die Hilfe Unterstützung bei den konfokalen Lasermikroskop-Aufnahmen, sowie an den Fleischgroßhandel Anzenberger für die freundliche Überlassung der Rinderkniegelenke.

Größter Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium und vieles mehr ermöglicht haben.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AN	Annexin V
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMV	Cytomegalie Virus
DAB	Diaminobenzidin
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
F _{max}	Maximalkraft
FN	Fibronektin
Gy, kGy	Gray, Kilogray
HHD	hydrostatischer Hochdruck
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
Hsp	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes Simplex Virus
HVA	Hepatitis Virus A
IU/ml	International Units pro Milliliter
LC, LM	Lateraler Kondylus, Lateraler Meniskus
max.	maximal
MC, MM	Medialer Kondylus, Medialer Meniskus
Mio	Million
mM, M	Millimol, Mol
MPa	Megapascal

Mrads	Mega- „radiation absorbed dose“ (100 rad = 1 Gy)
µg, mg, g	Mikrogramm, Milligramm, Gramm
µl, ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
N	Newton
nm, µm, mm, m	Nanometer, Mikrometer, Millimeter, Meter
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
s, min, h, d	Sekunden, Minuten, Stunden, Tage
s.	siehe
s. o.	siehe oben
STA	Standardabweichung
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TUNEL	Terminal desoxyribosyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

8.2 Einzelne Messergebnisse des Trypanblau-Tests

Tabelle 1: Chondrozyten in Suspension nach HHD-Behandlung (Versuche 1-4).

Versuch 1													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	52	55	45	50,7	0,633	16	175	4	8	6	6,0	0,075
2	0	38	47	40	41,7	0,521	17	175	3	1	4	2,7	0,033
3	0	44	42	41	42,3	0,529	18	175	4	3	2	3,0	0,038
4	50	46	38	40	41,3	0,517	19	200	2	1	2	1,7	0,021
5	50	33	42	38	37,7	0,471	20	200	2	2	0	1,3	0,017
6	50	41	42	41	41,3	0,517	21	200	1	1	3	1,7	0,021
7	100	42	41	39	40,7	0,508	22	225	0	0	0	0,0	0,000
8	100	40	44	39	41,0	0,513	23	225	0	0	0	0,0	0,000
9	100	43	37	37	39,0	0,488	24	225	0	0	0	0,0	0,000
10	125	25	26	25	25,3	0,317	25	250	0	0	0	0,0	0,000
11	125	38	40	32	36,7	0,458	26	250	0	0	0	0,0	0,000
12	125	35	39	33	35,7	0,446	27	250	0	0	0	0,0	0,000
13	150	28	34	30	30,7	0,383							
14	150	29	30	25	28,0	0,350							
15	150	26	29	34	29,7	0,371							

Versuch 2													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	34	37	38	36,3	0,454	16	175	19	14	17	16,7	0,208
2	0	42	34	37	37,7	0,471	17	175	13	19	12	14,7	0,183
3	0	37	36	38	37,0	0,463	18	175	14	14	8	12,0	0,150
4	50	43	42	36	40,3	0,504	19	200	1	1	2	1,3	0,017
5	50	42	40	39	40,3	0,504	20	200	1	1	3	1,7	0,021
6	50	43	35	38	38,7	0,483	21	200	3	2	2	2,3	0,029
7	100	38	42	40	40,0	0,500	22	225	0	0	0	0,0	0,000
8	100	38	37	39	38,0	0,475	23	225	0	0	0	0,0	0,000
9	100	43	34	45	40,7	0,508	24	225	0	0	0	0,0	0,000
10	125	34	36	32	34,0	0,425	25	250		0	0	0,0	0,000
11	125	28	35	33	32,0	0,400	26	250	0	0	0	0,0	0,000
12	125	37	35	32	34,7	0,433	27	250	0	0	0	0,0	0,000
13	150	20	25	20	21,7	0,271							
14	150	14	16	15	15,0	0,188							
15	150	20	18	18	18,7	0,233							

Versuch 3													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	39	48	42	43,0	0,538	16	175	1	0	3	1,3	0,017
2	0	45	28	40	37,7	0,471	17	175	1	2	2	1,7	0,021
3	0	52	34	38	41,3	0,517	18	175	2	2	1	1,7	0,021
4	50	42	40	39	40,3	0,504	19	200	0	0	1	0,3	0,004
5	50	39	40	44	41,0	0,513	20	200	1	0	1	0,7	0,008
6	50	39	37	42	39,3	0,492	21	200	0	0	0	0,0	0,000
7	100	45	41	39	41,7	0,521	22	225	0	0	0	0,0	0,000
8	100	34	42	38	38,0	0,475	23	225	0	0	0	0,0	0,000
9	100	48	37	36	40,3	0,504	24	225	0	0	0	0,0	0,000
10	125	35	32	31	32,7	0,408	25	250	0	0	0	0,0	0,000
11	125	42	31	34	35,7	0,446	26	250	0	0	0	0,0	0,000
12	125	65	65	32	54,0	0,675	27	250	0	0	0	0,0	0,000
13	150	22	20	21	21,0	0,263							
14	150	26	13	22	20,3	0,254							
15	150	29	24	20	24,3	0,304							

Versuch 4													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	41	44	38	41,0	0,513	16	175	3	2	4	3,0	0,038
2	0	34	29	38	33,7	0,421	17	175	5	9	7	7,0	0,088
3	0	44	40	45	43,0	0,538	18	175	5	4	5	4,7	0,058
4	50	48	43	36	42,3	0,529	19	200	1	2	2	1,7	0,021
5	50	39	46	40	41,7	0,521	20	200	4	0	1	1,7	0,021
6	50	45	37	42	41,3	0,517	21	200	0	3	2	1,7	0,021
7	100	44	40	37	40,3	0,504	22	225	0	0	0	0,0	0,000
8	100	44	40	40	41,3	0,517	23	225	0	0	0	0,0	0,000
9	100	38	38	41	39,0	0,488	24	225	0	0	0	0,0	0,000
10	125	38	38	35	37,0	0,463	25	250	0	0	0	0,0	0,000
11	125	31	28	40	33,0	0,413	26	250	0	0	0	0,0	0,000
12	125	34	45	31	36,7	0,458	27	250	0	0	0	0,0	0,000
13	150	31	28	34	31,0	0,388							
14	150	33	25	27	28,3	0,354							
15	150	30	27	33	30,0	0,375							

Tabelle 2: Chondrosarkomzellen in Suspension nach HHD-Behandlung (Versuche 5-8).

Versuch 5													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	41	44	39	41,3	0,517	22	175	9	11	10	10,0	0,125
2	0	38	50	40	42,7	0,533	23	175	5	4	6	5,0	0,063
3	0	35	48	42	41,7	0,521	24	175	6	6	6	6,0	0,075
4	50	40	40	38	39,3	0,492	25	200	5	1	9	5,0	0,063
5	50	45	39	37	40,3	0,504	26	200	7	8	3	6,0	0,075
6	50	35	39	42	38,7	0,483	27	200	6	6	5	5,7	0,071
7	100	39	38	38	38,3	0,479	28	250	2	1	1	1,3	0,017
8	100	32	35	37	34,7	0,433	29	250	0	3	1	1,3	0,017
9	100	35	35	36	35,3	0,442	30	250	3	3	1	2,3	0,029
10	125	32	38	34	34,7	0,433	31	300	0	1	1	0,7	0,008
11	125	42	31	36	36,3	0,454	32	300	0	0	0	0,0	0,000
12	125	40	28	32	33,3	0,417	33	300	0	1	0	0,3	0,004
16	150	28	21	29	26,0	0,325	34	350	0	0	0	0,0	0,000
17	150	27	30	25	27,3	0,342	35	350	0	0	0	0,0	0,000
18	150	32	18	27	25,7	0,321	36	350	0	0	0	0,0	0,000
19	165	22	10	25	19,0	0,238							
20	165	19	21	17	19,0	0,238							
21	165	12	16	15	14,3	0,179							

Versuch 6													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	46	52	48	48,7	0,608	22	175	10	5	7	7,3	0,092
2	0	32	32	44	36,0	0,450	23	175	11	5	8	8,0	0,100
3	0	48	43	44	45,0	0,563	24	175	6	10	3	6,3	0,079
4	50	25	40	40	35,0	0,438	25	200	5	3	1	3,0	0,038
5	50	35	42	40	39,0	0,488	26	200	4	4	6	4,7	0,058
6	50	46	49	40	45,0	0,563	27	200	2	2	5	3,0	0,038
7	100	44	40	41	41,7	0,521	28	250	1	2	0	1,0	0,013
8	100	28	47	35	36,7	0,458	29	250	2	0	1	1,0	0,013
9	100	42	32	36	36,7	0,458	30	250	3	0	1	1,3	0,017
10	125	32	32	39	34,3	0,429	31	300	2	1	0	1,0	0,013
11	125	31	33	39	34,3	0,429	32	300	0	0	1	0,3	0,004
12	125	30	40	35	35,0	0,438	33	300	0	1	0	0,3	0,004
16	150	33	17	22	24,0	0,300	34	350	0	0	0	0,0	0,000
17	150	26	27	29	27,3	0,342	35	350	0	0	0	0,0	0,000
18	150	20	22	25	22,3	0,279	36	350	0	0	0	0,0	0,000
19	165	21	14	17	17,3	0,217							
20	165	18	20	22	20,0	0,250							
21	165	17	19	19	18,3	0,229							

Versuch 7													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	46	28	38	37,3	0,467	22	175	8	9	8	8,3	0,104
2	0	33	57	41	43,7	0,546	23	175	12	5	7	8,0	0,100
3	0	46	33	41	40,0	0,500	24	175	8	8	5	7,0	0,088
4	50	29	49	42	40,0	0,500	25	200	4	4	5	4,3	0,054
5	50	37	33	44	38,0	0,475	26	200	6	2	5	4,3	0,054
6	50	38	35	38	37,0	0,463	27	200	5	5	4	4,7	0,058
7	100	38	30	35	34,3	0,429	28	250	2	0	2	1,3	0,017
8	100	31	41	38	36,7	0,458	29	250	2	3	1	2,0	0,025
9	100	38	37	38	37,7	0,471	30	250	1	2	3	2,0	0,025
10	125	38	37	38	37,7	0,471	31	300	0	1	0	0,3	0,004
11	125	31	33	39	34,3	0,429	32	300	2	1	0	1,0	0,013
12	125	32	32	36	33,3	0,417	33	300	0	2	1	1,0	0,013
16	150	19	23	22	21,3	0,267	34	350	0	0	0	0,0	0,000
17	150	44	32	30	35,3	0,442	35	350	0	0	0	0,0	0,000
18	150	25	28	26	26,3	0,329	36	350	0	0	0	0,0	0,000
19	165	20	24	20	21,3	0,267							
20	165	17	22	19	19,3	0,242							
21	165	15	25	18	19,3	0,242							

Versuch 8													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	42	49	36	42,3	0,529	22	175	4	6	4	4,7	0,058
2	0	45	34	46	41,7	0,521	23	175	3	5	4	4,0	0,050
3	0	35	44	41	40,0	0,500	24	175	9	8	6	7,7	0,096
4	50	47	34	40	40,3	0,504	25	200	3	4	5	4,0	0,050
5	50	54	46	34	44,7	0,558	26	200	3	0	2	1,7	0,021
6	50	38	36	33	35,7	0,446	27	200	4	3	3	3,3	0,042
7	100	40	41	44	41,7	0,521	28	250	2	0	0	0,7	0,008
8	100	33	34	31	32,7	0,408	29	250	2	3	0	1,7	0,021
9	100	38	52	32	40,7	0,508	30	250	2	2	3	2,3	0,029
10	125	34	33	34	33,7	0,421	31	300	1	1	0	0,7	0,008
11	125	37	34	39	36,7	0,458	32	300	0	1	1	0,7	0,008
12	125	29	38	34	33,7	0,421	33	300	0	2	0	0,7	0,008
16	150	42	35	24	33,7	0,421	34	350	0	0	0	0,0	0,000
17	150	31	34	25	30,0	0,375	35	350	0	0	0	0,0	0,000
18	150	23	30	29	27,3	0,342	36	350	0	0	0	0,0	0,000
19	165	15	16	14	15,0	0,188							
20	165	19	15	22	18,7	0,233							
21	165	18	24	20	20,7	0,258							

Tabelle 3: Adhärenente Chondrozyten nach HHD-Behandlung (Versuche 9-12).

Versuch 9													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	16	13	18	15,7	0,078	10	125	7	11	12	10,0	0,050
2	0	10	16	22	16,0	0,080	11	125	13	8	10	10,3	0,052
3	0	19	23	20	20,7	0,103	12	125	10	9	9	9,3	0,047
4	50	18	15	15	16,0	0,080	13	150	3	3	1	2,3	0,012
5	50	14	17	12	14,3	0,072	14	150	1	1	2	1,3	0,007
6	50	11	18	13	14,0	0,070	15	150	0	4	2	2,0	0,010
7	100	12	10	9	10,3	0,052	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	14	11	11	12,0	0,060	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	13	13	12	12,7	0,063	18	200	0	0	0	0,0	0,000

Versuch 10													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	23	18	18	19,7	0,098	10	125	14	7	11	10,7	0,053
2	0	19	11	22	17,3	0,087	11	125	7	10	10	9,0	0,045
3	0	20	18	22	20,0	0,100	12	125	8	7	14	9,7	0,048
4	50	15	22	17	18,0	0,090	13	150	0	0	0	0,0	0,000
5	50	17	18	18	17,7	0,088	14	150	0	1	0	0,3	0,002
6	50	14	19	20	17,7	0,088	15	150	0	0	0	0,0	0,000
7	100	23	28	20	23,7	0,118	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	15	11	16	14,0	0,070	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	16	14	15	15,0	0,075	18	200	0	0	0	0,0	0,000

Versuch 11													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	16	23	19	19,3	0,097	10	125	5	4	6	5,0	0,025
2	0	23	16	18	19,0	0,095	11	125	4	2	5	3,7	0,018
3	0	22	26	21	23,0	0,115	12	125	3	7	4	4,7	0,023
4	50	20	23	20	21,0	0,105	13	150	3	2	6	3,7	0,018
5	50	26	21	18	21,7	0,108	14	150	4	1	2	2,3	0,012
6	50	19	22	20	20,3	0,102	15	150	5	0	6	3,7	0,018
7	100	15	25	18	19,3	0,097	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	16	21	19	18,7	0,093	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	17	19	20	18,7	0,093	18	200	0	0	0	0,0	0,000

Versuch 12													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	20	15	18	17,7	0,088	10	125	8	8	7	7,7	0,038
2	0	18	13	19	16,7	0,083	11	125	3	4	7	4,7	0,023
3	0	21	17	19	19,0	0,095	12	125	5	6	5	5,3	0,027
4	50	18	17	17	17,3	0,087	13	150	2	1	1	1,3	0,007
5	50	14	16	17	15,7	0,078	14	150	3	0	2	1,7	0,008
6	50	20	15	19	18,0	0,090	15	150	1	0	0	0,3	0,002
7	100	12	16	16	14,7	0,073	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	13	10	17	13,3	0,067	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	11	12	14	12,3	0,062	18	200	0	0	0	0,0	0,000

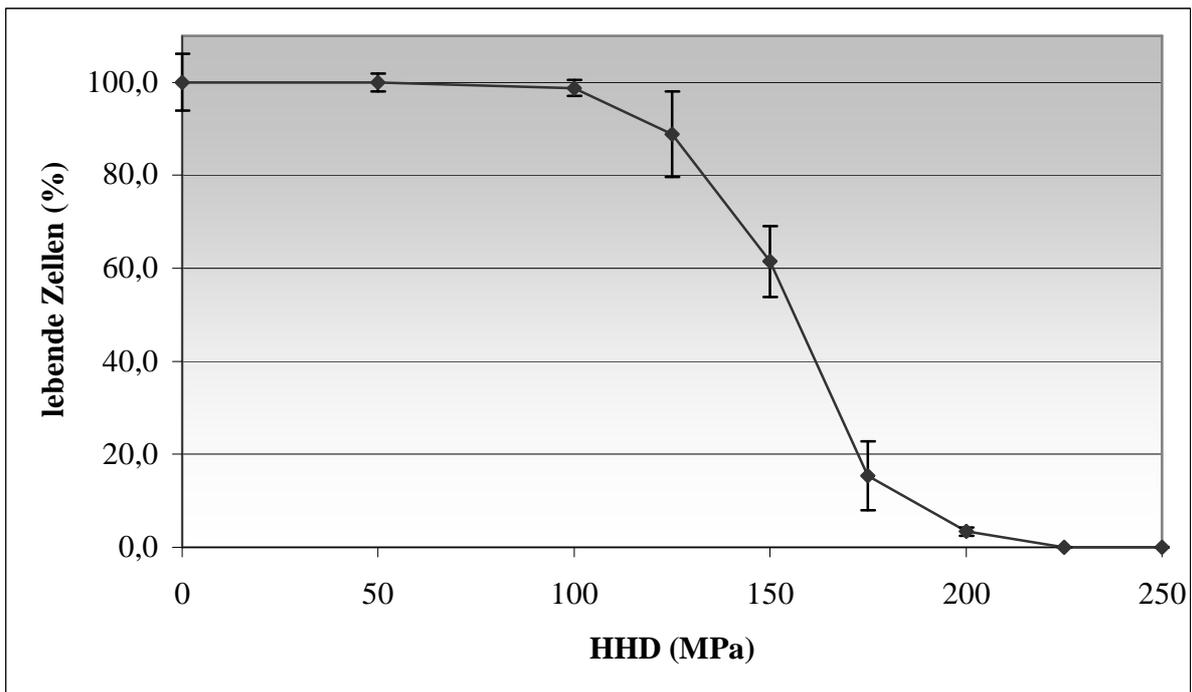
Tabelle 4: Adhärente Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (Versuche 13-16).

Versuch 13													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	17	18	17	17,3	0,087	10	125	7	6	8	7,0	0,035
2	0	19	22	18	19,7	0,098	11	125	9	5	12	8,7	0,043
3	0	18	24	20	20,7	0,103	12	125	11	12	8	10,3	0,052
4	50	17	16	12	15,0	0,075	13	150	0	1	1	0,7	0,003
5	50	19	23	21	21,0	0,105	14	150	0	0	2	0,7	0,003
6	50	17	15	16	16,0	0,080	15	150	3	1	0	1,3	0,007
7	100	18	15	14	15,7	0,078	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	13	14	14	13,7	0,068	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	22	15	14	17,0	0,085	18	200	0	0	0	0,0	0,000

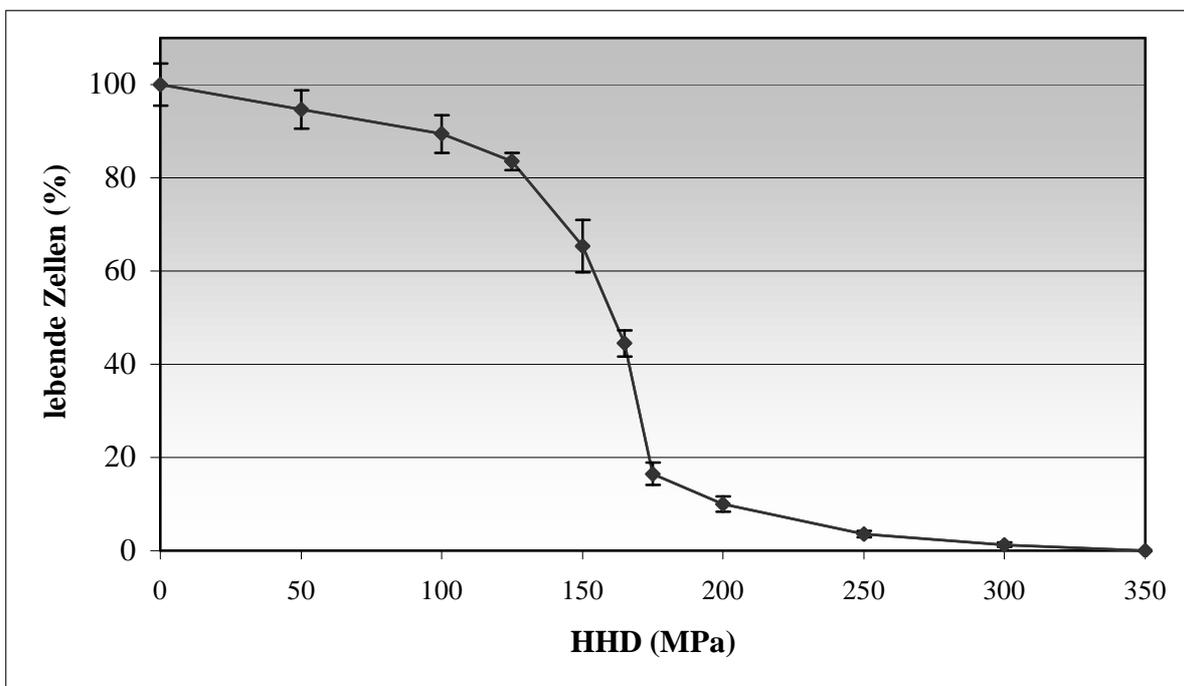
Versuch 14													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	19	26	24	23,0	0,115	10	125	7	10	13	10,0	0,050
2	0	22	23	21	22,0	0,110	11	125	9	3	12	8,0	0,040
3	0	14	25	26	21,7	0,108	12	125	4	11	9	8,0	0,040
4	50	20	18	15	17,7	0,088	13	150	0	1	1	0,7	0,003
5	50	19	23	21	21,0	0,105	14	150	2	0	1	1,0	0,005
6	50	17	20	20	19,0	0,095	15	150	5	1	4	3,3	0,017
7	100	25	17	16	19,3	0,097	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	15	19	16	16,7	0,083	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	21	14	17	17,3	0,087	18	200	0	0	0	0,0	0,000

Versuch 15													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	24	22	21	22,3	0,112	10	125	8	12	11	10,3	0,052
2	0	19	23	22	21,3	0,107	11	125	10	9	10	9,7	0,048
3	0	18	26	20	21,3	0,107	12	125	5	9	11	8,3	0,042
4	50	21	23	17	20,3	0,102	13	150	1	2	1	1,3	0,007
5	50	20	19	22	20,3	0,102	14	150	4	0	1	1,7	0,008
6	50	24	21	22	22,3	0,112	15	150	0	3	0	1,0	0,005
7	100	18	18	19	18,3	0,092	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	15	13	19	15,7	0,078	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	21	14	16	17,0	0,085	18	200	0	0	0	0,0	0,000

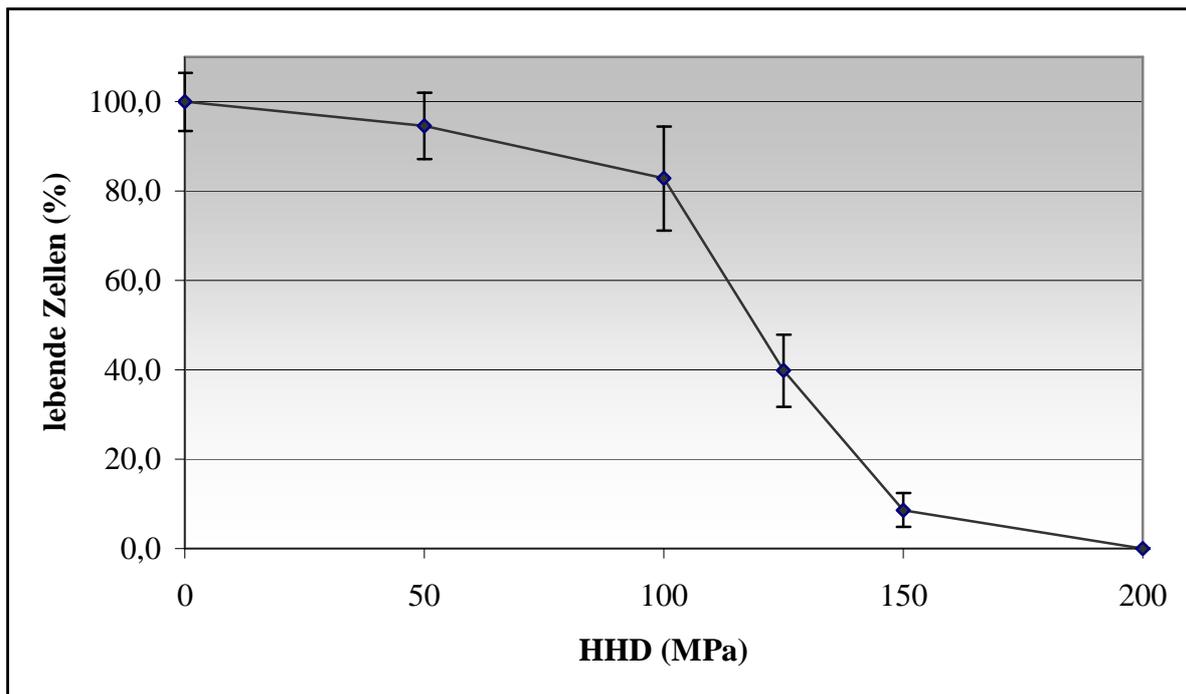
Versuch 16													
Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml	Probe	Druck	Zellen lebend			Mittelwert	Mio/ml
1	0	17	17	19	17,7	0,088	10	125	10	12	14	12,0	0,060
2	0	13	20	18	17,0	0,085	11	125	8	11	11	10,0	0,050
3	0	15	18	21	18,0	0,090	12	125	9	15	9	11,0	0,055
4	50	17	24	16	19,0	0,095	13	150	0	2	1	1,0	0,005
5	50	23	19	15	19,0	0,095	14	150	0	0	0	0,0	0,000
6	50	20	18	17	18,3	0,092	15	150	1	0	1	0,7	0,003
7	100	14	20	19	17,7	0,088	16	200	0	0	0	0,0	0,000
8	100	13	13	22	16,0	0,080	17	200	0	0	0	0,0	0,000
9	100	15	18	18	17,0	0,085	18	200	0	0	0	0,0	0,000



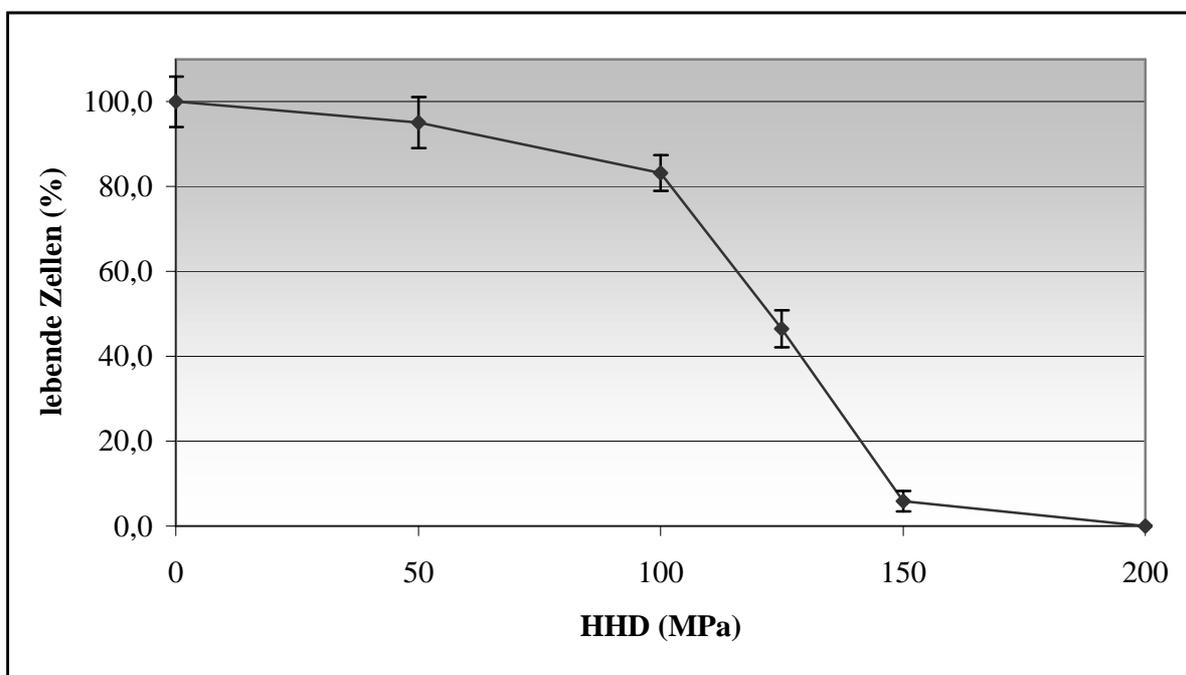
Grafik 1: Chondrozyten in Suspension nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest. Der größte Abfall der Überlebensrate zeigt sich zwischen 125 und 175 MPa. Ab 225 MPa sind wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachweisbar.



Grafik 2: Chondrosarkomzellen in Suspension nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest. Der größte Abfall der Überlebensrate zeigt sich zwischen 125 und 175 MPa. Ab 350 MPa sind wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachweisbar.



Grafik 3: Adhärenente Chondrozyten nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest. Der größte Abfall der Überlebensrate zeigt sich zwischen 100 und 150 MPa. Ab 200 MPa sind wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachweisbar.



Grafik 4: Adhärenente Chondrosarkomzellen nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest. Der größte Abfall der Überlebensrate zeigt sich zwischen 100 und 150 MPa. Ab 200 MPa sind wiederholt keine lebenden Zellen mehr nachweisbar.

8.4 Einzelne Messergebnisse der FACS-Messungen

Tabelle 5: Chondrozyten nach HHD-Behandlung. AN=Annexin, PI=Propidiumiodid.

Versuch 1						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	nur PI in %
0	97,01	0,94	0,53	1,52	2,44	2,05
50	96,98	0,95	0,58	1,49	2,48	2,07
100	95,66	1,04	0,54	2,76	3,76	3,3
150	48,57	4,6	7,14	39,69	44,24	46,83
200	0,44	3,81	4,64	91,11	94,81	95,75

Versuch 2						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	PI-pos. in %
0	97,24	0,75	0,55	1,45	2,17	2
50	96,72	0,77	0,71	1,79	2,54	2,5
100	95,89	1	0,64	2,48	3,47	3,12
150	48,38	4,68	5,62	41,32	45,9	46,94
200	0,5	3,38	4,14	91,99	95,26	96,12

Versuch 3						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	PI-pos. in %
0	93,29	4,45	0,6	1,66	6,21	2,37
50	92,57	4,78	0,58	2,07	6,91	2,83
100	92,66	3,88	0,95	2,52	7,59	3,62
150	41,57	7,98	9,23	41,22	49,11	50,45
200	0,44	4,03	5,75	89,78	93,69	95,53

Versuch 4						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	PI-pos. in %
0	97,4	0,7	0,6	1,3	1,97	1,9
50	97,76	0,67	0,39	1,19	1,84	1,58
100	95,38	1,23	0,57	2,83	4,03	3,4
150	52,92	5,69	2,49	38,9	44,55	41,39
200	0,53	2,58	2,21	94,67	97,17	96,88

Tabelle 6: Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung. AN=Annexin, PI=Propidiumiodid.

Versuch 1						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	nur PI in %
0	93,33	3,50	1,24	1,93	7,76	3,52
50	93,82	2,46	1,27	2,45	6,16	4,17
100	94,45	1,53	2,24	1,78	10,10	4,49
150	12,56	7,24	2,59	77,61	85,50	77,99
200	5,87	6,80	2,18	85,15	90,22	82,85

Versuch 2						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	PI-pos. in %
0	84,26	5,19	1,78	8,77	12,93	8,77
50	81,07	5,64	3,18	10,11	13,72	10,48
100	74,35	8,04	4,37	13,24	21,94	17,17
150	28,07	8,72	3,25	59,96	69,99	64,31
200	6,84	21,38	11,93	59,84	61,44	66,37

Versuch 3						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	PI-pos. in %
0	85,26	4,96	1,88	7,68	13,32	9,88
50	87,11	3,28	3,67	5,94	9,93	11,35
100	73,98	8,32	4,76	12,94	21,87	16,17
150	23,56	10,35	2,80	63,29	73,71	66,68
200	3,47	15,11	1,59	79,83	97,46	83,84

Versuch 4						
Druck MPa	Vital in %	AN-pos. in %	PI-pos. in %	AN-/PI-pos. in %	nur AN in %	PI-pos. in %
0	77,39	7,59	4,70	10,32	16,36	13,80
50	76,47	7,36	7,67	8,50	11,20	12,94
100	65,49	14,98	5,09	14,44	27,21	19,24
150	14,50	8,10	3,22	74,19	79,47	76,92
200	4,99	8,91	1,04	85,06	91,56	86,17

8.4 Lichtmikroskopische Morphologie von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen nach Hochdruckbehandlung.

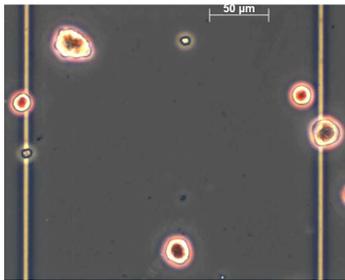


Abb. 1: Chondrozyten in Suspension. Nach 100 MPa.

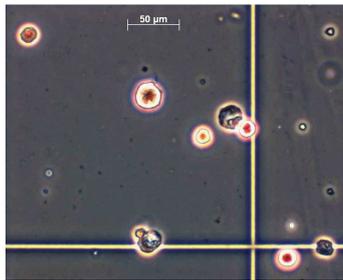


Abb. 2: Chondrozyten in Suspension. Nach 150 MPa.

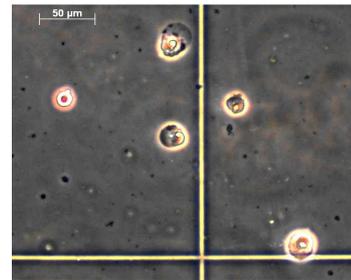


Abb. 3: Chondrozyten in Suspension. Nach 200 MPa.

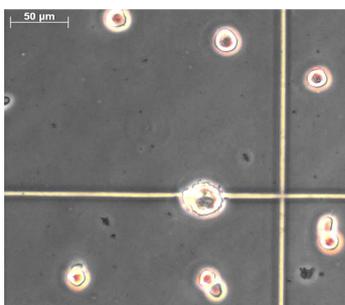


Abb. 4: Chondrosarkomzellen in Suspension. Nach 100 MPa.

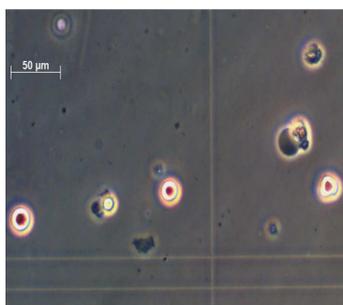


Abb. 5: Chondrosarkomzellen in Suspension. Nach 200 MPa.

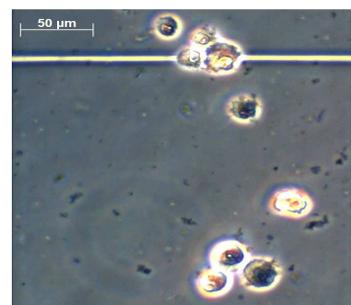


Abb. 6: Chondrosarkomzellen in Suspension. Nach 250 MPa.

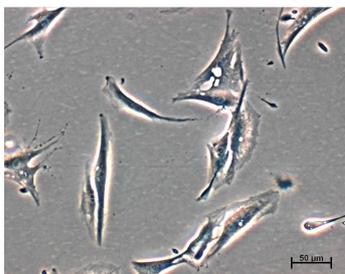


Abb. 7: Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 50 MPa.

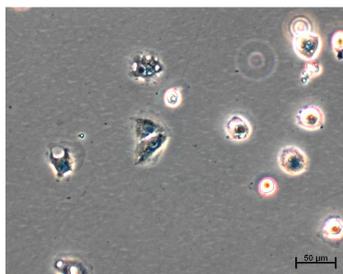


Abb. 8: Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 150 MPa.

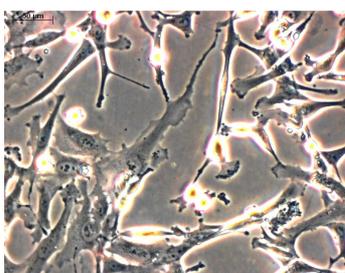


Abb. 9: Rekultivierte Chondrosarkomzellen. 24 h nach Inkubation bei 50 MPa.

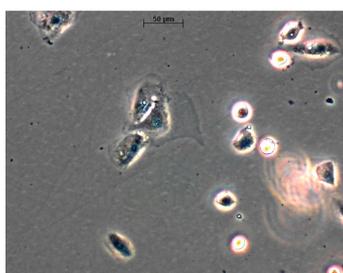


Abb. 10: Rekultivierte Chondrosarkomzellen. 24 h nach Inkubation bei 150

8.5 Einzelne Messergebnisse der biomechanischen Knorpel-Testung

Tabelle 7: Lateral Meniscus (LM) nach HHD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.

LM 0															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	16,27	21,39	22,85	23,63	24,37	3,11	3,84	4,22	4,43	4,62	0,57	0,48	0,41	0,39	0,38
2	14,53	17,94	19,66	21,15	22,39	2,95	3,73	4,13	4,40	4,56	0,63	0,50	0,44	0,41	0,38
3	19,32	22,45	23,27	23,38	24,16	3,71	4,35	4,64	4,83	4,98	0,45	0,39	0,36	0,35	0,34
4	18,61	21,71	22,59	23,49	23,91	3,59	4,42	4,72	4,92	5,08	0,46	0,43	0,40	0,37	0,35
5	17,50	21,29	22,39	22,98	23,23	3,30	4,15	4,53	4,75	4,92	0,52	0,44	0,41	0,39	0,38
6	18,39	21,94	23,10	23,46	24,34	3,72	4,39	4,67	4,84	4,95	0,54	0,45	0,41	0,39	0,37
7	17,05	21,78	23,48	24,49	25,25	3,73	4,40	4,68	4,86	5,02	0,58	0,47	0,43	0,40	0,38
8	16,86	21,52	22,96	23,52	24,02	3,45	4,28	4,66	4,89	5,06	0,52	0,39	0,36	0,35	0,34
9	21,07	25,51	27,39	28,45	29,34	3,85	4,47	4,73	4,95	5,06	0,47	0,39	0,35	0,33	0,31
10	17,37	21,26	22,94	24,10	24,86	3,57	4,32	4,73	4,92	5,06	0,53	0,47	0,42	0,39	0,38

LM 300															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	15,03	18,50	20,21	21,64	23,58	3,42	4,03	4,31	4,51	4,63	0,63	0,57	0,50	0,43	0,40
2	15,44	19,31	20,54	21,52	22,86	3,38	4,07	4,32	4,48	4,63	0,71	0,54	0,50	0,47	0,44
3	17,03	22,33	23,94	24,38	25,23	3,22	4,09	4,48	4,71	4,87	0,51	0,37	0,34	0,33	0,32
4	18,65	23,19	24,32	25,99	26,30	3,61	4,29	4,53	4,69	4,88	0,54	0,38	0,36	0,34	0,33
5	20,69	23,84	24,68	25,82	26,43	3,77	4,41	4,67	4,86	5,01	0,43	0,38	0,35	0,34	0,34
6	18,87	22,30	23,20	23,88	25,00	3,60	4,42	4,79	4,99	5,14	0,50	0,42	0,39	0,37	0,36
7	21,69	24,35	25,41	26,32	27,07	3,92	4,58	4,84	5,01	5,13	0,41	0,37	0,34	0,33	0,32
8	22,09	25,32	26,09	26,82	27,70	4,14	4,66	4,92	5,05	5,13	0,41	0,38	0,36	0,34	0,33
9	20,49	22,73	23,54	24,06	24,51	4,73	5,15	5,33	5,47	5,56	0,43	0,40	0,38	0,37	0,36
10	14,06	17,50	18,16	18,78	19,13	4,20	4,91	5,12	5,24	5,33	0,62	0,51	0,48	0,47	0,45

LM 600															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	20,41	22,01	23,24	23,89	24,64	4,13	4,59	4,81	4,97	5,14	0,46	0,44	0,41	0,39	0,37
2	16,81	21,24	22,80	23,75	24,89	2,82	3,68	4,08	4,33	4,53	0,56	0,51	0,46	0,44	0,38
3	17,56	20,64	21,83	22,39	22,98	3,55	4,21	4,52	4,72	4,88	0,53	0,43	0,40	0,39	0,37
4	17,74	21,35	22,57	23,25	23,68	3,34	4,13	4,53	4,76	4,97	0,52	0,45	0,41	0,39	0,38
5	19,10	22,14	23,30	23,71	24,31	3,86	4,50	4,78	4,95	5,08	0,51	0,44	0,41	0,37	0,35
6	22,60	26,60	27,66	28,19	28,47	3,50	4,27	4,26	4,87	5,00	0,37	0,33	0,31	0,29	0,29
7	15,75	19,42	20,24	20,84	21,01	4,06	4,69	4,91	5,05	5,16	0,58	0,53	0,50	0,47	0,46
8	18,30	20,16	21,29	21,91	22,27	4,42	4,95	5,17	5,31	5,39	0,48	0,47	0,44	0,43	0,42
9	17,40	20,17	20,78	21,52	21,90	4,56	5,02	5,23	5,35	5,46	0,50	0,46	0,43	0,41	0,37
10	19,09	21,40	22,57	23,32	23,69	4,63	5,07	5,22	5,30	5,37	0,45	0,42	0,39	0,38	0,37

Tabelle 8: Lateraler Meniskus (LM) nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	17,70	21,68	23,06	23,87	24,59
Standardabw.	1,79	1,82	1,87	1,84	1,85
Relaxationskraft in N	3,50	4,24	4,57	4,78	4,93
Standardabw.	0,29	0,25	0,22	0,20	0,19
Eindrücktiefe bis F_{\max} in mm	0,53	0,44	0,40	0,38	0,36
Standardabw.	0,06	0,04	0,03	0,03	0,03

Tabelle 9: Lateraler Meniskus (LM) nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	18,40	21,94	23,01	23,92	24,78
Standardabw.	2,89	2,62	2,55	2,58	2,50
Relaxationskraft in N	3,80	4,46	4,73	4,90	5,03
Standardabw.	0,46	0,37	0,34	0,31	0,29
Eindrücktiefe bis F_{\max} in mm	0,52	0,43	0,40	0,38	0,36
Standardabw.	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05

Tabelle 10: Lateraler Meniskus (LM) nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	18,48	21,51	22,63	23,28	23,79
Standardabw.	1,95	1,99	2,05	2,02	2,07
Relaxationskraft in N	3,89	4,51	4,79	4,96	5,10
Standardabw.	0,58	0,45	0,37	0,32	0,28
Eindrücktiefe bis F_{\max} in mm	0,50	0,47	0,42	0,40	0,38
Standardabw.	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04

Tabelle 11: Medialer Meniskus (MM) nach HDD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.

MM 0															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	17,60	23,52	24,60	25,44	26,40	2,73	3,76	4,29	4,64	4,87	0,52	0,41	0,38	0,36	0,35
2	18,98	24,04	25,81	26,83	27,73	3,32	4,25	4,71	4,97	5,13	0,47	0,38	0,35	0,33	0,32
3	17,96	20,87	22,10	22,84	23,52	4,18	4,82	5,04	5,20	5,31	0,59	0,45	0,41	0,39	0,38
4	18,42	21,34	22,39	22,67	23,42	5,01	5,40	5,54	5,63	5,70	0,49	0,44	0,41	0,36	0,35
5	19,17	23,48	25,86	26,19	27,08	3,30	4,19	4,61	4,84	5,07	0,47	0,40	0,35	0,33	0,32
6	19,67	24,59	25,59	26,65	26,94	2,55	3,61	4,15	4,45	4,67	0,47	0,41	0,38	0,36	0,34
7	19,88	24,09	25,58	26,49	27,16	3,45	4,25	4,66	4,89	5,08	0,59	0,40	0,37	0,36	0,34
8	18,78	21,32	22,51	23,08	23,55	4,09	4,70	4,95	5,12	5,24	0,49	0,43	0,40	0,38	0,37
9	18,37	23,17	24,78	25,44	26,28	3,10	3,92	4,33	4,58	4,78	0,51	0,54	0,49	0,45	0,42
10	15,43	19,45	20,66	21,06	21,56	3,25	4,16	4,57	4,81	4,98	0,63	0,57	0,53	0,51	0,49

MM 300															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	19,25	23,52	24,58	25,26	26,00	3,66	4,49	4,89	5,10	5,27	0,55	0,45	0,41	0,39	0,36
2	22,86	26,40	27,07	28,21	29,21	3,53	4,28	4,68	4,94	5,11	0,42	0,38	0,35	0,33	0,32
3	17,92	20,58	21,18	21,50	21,91	4,13	4,95	5,20	5,34	5,44	0,53	0,48	0,46	0,44	0,43
4	17,78	21,50	22,73	23,24	23,68	3,77	4,61	4,95	5,17	5,29	0,48	0,42	0,39	0,37	0,36
5	18,46	22,70	23,95	24,95	25,42	3,55	4,41	4,79	5,02	5,19	0,49	0,45	0,42	0,38	0,36
6	17,79	19,47	19,96	20,26	20,63	4,82	5,34	5,53	5,64	5,70	0,50	0,48	0,46	0,44	0,43
7	18,45	20,79	21,65	22,10	23,01	4,54	5,13	5,37	5,51	5,62	0,50	0,47	0,43	0,41	0,39
8	18,24	19,95	20,37	21,07	21,40	4,72	5,25	5,45	5,56	5,64	0,48	0,47	0,45	0,44	0,44
9	20,21	23,88	24,58	25,11	25,94	3,95	4,74	5,07	5,25	5,39	0,46	0,45	0,42	0,40	0,38
10	15,47	19,64	20,51	21,11	21,55	4,48	5,15	5,34	5,48	5,54	0,56	0,48	0,45	0,43	0,42

MM 600															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	19,68	24,32	25,12	25,71	26,19	2,96	3,80	4,24	4,51	4,72	0,48	0,40	0,37	0,35	0,34
2	18,19	22,25	23,94	24,53	25,51	3,05	4,01	4,40	4,68	4,86	0,49	0,42	0,39	0,37	0,35
3	15,67	20,97	22,65	23,68	24,69	3,33	4,15	4,53	4,73	4,85	0,66	0,52	0,47	0,44	0,42
4	17,97	20,52	21,26	22,08	22,29	4,77	5,25	5,42	5,49	5,56	0,51	0,47	0,44	0,42	0,41
5	22,03	25,63	26,22	27,50	28,10	3,98	4,67	5,00	5,21	5,35	0,42	0,37	0,34	0,32	0,31
6	20,47	24,13	25,10	25,72	26,35	4,28	4,91	5,20	5,37	5,47	0,44	0,37	0,35	0,33	0,32
7	19,31	23,83	25,18	25,80	26,11	2,98	3,88	4,38	4,68	4,90	0,53	0,43	0,40	0,38	0,37
8	19,10	22,13	22,67	23,53	23,80	4,13	4,74	5,07	5,27	5,40	0,52	0,44	0,41	0,39	0,38
9	18,08	20,54	21,05	21,41	21,58	3,93	4,82	5,17	5,34	5,46	0,50	0,45	0,43	0,41	0,41
10	16,21	21,22	22,24	22,61	23,16	3,63	4,51	4,88	5,11	5,26	0,57	0,48	0,45	0,43	0,42

Tabelle 12: Medialer Meniskus nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	18,42	22,59	23,99	24,67	25,36
Standardabw.	1,27	1,71	1,90	2,06	2,14
Relaxationskraft in N	3,50	4,31	4,69	4,91	5,08
Standardabw.	0,74	0,54	0,41	0,34	0,29
Eindrücktiefe bis F_{\max} in mm	0,52	0,44	0,41	0,38	0,37
Standardabw.	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05

Tabelle 13: Medialer Meniskus nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	18,64	21,84	22,66	23,28	23,88
Standardabw.	1,91	2,25	2,33	2,53	2,72
Relaxationskraft in N	4,12	4,83	5,12	5,30	5,42
Standardabw.	0,49	0,38	0,30	0,24	0,20
Eindrücktiefe bis F_{\max} in mm	0,50	0,45	0,42	0,40	0,39
Standardabw.	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04

Tabelle 14: Medialer Meniskus nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	18,67	22,55	23,54	24,26	24,78
Standardabw.	1,89	1,81	1,81	1,93	2,05
Relaxationskraft in N	3,70	4,48	4,83	5,04	5,18
Standardabw.	0,62	0,49	0,41	0,35	0,32
Eindrücktiefe bis F_{\max} in mm	0,51	0,43	0,40	0,39	0,37
Standardabw.	0,07	0,05	0,04	0,04	0,04

Tabelle 15: Lateraler Kondylus (LC) nach HHD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.

LC 0															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	16,62	21,00	23,33	24,86	26,06	3,40	3,87	4,17	4,37	4,49	0,53	0,37	0,30	0,28	0,26
2	18,84	24,20	25,77	28,17	28,94	3,23	3,80	4,10	4,32	4,48	0,46	0,30	0,26	0,24	0,23
3	20,45	25,44	27,93	29,18	30,47	3,38	3,97	4,27	4,48	4,68	0,42	0,28	0,25	0,23	0,22
4	16,99	19,82	21,16	22,20	23,00	4,45	3,88	4,12	4,32	4,44	0,53	0,47	0,44	0,42	0,39
5	19,95	25,67	27,90	29,03	30,35	3,32	3,92	4,23	4,43	4,59	0,44	0,28	0,25	0,22	0,21
6	21,19	27,26	29,46	31,08	32,21	3,18	3,83	4,15	4,38	4,53	0,42	0,26	0,23	0,21	0,20
7	20,58	24,32	25,57	26,80	27,16	3,93	4,35	4,57	4,72	4,83	0,42	0,35	0,32	0,30	0,29
8	15,26	18,32	20,00	20,94	22,23	3,56	4,00	4,21	4,36	4,48	0,58	0,45	0,40	0,37	0,35
9	16,18	18,51	19,20	19,86	20,69	4,10	4,43	4,57	4,64	4,67	0,54	0,50	0,47	0,45	0,43
10	19,60	21,63	22,99	23,59	24,10	4,08	4,38	4,49	4,58	4,66	0,46	0,40	0,37	0,36	0,34

LC 300															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	18,94	23,62	25,86	27,47	28,50	3,13	3,72	4,08	4,32	4,48	0,47	0,33	0,28	0,26	0,24
2	19,57	24,63	26,90	28,47	29,92	3,19	3,79	4,10	4,32	4,46	0,45	0,30	0,26	0,24	0,23
3	21,59	27,56	29,58	31,20	32,77	3,13	3,79	4,14	4,36	4,56	0,40	0,28	0,25	0,23	0,22
4	14,23	16,71	17,93	18,93	19,87	3,75	4,12	4,28	4,38	4,49	0,63	0,53	0,48	0,45	0,43
5	17,09	18,68	19,57	20,58	20,89	4,28	4,55	4,64	4,69	4,73	0,52	0,51	0,47	0,45	0,43
6	13,13	14,97	16,07	16,73	17,34	3,42	3,76	3,93	4,04	4,14	0,71	0,63	0,57	0,54	0,51
7	21,49	24,04	25,04	25,76	26,08	4,56	4,80	4,91	4,96	5,02	0,42	0,37	0,35	0,33	0,32
8	15,97	18,04	18,48	19,25	19,85	3,48	3,90	4,11	4,33	4,49	0,55	0,46	0,44	0,45	0,45
9	22,21	29,78	33,05	34,81	36,67	2,51	3,48	4,04	4,41	4,68	0,38	0,24	0,21	0,20	0,19
10	21,94	26,31	28,70	29,87	31,03	3,22	3,79	4,13	4,33	4,51	0,40	0,27	0,24	0,22	0,22

LC 600															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	16,36	18,18	18,65	19,07	19,58	4,00	4,23	4,34	4,39	4,48	0,53	0,48	0,46	0,44	0,44
2	18,70	20,63	21,44	22,39	23,30	4,09	4,37	4,46	4,56	4,66	0,45	0,43	0,40	0,39	0,38
3	17,14	18,47	19,20	19,76	20,59	4,00	4,25	4,37	4,47	4,53	0,50	0,51	0,49	0,49	0,47
4	19,87	20,78	21,81	22,82	23,63	3,92	4,17	4,32	4,48	4,59	0,44	0,42	0,42	0,42	0,41
5	17,96	20,55	21,58	22,53	23,35	3,43	3,77	3,94	4,07	4,15	0,52	0,47	0,43	0,41	0,39
6	20,20	23,48	24,92	26,84	27,76	3,94	4,27	4,46	4,61	4,74	0,44	0,39	0,36	0,34	0,32
7	18,34	21,71	23,18	24,07	24,97	3,79	4,18	4,37	4,51	4,61	0,48	0,41	0,37	0,35	0,33
8	16,11	18,67	19,90	21,35	22,44	3,54	3,94	4,19	4,34	4,46	0,60	0,51	0,45	0,42	0,39
9	15,47	17,44	18,45	19,23	18,89	3,82	4,18	4,36	4,47	4,55	0,62	0,56	0,52	0,49	0,47
10	14,86	16,98	17,59	18,26	19,04	3,96	4,33	4,50	4,60	4,69	0,61	0,57	0,53	0,51	0,49

Tabelle 16: Lateraler Kondylus nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	18,57	22,62	24,33	25,57	26,52
Standardabw.	2,12	3,18	3,55	3,85	3,94
Relaxationskraft in N	3,56	4,04	4,29	4,46	4,58
Standardabw.	0,35	0,25	0,18	0,14	0,12
Eindrücktiefe bis Fmax in mm	0,48	0,37	0,33	0,31	0,29
Standardabw.	0,06	0,09	0,09	0,09	0,08

Tabelle 17: Lateraler Kondylus nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	18,62	22,43	24,12	25,31	26,92
Standardabw.	3,35	5,01	5,75	6,09	6,52
Relaxationskraft in N	3,47	3,97	4,24	4,41	4,56
Standardabw.	0,60	0,41	0,30	0,25	0,23
Eindrücktiefe bis Fmax in mm	0,49	0,39	0,35	0,34	0,32
Standardabw.	0,11	0,13	0,13	0,12	0,12

Tabelle 18: Lateraler Kondylus nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	17,50	19,69	20,67	21,63	22,45
Standardabw.	1,82	2,07	2,32	2,65	2,74
Relaxationskraft in N	3,85	4,17	4,33	4,45	4,55
Standardabw.	0,21	0,18	0,16	0,16	0,16
Eindrücktiefe bis Fmax in mm	0,52	0,47	0,44	0,43	0,41
Standardabw.	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06

Tabelle 19: Medialer Kondylus (MC) nach HHD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.

MC 0															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	15,14	18,92	22,09	23,56	24,49	3,21	3,61	3,84	3,95	4,06	0,59	0,42	0,36	0,34	0,32
2	18,18	22,48	24,05	25,08	26,28	3,55	3,99	4,20	4,35	4,46	0,51	0,37	0,33	0,31	0,30
3	19,71	21,86	22,90	23,66	24,18	3,70	4,04	4,21	4,34	4,42	0,46	0,42	0,39	0,37	0,35
4	18,05	23,59	25,38	27,09	27,87	3,19	3,79	4,09	4,29	4,42	0,50	0,31	0,27	0,25	0,24
5	16,18	20,43	22,21	24,11	25,19	3,21	3,77	4,07	4,28	4,39	0,57	0,38	0,33	0,30	0,28
6	19,97	25,29	27,27	29,16	29,84	3,59	4,04	4,29	4,52	4,64	0,41	0,31	0,28	0,25	0,24
7	16,47	20,40	21,82	23,03	23,96	3,53	3,99	4,22	4,36	4,47	0,56	0,42	0,37	0,34	0,32
8	20,39	27,25	30,42	32,37	33,64	2,76	3,53	3,99	4,28	4,49	0,44	0,26	0,23	0,21	0,20
9	18,90	20,84	22,45	23,10	24,25	4,16	4,50	4,65	4,76	4,83	0,45	0,43	0,39	0,37	0,36
10	16,73	18,33	18,99	19,13	19,53	4,03	4,32	4,41	4,48	4,54	0,54	0,50	0,48	0,46	0,46

MC 300															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	21,23	23,94	25,42	25,95	26,82	3,76	4,14	4,30	4,45	4,52	0,42	0,37	0,34	0,32	0,31
2	22,22	29,22	32,44	33,47	35,26	2,98	3,66	4,06	4,29	4,50	0,41	0,27	0,23	0,22	0,21
3	18,98	24,05	26,07	27,49	28,91	2,99	3,63	4,01	4,26	4,43	0,50	0,34	0,30	0,27	0,26
4	18,80	22,00	23,50	24,66	25,04	3,45	3,90	4,11	4,26	4,38	0,49	0,38	0,34	0,32	0,30
5	12,91	15,07	15,69	15,91	16,37	3,69	4,04	4,16	4,22	4,26	0,73	0,65	0,62	0,60	0,58
6	21,29	27,07	29,57	30,99	31,92	3,66	4,28	4,53	4,73	4,86	0,45	0,31	0,28	0,26	0,25
7	18,16	19,37	20,10	20,45	21,23	4,70	4,93	5,02	5,05	5,09	0,47	0,49	0,47	0,46	0,45
8	13,03	15,66	16,36	17,08	17,38	3,91	4,28	4,43	4,53	4,59	0,71	0,64	0,58	0,54	0,52
9	16,02	17,28	17,75	18,43	18,86	4,33	4,61	4,71	4,80	4,86	0,54	0,57	0,54	0,53	0,53
10	13,47	15,22	15,85	16,44	17,16	3,84	4,17	4,29	4,36	4,44	0,63	0,61	0,58	0,56	0,55

MC 600															
Zyklus	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5	Z. 1	Z. 2	Z. 3	Z. 4	Z. 5
Probe	Steifigkeit [N/m]					Relaxationskraft [N]					Eindrücktiefe bis Fmax [mm]				
1	19,24	22,30	23,79	24,58	25,75	3,46	3,90	4,14	4,29	4,42	0,48	0,36	0,32	0,30	0,28
2	18,36	22,96	25,12	26,43	27,97	3,21	3,77	4,08	4,31	4,48	0,48	0,35	0,31	0,28	0,27
3	21,08	24,85	27,06	28,86	29,74	3,38	3,95	4,26	4,45	4,62	0,42	0,31	0,27	0,25	0,24
4	16,74	21,61	23,35	24,36	25,24	3,21	3,76	4,02	4,21	4,31	0,53	0,38	0,33	0,31	0,29
5	18,89	24,42	26,68	28,27	29,48	2,91	3,59	3,96	4,20	4,38	0,49	0,30	0,26	0,24	0,22
6	13,57	15,05	15,68	16,23	16,76	4,13	4,39	4,47	4,52	4,52	0,65	0,65	0,60	0,57	0,54
7	20,12	25,14	27,27	28,71	30,32	2,97	3,66	4,03	4,26	4,43	0,45	0,29	0,26	0,24	0,23
8	12,53	14,07	14,91	15,33	15,83	3,97	4,34	4,43	4,50	4,55	0,73	0,75	0,70	0,68	0,66
9	20,05	21,65	22,84	24,43	25,47	3,86	4,19	4,36	4,49	4,63	0,44	0,43	0,42	0,40	0,38
10	16,06	17,38	17,67	17,87	18,29	4,29	4,54	4,63	4,65	4,68	0,55	0,58	0,56	0,55	0,53

Tabelle 20: Medialer Kondylus nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	17,97	21,94	23,76	25,03	25,92
Standardabw.	1,79	2,80	3,22	3,69	3,83
Relaxationskraft in N	3,49	3,96	4,20	4,36	4,47
Standardabw.	0,42	0,30	0,23	0,20	0,20
Eindrücktiefe bis Fmax in mm	0,50	0,38	0,34	0,32	0,31
Standardabw.	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07

Tabelle 21: Medialer Kondylus nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	17,61	20,89	22,28	23,09	23,90
Standardabw.	3,56	5,13	6,03	6,33	3,71
Relaxationskraft in N	3,73	4,16	4,36	4,49	4,59
Standardabw.	0,53	0,40	0,32	0,28	0,26
Eindrücktiefe bis Fmax in mm	0,54	0,46	0,43	0,41	0,40
Standardabw.	0,12	0,15	0,15	0,15	0,14

Tabelle 22: Medialer Kondylus nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.

Test-Zyklus-Nr.	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5
Steifigkeit in N/m	17,66	20,94	22,44	23,51	24,49
Standardabw.	2,87	4,03	4,69	5,18	5,53
Relaxationskraft in N	3,59	4,01	4,24	0,44	0,45
Standardabw.	0,49	0,33	0,23	0,15	0,12
Eindrücktiefe bis Fmax in mm	0,52	0,44	0,40	0,38	0,36
Standardabw.	0,17	0,17	0,16	0,16	0,15

8.6 Verzeichnis der Abbildungen, Grafiken und Tabellen

- Abb. 1:** Hochdruckautoklav
- Abb. 2:** Neubauerkammer. Zählkammern mit Trypanblau gefüllt.
- Abb. 3:** Fadenkreuz der Neubauerkammer. Ausgezählt werden die äußeren vier der neun Quadranten.
- Abb. 4:** Skizze des Druckerzeugungssystems mit Hochdruck-Autoklav und Druckregelung.
- Abb. 5:** In einzelne Wells ausgesäte Zellen.
- Abb. 6:** Mit Wells bestücktes und leeres Cryo-Röhrchen.
- Abb. 7:** Bovines Kniegelenk mit eröffneter Kapsel.
- Abb. 8:** Aufsicht auf die herauspräparierten Menisken eines Kniegelenks. Markierung der Entnahmestellen.
- Abb. 9:** Aufsicht auf die Kondylen nach Exartikulation und Präparation. Markierung der Entnahmestellen.
- Abb. 10:** Henkellocheisen. Durchmesser 10 mm.
- Abb. 11:** Stahlzylinder mit eingebrachtem Einsatz.
- Abb. 12:** Zylinder aus dem medialen Meniskus.
Höhe 4 mm, Durchmesser 10 mm.
- Abb. 13:** Osteochondraler Zylinder aus dem medialen Femurkondylus.
Höhe 4 mm, Durchmesser 10 mm.
- Abb. 14:** Hochdruckanlage. Vergrößerte schematische Darstellung von Druckkammer und Wirkprinzip.
- Abb. 15:** Unter die Prüfvorrichtung positionierte Knorpelprobe.
Kugeldurchmesser: 5 mm.
- Abb. 16:** Grafische Darstellung eines Versuchzyklus einer unbehandelten Probe aus dem Femurkondylus.
- Abb. 17:** Ansicht des Kryotoms mit Blick in die Schneidekammer.
- Abb. 18:** Mit Objektträgern bestückte Färbekammer des Leica Immunostainers.
- Abb. 19:** Chondrozyten in Kultur.
- Abb. 20:** Chondrosarkomzellen in Kultur.
- Abb. 21:** Chondrozyten in Suspension, Nullkontrolle.
- Abb. 22:** Chondrozyten in Suspension nach 250 MPa.
- Abb. 23:** Chondrosarkomzellen in Suspension, Nullkontrolle.

- Abb. 24:** Chondrosarkomzellen in Suspension nach 350 MPa.
- Abb. 25:** Adhärente Chondrozyten. Nullkontrolle.
- Abb. 26:** Adhärente Chondrozyten nach 50 MPa.
- Abb. 27:** Adhärente Chondrozyten nach 100 MPa.
- Abb. 28:** Adhärente Chondrozyten nach 150 MPa.
- Abb. 29:** Adhärente Chondrozyten nach 200 MPa.
- Abb. 30:** Adhärente Chondrosarkomzellen. Nullkontrolle.
- Abb. 31:** Adhärente Chondrosarkomzellen nach 100 MPa.
- Abb. 32:** Adhärente Chondrosarkomzellen nach 150 MPa.
- Abb. 33:** Adhärente Chondrosarkomzellen nach 200 MPa.
- Abb. 34:** Rekultivierte Chondrozyten. Nullkontrolle.
- Abb. 35:** Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 100 MPa.
- Abb. 36:** Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 200 MPa.
- Abb. 37:** Rekultivierte Chondrosarkomzellen. Nullkontrolle.
- Abb. 38:** Rekultivierte Chondrosarkomzellen 24 h nach Inkubation bei 100 MPa.
- Abb. 39:** Rekultivierte Chondrosarkomzellen 24 h nach Inkubation bei 200 MPa.
- Abb. 40:** Morphologie von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen im FACS.
- Abb. 41:** Annexin V-Bindung von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen im FACS.
- Abb. 42:** Propidiumiodid-Bindung von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen im FACS.
- Abb. 43:** Annexin V- und Propidiumiodid-Bindung von Chondrozyten und Chondrosarkomzellen im FACS.
- Abb. 44:** Konfokale Lasermikroskopie. Chondrozyten in Suspension. Nullkontrolle.
- Abb. 45:** Konfokale Lasermikroskopie. Chondrozyten in Suspension nach 200 MPa.
- Abb. 46:** Konfokale Lasermikroskopie. Chondrosarkomzellen in Suspension. Nullkontrolle.
- Abb. 47:** Konfokale Lasermikroskopie. Chondrosarkomzellen in Suspension nach 150 MPa.
- Abb. 48:** Konfokale Lasermikroskopie. Chondrosarkomzellen in Suspension nach 200 MPa.

- Abb. 49:** Medialer Meniskus. Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen-I, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 50:** Medialer Meniskus. Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen-II, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 51:** Medialer Meniskus. Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen-III, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 52:** Medialer Meniskus. Immunhistochemische Anfärbung von Versican, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 53:** Medialer Meniskus. Immunhistochemische Anfärbung von Link-Protein, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 54:** Medialer Meniskus. Immunhistochemische Anfärbung von Aggrecan, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 55:** Medialer Meniskus. Kontrollfärbung.
- Abb. 56:** Medialer Kondylus. Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen-I, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 57:** Medialer Kondylus. Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen-II, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 58:** Medialer Kondylus. Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen-III, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 59:** Medialer Kondylus. Immunhistochemische Anfärbung von Versican, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 60:** Medialer Kondylus. Immunhistochemische Anfärbung von Link-Protein, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 61:** Medialer Kondylus. Immunhistochemische Anfärbung von Aggrecan, Nullkontrolle und nach 600 MPa.
- Abb. 62:** Medialer Kondylus. Kontrollfärbung.
- Anhang Abb. 1:** Chondrozyten in Suspension. Nach 100 MPa.
- Anhang Abb. 2:** Chondrozyten in Suspension. Nach 150 MPa.
- Anhang Abb. 3:** Chondrozyten in Suspension. Nach 200 MPa.
- Anhang Abb. 4:** Chondrosarkomzellen in Suspension. Nach 100 MPa.
- Anhang Abb. 5:** Chondrosarkomzellen in Suspension. Nach 200 MPa.
- Anhang Abb. 6:** Chondrosarkomzellen in Suspension. Nach 250 MPa.
- Anhang Abb. 7:** Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 50 MPa.
- Anhang Abb. 8:** Rekultivierte Chondrozyten 24 h nach Inkubation bei 150 MPa.

- Anhang Abb. 9:** Rekultivierte Chondrosarkomzellen. 24 h nach Inkubation bei 50 MPa.
- Anhang Abb. 10:** Rekultivierte Chondrosarkomzellen. 24 h nach Inkubation bei 150 MPa.
- Grafik 1:** Chondrozyten nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblau-Test.
- Grafik 2:** Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblau-Test.
- Grafik 3:** Chondrozyten und Chondrosarkomzellen in Suspension nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblau-Test.
- Grafik 4:** Adhärente Chondrozyten und Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblau-Test.
- Grafik 5:** Lateraler Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa.
- Grafik 6:** Medialer Meniskus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa.
- Grafik 7:** Lateraler Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa.
- Grafik 8:** Medialer Kondylus nach HHD-Behandlung bei 300 und 600 MPa.
- Anhang Grafik 1:** Chondrozyten in Suspension nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest.
- Anhang Grafik 2:** Chondrosarkomzellen in Suspension nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest.
- Anhang Grafik 3:** Adhärente Chondrozyten nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest.
- Anhang Grafik 4:** Adhärente Chondrosarkomzellen nach Hochdruckbehandlung (10 min, 37 °C). Vitalität im Trypanblautest.
- Tabelle 1:** Technische Daten der Hochdruck-Anlage für die Zellversuche.
- Tabelle 2:** Primäre Antikörper und Enzym-Vorbehandlung für die immunhistochemische Untersuchung von Meniskus- und Gelenkknorpel.
- Tabelle 3:** Chondrozyten in Suspension nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte und Fehler.
- Tabelle 4:** Chondrosarkomzellen in Suspension nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte und Fehler.
- Tabelle 5:** Chondrozyten adhärent nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte und Fehler.
- Tabelle 6:** Chondrosarkomzellen adhärent nach 10 min HHD-Inkubation. Mittelwerte und Fehler.

- Tabelle 7:** 50%-Überlebensraten von SW1353 Chondrosarkomzellen und Chondrozyten nach HHD-Inkubation (10 min, 37 °C).
- Tabelle 8:** Chondrozyten in Suspension nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Mittelwerte und Standardabweichung der FACS-Messungen (Bindung von Annexin V *und* Propidiumiodid).
- Tabelle 9:** Chondrosarkomzellen in Suspension nach HHD-Behandlung (10 min, 37 °C). Mittelwerte und Standardabweichung der FACS-Messungen (Bindung von Annexin V *und* Propidiumiodid)
- Anhang Tabelle 1:** Chondrozyten in Suspension nach HHD-Behandlung (Versuche 1-4).
- Anhang Tabelle 2:** Chondrosarkomzellen in Suspension nach HHD-Behandlung (Versuche 5-8).
- Anhang Tabelle 3:** Adhärente Chondrozyten nach HHD-Behandlung (Versuche 9-12).
- Anhang Tabelle 4:** Adhärente Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung (Versuche 13-16).
- Anhang Tabelle 5:** Chondrozyten nach HHD-Behandlung. FACS-Messungen.
- Anhang Tabelle 6:** Chondrosarkomzellen nach HHD-Behandlung. FACS-Messungen.
- Anhang Tabelle 7:** Biomechanische Testung. Lateraler Meniskus (LM) nach HHD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.
- Anhang Tabelle 8:** Biomechanische Testung. Lateraler Meniskus (LM) nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.
- Anhang Tabelle 9:** Biomechanische Testung. Lateraler Meniskus (LM) nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.
- Anhang Tabelle 10:** Biomechanische Testung. Lateraler Meniskus (LM) nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.
- Anhang Tabelle 11:** Biomechanische Testung. Medialer Meniskus (MM) nach HHD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.
- Anhang Tabelle 12:** Biomechanische Testung. Medialer Meniskus (MM) nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.
- Anhang Tabelle 13:** Biomechanische Testung. Medialer Meniskus (MM) nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.
- Anhang Tabelle 14:** Biomechanische Testung. Medialer Meniskus (MM) nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.
- Anhang Tabelle 15:** Biomechanische Testung. Lateraler Kondylus (LC) nach HHD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.

Anhang Tabelle 16: Biomechanische Testung. Lateraler Kondylus (LC) nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.

Anhang Tabelle 17: Biomechanische Testung. Lateraler Kondylus (LC) nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.

Anhang Tabelle 18: Biomechanische Testung. Lateraler Kondylus (LC) nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.

Anhang Tabelle 19: Biomechanische Testung. Medialer Kondylus (MC) nach HHD-Behandlung, einzelne Messergebnisse.

Anhang Tabelle 20: Biomechanische Testung. Medialer Kondylus (MC) nach HHD-Behandlung (Kontrollproben), Mittelwerte.

Anhang Tabelle 21: Biomechanische Testung. Medialer Kondylus (MC) nach HHD-Behandlung (300 MPa), Mittelwerte.

Anhang Tabelle 22: Biomechanische Testung. Medialer Kondylus (MC) nach HHD-Behandlung (600 MPa), Mittelwerte.