

Keresztszalag pótlásra felhasználható allo-autograftok vizsgálata

Az allograftokat használhatjuk akár cryopreservált, akár a beültetés előtt különböző sterilizálási metódusokon átesett formában. A nem sterilizált formában történő implantálás előtt a donor aprólékos szerológiai szűrése szükséges, továbbá maga a graft vizsgálata a fertőzés lehetőségének elkerülése miatt. Kötelező olyan szintű infrastrukturális háttér biztosítása, mely lehetőséget teremt a szövet steril eltávolítására és tárolására. Ezen feltételek megteremtése magas költségekkel jár, és a folyamatok időigényesek (Scheffler és mtsai 2005). Azt is kimutatták, hogy ezen időablak megnövekedése bizonyos virális infekciók számának növekedését vonzza maga után (Busch és mtsai 2000), melyeket nem minden esetben lehet kimutatni a jelenleg rendelkezésre álló technikákkal.

A transzplantátum tárolási ideje szerint beszélhetünk rövid és hosszú idejű tárolásról. A rövid idejű tárolás a szervátültetéseknel jön szóba. A mi célunk, hogy egy hosszú időre, kellő sterilitást biztosító tárolási módot találjunk. A sterilizálási eljárásoknak számos formáját használják: antibiotikumos fürdő, etilén oxid, peracet sav és gamma besugárzás. Az antibiotikumos fürdő csak a bakteriális fertőzések ellen nyújt védelmet. Az etilén oxid synovialis gyulladást provokál. A peracetsav egy igen instabil vegyület és az allograftokban gyors ecetsavra bomlik peroxid gyökök felszabadulása és hőképződés mellett, rontja az inak biomechanikai tulajdonságait [Scheffler és mtsai. 2008]. Nagy kérdés, hogy a gammabesugárzás, illetve annak dózisa miképpen befolyásolja az allograftok biomechanikai tulajdonságait.

Célkitűzéseink

Kutatásunk során humán íngraftok szakításos vizsgálatait végeztük, melyek során a biomechanikai tulajdonságaikat, illetve azoknak a fizikai és kémiai ágensek behatására kialakuló változásait mértük.

Munkánk három fő részből állt.

Vizsgálataink első fázisában a későbbi mérésekhez alkalmas befogófej kialakítása volt a célunk.

A második fázis során arra kerestük a választ, hogy az előkezelési eljárások, melyekben a graftok részesültek (pl. radiocryoprotectans oldat, fagyasztás), továbbá a gammasugárzás, illetve annak dózisa miképpen befolyásolja a graftok szilárdságtani tulajdonságait.

A harmadik szakaszban a mintákat szövettanilag is megvizsgáltuk, hogy megfigyeljük a fagyasztás és sugárzás hatásait a különböző csoportokon.

Kutatás kivitelezése

I. szakasz – befogófej megalkotása

40 íngraftot gyűjtöttünk 8 humán kádáverből. Eltávolításra kerültek a csont-patellaín-csont graftok (BTB-/BPTB-graftok), a semitendinosus és gracilis ínpárosok (ST/G), a quadriceps-, az Achilles- és a peroneus longus inak a donorok egyik alsó végtagjából. Vizsgálatunk kezdeti szakaszában 40 db mintát teszteltünk különböző rögzítési eszközökkel. Ezek a következők voltak: sebészi fonal (Premicron 3 típusú), drótháló (Maedchenfaenger típusú), Zwick Z020-as típusú szakítógéphez tartozó általános befogófej, cementköpenyes fixáció, Shi-féle befogó (Shi és mtsai 2012), módosított fagyasztással kombinált Shi-féle befogófej INSTRON típusú

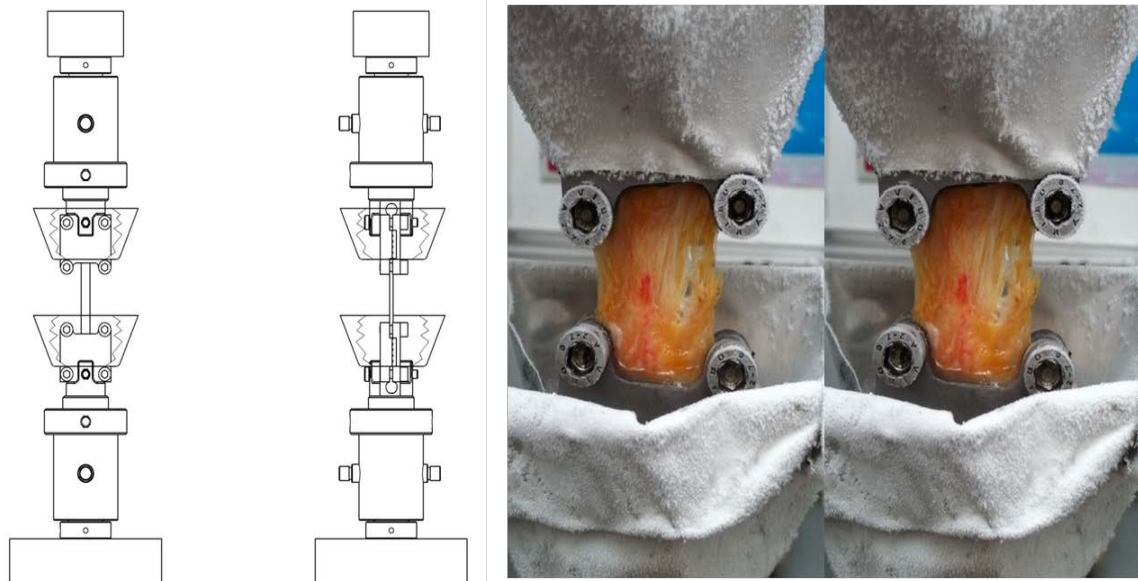
szakítógéphez. Az inak eltávolítása minden esetben az exitus bekövetkeztéhez képest 24 órán belüli volt.

Méréseinket INSTRON 8872 típusú, komputervezérelt, szervohidraulikus szakítógéppel végeztük (Instron Ltd., High Wycombe, Egyesült Királyság), melynek része volt a 25 kN-os Dynacell dinamikus erőmérő cella és az Instron Fasttrack 8000-es típusú vezérlő-, adatgyűjtő egység. A tesztelés során a szakítási sebesség 20 mm/perc volt. Az adataink statisztikai értékeléséhez kétmintás T-próbát végeztünk.

Az első esetben az íngraftok fixálása hasonló módszerrel történt, mint az elülső keresztzalag sebészi pótlása során. A ST+G inakat négyrétegűre hajtottuk, és a szabad végeiket Premicon 3 típusú fonallal öltöttük össze, ellenkező végeiken pedig a fonalat aláhurkoltuk. A peroneus longus inaknál hasonlóképpen jártunk el. Az általunk mért 381 ± 26 N megfelelt az irodalomban leírtaknak, de nem érte el a ín terhelési értékeit.

Hasonlót tapasztaltunk a Zwick Z020 típusú szakítógép általános befogófejével (527 ± 45 N), a dróthálós rögzítési módszerrel (751 ± 21 N), a cementes rögzítéssel (253 ± 19 N).

Ezután a Shi-féle befogót használtuk (Shi és mtsai 2012). Az eredmények ellentmondásosak voltak. Szélesebb grafok esetén – úgymint az Achilles és a quadriceps – magasabb volt tapadási erő, azonban a vékonyabb minták – peroneus, semitendinosus – a legtöbb esetben kicsúsztak a befogófejek lapjai közül. Az átlagos szakítási erő 997 ± 416 N volt, de ez a többségében nem hozta létre a szakítási fenomént. Végül a Shi-féle befogót fagyasztással kombináltuk, melyet *módosított ín befogónak* neveztünk el (1.ábra). A szakításhoz szükséges erő (2198 ± 773 N) és az ín tényleges szakadása megmutatta, hogy sikerült megtalálnunk az inak szilárdságtani vizsgálatához használható befogóeszközt.



1.ábra

A módosított befogófej vázlatja és fényképe

Az 5. és a 6. rögzítési módszerrel elért eredményeinket kétmintás T-próbával hasonlítottuk össze, mely szignifikáns különbséget talált a két csoport között ($p=0,01152$) (1. táblázat). Az összes graft elszakadt, kivéve a BPTB-graftokat, melyeknél a maximális feszültséget átlagosan csak 1030 N-ig lehetett növelni. A patellaín graftok mind a Shi-féle, mind a fagyasztással kombinált befogókból egyaránt kicsúsztak. Fontos megemlíteni, hogy ezen graftok átlagos hossza mindössze 6,375 cm volt, míg a többi mintáé 9,25–12,125 cm közötti értékeket vet fel.

Graft	Premicron 3-as fonal	Cement-köpenyes fixálás	Zwick Z020-as típusú szakítógéppel ált. befogója	Maedchen faenger	Shi-féle befogó	Shi-féle fagyasztással módosított befogó
Patella	380 N	250 N	549 N	745 N	–	–
Peroneus	402 N	268 N	483 N	769 N	1189N	1791.5 N
Quadriceps	361 N	275 N	557 N	724 N	592N	1841 N
ST/G	412 N	231 N	572 N	739 N	677N	1862 N
Achilles	350 N	240 N	473 N	775 N	1451N	3298,5 N
átlag	381 N	253 N	527 N	750 N	977,25 N*	2198,25 N*
SD	26 N	18 N	45 N	21 N	416 N	773 N

1. táblázat: Az általunk vizsgált 6-féle rögzítési módszer során elért szakítási erők értékei, Newtonban mérve. * A különbség szignifikáns volt: $p < 0,01$.

Méréseink megvalósításához az első lépés volt a biomechanikai tesztekhez használandó, alkalmas befogófej kifejlesztése. Vizsgálataink során 6-féle különböző rögzítési technikát teszteltünk. A Shi-féle befogófej, melyet fagyasztással kombináltunk, volt az egyetlen rögzítési módszer, mely elegendő fixálást biztosított terheléses méréseink alatt (Hangody Gy. és mtsai 2016). Gyakorlatunkban 3 perces fagyasztási időt használtunk. A befogófej közvetlen környezetében az inakban fagyás nem alakult ki, továbbá a felületen lévő sóoldat is cseppfolyós maradt, így elmondható, hogy a vizsgálandó graftokban fagyási jelet nem észleltünk.

Az irodalomban más szerzők által említett egyéb befogófejekkel elért szakítási erők 1300±229 N-től 2549±434 N-ig terjednek (Scheffler és mtsai 2005). Vizsgálataink során a szakítási erők átlaga 2198±771 N, a szakadási erő maximuma pedig 3298,5 N volt. Ezek a számok az előbb említettekkel összhangban voltak.

II. szakasz - Fagyasztott és fagyasztva besugarazott ínminták statikus és dinamikus terhelése

Vizsgálatunk második fázisában 70 humán kádáverből 700 graftot gyűjtöttünk. Minden egyes donorból alsó végtagonként 5-5 íngraftot távolítottunk el: Achilles-, quadriceps-, semitendinosus+gracilis- (ST+G vagy ST/G vagy STG), tibialis anterior- (TA) és peroneus

longus (PL) inakat. A mintákat a halál beálltához képest 24 órán belül távolítottuk el, majd radiocryoprotectans oldatba helyeztük. Minden egyes graftot külön – feliratozott tárolóban –, lassan hűtve (–80) Celsius-fok hőmérsékletre fagyasztottunk, így érve el az ideiglenes tárolás feltételeit.

Az ínmintákat 4 csoportba osztottuk. Az *A csoport* 100 fagyasztott ínmintát tartalmazott (a donorok átlagéletkora: $77,9 \pm 15,82$ év). A *B csoportban* 300 graftot teszteltünk, melyeket 21 kGy céldózisú (dóziastartomány: 18-24 kGy, baktericid dózis) gammasugárzással kezeltünk, a donorok átlagéletkora: $83,61 \pm 8,34$ év. A *C csoportba* pedig szintén 300 db 42 kGy céldózisú (dóziastartomány: 38-46 kGy, virucid dózis) gammabesugárzással kezelt ínminta került későbbi vizsgálatok céljából, a donorok átlagéletkora: $79,55 \pm 9,14$ év. A besugárzás mindig fagyasztott állapotban lévő mintákon történt, és nagy figyelmet fordítottunk arra, hogy a graftok ne melegedjenek fel.

A szakításos mérésekhez a graftokat felolvastottuk, míg el nem érték a szobahőmérsékletet. Tesztelés előtt a mintáknál a keresztmetszetet és a befogófejek közti távolságot is lemértük a mérési adatok összehasonlíthatósága és értékelhetősége miatt.

A graftok végeit az előzőekben taglalt módon a fagyasztott befogófejekbe fixáltuk, és a szakításos vizsgálatokat megelőzően 30 másodpercen át 50 N-nal előfeszítettük az ínmintáinkat. 50–200 N közötti előterheléssel, 2 Herz frekvenciával 1000 ciklus alatt dinamikusan terheltük az inakat, majd a nyújtási erőt folyamatosan növelve szakítottuk őket. A statikus terhelés során a szakítási sebesség 20 mm/perc volt. A biomechanikai paramétereket a mért geometriai adatok alapján számítottuk ki, ehhez fontosak voltak a befogófej-elmozdulások és az szakítóerő-megnyúlás görbék, melyeket a mérések során kaptunk. A Young-modulus értékeket a feszültség-megnyúlás görbék meredekségéből számítottuk. A statisztikai elemzéseket Statistica 8.0 segítségével végeztük. Az egyes csoportok eloszlását Shapiro–Wilks- és Kolmogorov–Smirnov-teszttel végeztük (Statsoft Inc, Tulsa, Oklahoma, USA). Az adatainkat mediánként reprezentáltuk a hozzá tartozó interkvartilis tartománnyal (25% percentilis – 75% percentilis). A csoportonkénti összehasonlításához Kruskal–Wallis-tesztet használtunk. Az átlagtartományok többszörös összevetésére post hoc analízist végeztünk. Az összes analízisnél a $p \leq 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az egyes specimenek biomechanikai összehasonlítására 4 paramétert használtunk: rugalmassági (Young) modulus, szakítási erő (F_{max}), nyúlás maximális feszültségnél, szakadási nyúlás.

Az *A csoportban* a Young-modulus vonatkozásában összehasonlítva az ínmintáinkat megállapítható volt, hogy az Achilles-íngraftokkal szignifikánsan gyengébb értékeket értünk el, mint a TA-val ($p=0,004$). A szakítási erők tekintetében a vizsgált graftok között nem mutatkozott lényegi különbség, azonban az STG-inak alulteljesítettek a többi négyhez képest. Az Achilles-inak nyúlása maximális feszültségnél szignifikánsan nagyobb volt, mint az ST- ($p=0,002$), TA- ($p=0,039$) és a quadriceps íngraftoké ($p=0,002$). A szakadási nyúlás esetén pedig azt lehetett látni, hogy az Achilles-ín az ST ($p=0,01$) és a TA-graftokkal ($p=0,02$) összehasonlítva is szignifikánsan nagyobb értékeket ért el.

A *B csoportban* is elsőként az inak rugalmassági modulusát vizsgáltuk; az Achilles-ín szignifikánsan gyengébben teljesített mind a quadriceps ($p=0,0042$), mind a PL- ($p=0,03$), mind a TA- ($p=0,0001$) inakkal való összehasonlítás során. A szakítási erő -paramétereket értékelve láthattuk, hogy a STG-graftok szignifikánsan gyengébben teljesítettek az Achilles ($p=0,002$) és a quadriceps ($p=0,01$) mintákkal történt egybevetés alkalmával. Az Achilles-ín, a quadriceps és a tibialis anterior ínminták között pedig nem volt lényegi különbség. Az Achilles-inak a maximális feszültségnél mért nyúlás értékeit vizsgálva is szignifikánsan alulteljesítettek a quadriceps ($p=0,02$) és az STG- ($p=0,00005$) graftokhoz képest. Az Achilles-ín szakadási nyúlása szignifikánsan nagyobb volt, mint az STG ($p=0,0003$), PL-

($p=0.00003$), és TA- ($p=0,0004$) inaké; hasonlóképpen a quadriceps ín is szignifikánsan alulmaradt az STG- ($p=0,02$) és TA- ($p=0,02$) íngraftokkal összehasonlítva.

A C csoportban a Young-modulusokat összehasonlítva megállapíthattuk, hogy az Achilles-ín szignifikánsan alulteljesített a PL- ($p=0,002$) és a TA- ($p=0,001$) graftokhoz képest. Továbbá a quadriceps inak a TA-okhoz képest ($p=0,004$) és az STG-graftok ugyancsak a TA-inakkal összehasonlítva ($p=0,04$) szignifikánsan gyengébb rugalmassági mutatókkal rendelkeztek. Az Achilles-ín jobb eredményeket ért el a szakítási erő vonatkozásában a PL- ($p=0,01$) és az STG- ($p=0,01$) graftokkal való összehasonlításakor. A quadriceps íngraftok is jobb eredményeket mutattak, mint a PL- ($p=0,002$) és a STG-inak ($p=0,002$). A TA hasonló eredményeket ért el, mint az Achilles-ín és a quadriceps. A nyúlás maximális feszültségnél szignifikánsan nagyobb volt az Achilles-inak esetében, mint az STG- ($p=0,01$), PL- ($p=0,004$) és TA-graftoknál ($p=0,004$). Ugyanígy a quadriceps íngraftok is elmaradtak a TA- ($p=0,002$) vagy a PL-hez képest ($p=0,006$). Azaz a quadricepsek és az Achilles-inak sokkal kevésbé voltak ellenállóak a szakítási erőkkel szemben. A szakadási nyúlás esetén hasonló tendenciákat figyelhettünk meg: az Achilles-inakat a PL- ($p=0,03$) és a TA- ($p=0,005$) graftokhoz viszonyítva; továbbá a quadricepset szintúgy a PL- ($p=0,004$) és a TA- ($p=0,005$) mintáinkkal összevetve a különbség szignifikáns volt.

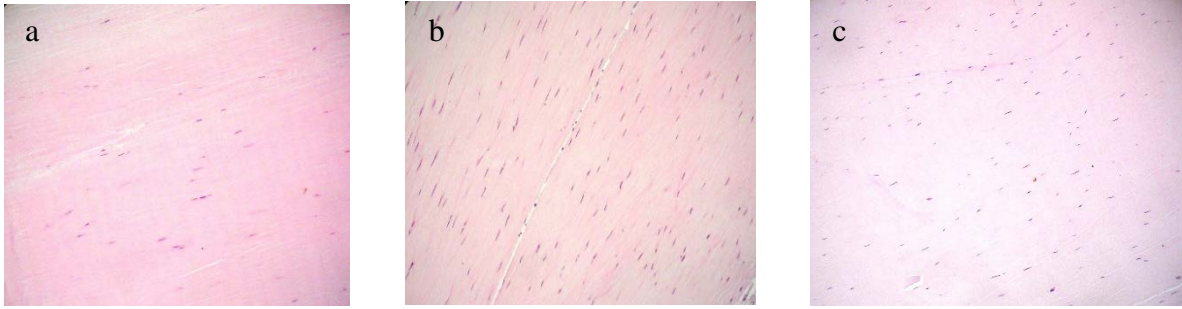
A gamma sugárzás hatásait vizsgálva az azonos típusú inakon megállapítható volt, hogy a legrosszabb eredményeket összességében a quadriceps graftok esetén tapasztaltunk. A rugalmassági modulus értékeiben is szignifikáns csökkenés mutatkozott a B és C csoport összehasonlításakor ($p=0,048$). A sugárdózis növelésével a csoportok között szintén szignifikáns differencia mutatkozott, mind a nyúlás maximális feszültségnél (A csoport vs. C csoport: $p=0,0021$, B csoport vs. C csoport: $p=0,015$), mind a szakadási nyúlásnál (A csoport vs. C csoport: $p=0,0108$, B csoport vs. C csoport: $p=0,0048$). A maximális feszültségre nem volt szignifikáns hatással a vizsgált dózisu gammabesugárzás.

III. szakasz – szövettani elemzés

A Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézetében történt a begyűjtött ínminták fagyasztása és tárolása. Ennek érdekében beruházásra került az ínminták $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatti tárolására alkalmas ultra-mélyhűtő. Az ínminták fagyasztása Falcon-csövekben, a gamma-besugárzás és a fagyasztás káros hatásai ellen védő íntároló oldatban (16.7% 1,2-propándiol, 24.2% dimethyl-szulfoxid, 3.8% D-trehalóz, 2.7% D-mannitol, w/w%) történt. A vizsgálat során összesen hatvan donorból 20-20-20 izolált ínminta került fagyasztásra és tárolásra.

A II. számú Patológiai Intézetben történt a vizsgált ínminták szövettani módszerekkel való vizsgálata. A szövettani vizsgálat magába foglalta a csak fagyasztott valamint a fagyasztott és különböző dózisu (20 kGy és 40 kGy) gamma-sugárzással kezelt csoportokból kiválasztásra került minták víztelenítését, paraffinos beágyazását, a metszetek elkészítését valamint immunhisztokémiai festését (hematoxilin-eozin) és a kapott eredmények kiértékelését.

A szövettani vizsgálat öt különböző helyről vett íntípusból (Achilles, quadriceps, semitendinosus és gracilis, tibialis anterior és peroneus longus) történt. Az vizsgált ínkból formalinos fixálást követően a szakítás helyétől körülbelül 1 cm-es távolságban kereszt- és hosszmetzeti kimetszések készültek. A metszetek hematoxilin-eozin festés után mikroszkópos elemzésre kerültek. Az elemzés eredménye szerint az ín alapvető szerkezete megtartott volt, a kollagénrost kötegek között magfestésüket megőrzött fibrociták voltak azonosíthatóak. Összességében megállapítható volt, hogy a vizsgált ín durva szerkezeti eltérést, mikroszkópos szintű károsodást nem mutattak, a posztvitális károsodásuk minimális volt (2. ábra).



2. ábra

Csak fagyasztott (a), 20 kGy (b) és 40 kGy (c) gamma-sugárzott ínak hematoxin-eozin festése (20x nagyítás).

Megbeszélés

Az általunk kifejlesztett módosított befogó egy jól működő módszer volt. Nagy erők esetén is jól fixálta a mintákat. A fagyasztással kombinált módosított befogófej esetén az Instron 88720 típusú szakítógéppel elért szakítási eredmények jobbak voltak az új rögzítési módszer miatt. Minden más általunk vizsgált rögzítési eljárás során kapott szakítási görbe karakterisztikája inkább hasonlított az elasztikus megnyúláshoz vagy kicsúszáshoz.

Eredményeink azt mutatták, hogy a különböző típusú allograftoknak eltérő iniciális biomechanikai tulajdonságai vannak. Véleményünk szerint a legfontosabb paraméter a Young-modulus, mely leírja, hogy a minta milyen rugalmassággal válaszol a terhelésre. Alacsony dózisu besugárzáskor a Young modulusok vonatkozásában a csoportokat összehasonlítva a TA- és PL-ínak jobban teljesítettek, mint az Achilles-csoport. Magasabb dózis esetén az Achilles-, az STG- és a quadriceps ín rugalmassági modulusa maradt el a PL- és TA-íngraftokhoz képest.

A szakadási erők, a rugalmassági modulus és a maximális feszültségnél fellépő nyúlás kritikus szereppel bírnak egy ízület szalagjaiban fellépő megnyúlás potenciáljában. TA-ín esetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között, a besugárzott minták hasonló elaszticitási tulajdonsággal rendelkeztek, mint a kontroll csoport. Hasonló mért értékekkel rendelkezünk a PL-ínak esetében, azzal a kitételrel, hogy a 42 kGy dózisu besugárzás szignifikánsan növelte a szakadási nyúlást a kontrollhoz képest. A mért rugalmassági tulajdonságok TA-ín esetében szintén nem változtak szignifikánsan. Terminális besugárzás szükséges az allograftok sterilitásának eléréséhez (csíraszám $\leq 10^{-6}$), mely feltétel ekvivalens az orvosi eszközök beültetésének kritériumaival. Alacsony dózisu besugárzás (10-15 kGy) szigorú donorszűréssel és megfelelő feldolgozási eljárással kombinálva – mely olyan baktericid procedúrát használ, ami nem befolyásolja szignifikánsan az iniciális biomechanikai tulajdonságokat – szintén sikeres út lehet a klinikai alkalmazás felé (Samsell és mtsai 2012).

A kis- és nagy dózisu gammabesugárzás a quadriceps és Achilles-íngraftok biomechanikai tulajdonságaira volt a legrosszabb hatással. A sugárzás az STG- és PL-ínakat kevésbé károsította, de a kezdeti biomechanikai tulajdonságaik kedvezőtlenebbek, mint a tibialis anterior inaké. További tény, hogy a hamstring inas pótlás során – mely manapság az egyik legnépszerűbb LCA-pótló eljárás – az ínakat 4 rétegre hajtjuk, és ezeket fonalas öltésekkel

egyesítjük, esetlegesen a gracilis inat is hozzávéve. A TA- és PL-ín opciójakor csak egy ínköteg használata is elégséges.

A graft választást illetően a 3 csoportban mért eredményeink alapján elmondható, hogy:

- Amennyiben egy sebész friss-fagyasztott allografttal szeretne szalagpótlást végezni, úgy az Achilles-ín kivételével a másik 4 általunk vizsgált graft ajánlható. Ebben az esetben az alapos donorszűrés elengedhetetlen feltétel a fertőzőes megbetegedések átvitelének csökkentésére.
- Ha baktericid dózissal kezelt graftokra fordítjuk a figyelmünket, a TA-, PL- és a STG-inek javasolhatóak implantálásra. A virális és egyéb potenciálisan fertőző ágensek elkerülése miatt itt is nagy jelentősége van az alapos donorszűrésnek.
- Amennyiben a legmagasabb szintű mikrobiológiai biztonságra törekszünk, azaz virucid dózisú gammabesugárással kezeljük a mintáinkat, abban az esetben a TA-ín allograft használata a legmegfelelőbb választás.

Célunk egy olyan eljárás kifejlesztése volt, mely csökkenti a gammasugárzás és a fagyasztás káros hatásait az ínmintákon. A későbbiekben egy “off the shelf” típusú terméket kívánunk kifejleszteni. Kutatásunk alapján elmondható, hogy a vizsgált íngraftok közül sterilizált állapotban biomechanikailag és szövettanilag is alkalmas humán alkalmazásra. Ehhez még szükséges egy erre jogosítvánnyal rendelkező laborban biokompatibilitási vizsgálat elvégzése. Jelen ennek megszervezése folyamatban van.

A pályázati idő alatt 10 db előadást tartottunk, nemzetközi konferencián poszterrel szerepeltünk. 2 db supplementum és 2 db impakt faktorral rendelkező angol nyelvű cikk született a pályázati támogatás segítségével. Ebből a témából Dr. Hangody György Márk jelenleg Ph.D. disszertációját már beadta a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájába.

E mellett a szövettani és a még nem közölt adatok publikálását tervezzük.

Budapest, 2017.03.02.

Prof. Dr. Hangody László

Irodalomjegyzék

1. Scheffler S. U., Scherler J., Pruss A., von Versen R., Weiler A. (2005): Biomechanical comparison of human bone-patellar tendon-bone grafts after sterilization with peracetic acid ethanol. *Cell Tissue Bank*, 6: 109–115.
2. Busch MP, Dodd NY (2000) NAT and blood safety: what is the paradigm? *Transfusio* 40:1157-60
3. Scheffler S. U., Gonnermann J., Kamp J., Przybilla D., Pruss A. (2008): Remodelling of ACL allografts is inhibited by peracetic acid sterilization. *Clin. Orthop. Relat. Res*, 466: 1810–1818.
4. Shi D. F., Wang D. M., Wang C. T., Liu A. (2012): A novel, inexpensive and easy to use tendon clamp for in vitro biomechanical testing. *Med. Eng. Phys*, 34: 516–520.
5. Hangody Gy., Pánics G., Szabó G., Kiss R., Hangody L., Pap K. (2016): Pitfalls during biomechanical testing – Evaluation of different fixation methods for measuring tendons endurance properties. *Physiology Int*, 103: 86–93.