

Aus der Klinik für Chirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch)
und
dem Institut für Anatomie
(Direktor: Prof. Dr. med. J. Westermann)
der Universität zu Lübeck

**In-vitro Untersuchungen zur Interaktion implantierbarer
Kunststoffnetze aus Polypropylen mit humanen Fibroblastenkulturen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Tobias Bethge
aus Hamm
Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Broll

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Thilo Wedel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2004
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.11.2004

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak
- Dekan der medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis.....	Seite
1. Einleitung.....	4
1.1. Biomaterialien.....	4
1.2. Biomaterialien in der Hernienchirurgie.....	5
1.2.1. Historischer Überblick.....	5
1.2.2. Operative Methoden der Hernienversorgung.....	6
1.2.3. Implantierbare Kunststoffnetze.....	7
1.3. Eigenschaften des Polypropylen-Netzes.....	9
1.3.1. Chemische und physikalische Eigenschaften.....	9
1.3.2. Morphologische Eigenschaften.....	10
1.4. Marker zur Bestimmung der zellulären Vitalität.....	11
1.4.1. Annexin V – Protein zur Apoptosebestimmung.....	11
1.4.2. Ki-67 – Marker der Zellproliferation.....	12
1.4.3. Hitzeschockprotein 70 – Indikator für zellulären Stress.....	13
1.5. Aufgabenstellung.....	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Zellen.....	15
2.1.1. Verwendete Primärzellen.....	15
2.1.2. Kulturmedium.....	15
2.1.3. Kultivierung der Zellen.....	15
2.1.3.1. Mediumwechsel.....	15
2.1.3.2. Passagieren der Zellen.....	16
2.1.3.3. Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung.....	16
2.1.3.4. Kryokonservierung der Zellen.....	16
2.2. Endotoxintest.....	17
2.3. Kunststoffnetze.....	17
2.3.1. Verwendete Kunststoffnetze.....	17
2.3.2. Aufbereitung der Netze.....	17
2.4. Versuchsaufbau.....	18
2.4.1. Proliferationsindex und Apoptoserate.....	18
2.4.2. Hitzeschockprotein 70 Expression (HSP 70).....	19

2.5. Zellbiologische Methoden.....	19
2.5.1. Durchflusszytometrie.....	19
2.5.1.1. Annexin V Färbung.....	20
2.5.1.2. Ki-67 Färbung.....	20
2.5.1.3. Hitzeschockprotein 70 Färbung.....	20
2.6. Immunzytologische Methoden.....	21
2.6.1. Herstellung von Zytozentrifugenpräparate.....	21
2.6.2. Immunzytochemischer Nachweis der HSP 70 Expression.....	22
2.7. Rasterelektronenmikroskopie.....	23
2.7.1. Aufbereitung der Netze.....	23
2.7.2. Versuchsaufbau.....	23
2.7.3. Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie.....	24
2.8. Lyophilisation.....	24
2.8.1. Herstellung der Lyophilisate.....	24
2.8.2. Inkubation der Fibroblasten mit den Lyophilisaten.....	25
2.9. Massenspektrometrie.....	25
2.10. Statistik.....	26
3. Ergebnisse.....	27
3.1. Vitalitätsprüfung und Endotoxintest.....	27
3.2. Durchflusszytometrische Apoptosebestimmung.....	28
3.2.1. Histogrammbeispiele zur Annexin V- Messung.....	30
3.3. Durchflusszytometrische Ki-67 Bestimmung.....	31
3.3.1. Histogrammbeispiele zur durchflusszytometrischen Ki-67 Bestimmung.....	33
3.4. Morphologie der Fibroblastenkulturen.....	35
3.5. Ergebnisse der HSP 70 Bestimmung.....	37
3.5.1. Durchflusszytometrische HSP 70 Messung.....	37
3.5.2. Histogramme zur HSP 70 Messung.....	38
3.5.3. Immunhistochemischer Nachweis der HSP 70 Expression.....	40
3.6. Polypropylen-Netze unter dem Rasterelektronenmikroskop.....	42
3.6.1. Nicht resterilisierte Polypropylen-Netze.....	42
3.6.2. Resterilisierte Polypropylen-Netze.....	43
3.6.3. Polypropylen-Netze nach Inkubation im Kulturmedium.....	45

3.6.4. Polypropylen-Netze nach Inkubation mit Fibroblasten.....	47
3.7. Lyophilisate der löslichen Bestandteile der Netze.....	48
3.7.1. Apoptosebestimmung der Fibroblasten nach Inkubation mit den Lyophilisaten.....	48
3.7.2. Massenspektrometrische Analyse der Lyophilisate.....	50
4. Diskussion.....	52
4.1. In-vitro Modell.....	52
4.2. Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	53
4.2.1. Einfluss der Polypropylen-Netze auf die Fibroblasten.....	55
4.2.1.1. Apoptoserate.....	55
4.2.1.2. Proliferationsindex.....	56
4.2.1.3. Hitzeschockprotein 70.....	57
4.3. Rasterelektronenmikroskopie der Netze.....	58
4.4. Mögliche Ursachen des wachstumshemmenden Einflusses der resterilisierten Polypropylen-Netze.....	60
4.5. Schlussfolgerung.....	62
5. Zusammenfassung.....	66
6. Literaturverzeichnis.....	68
7. Abkürzungen.....	78
8. Anhang.....	80
8.1. Nährmedien, Kulturmedien und Lösungen.....	80
8.1.1. Nähr- und Kulturmedien.....	80
8.1.2. Lösungen.....	80
8.2. Antikörper und Färbemethoden.....	81
8.2.1. Primärantikörper.....	81
8.2.2. Sekundärantikörper.....	81
8.3. Geräte.....	82
8.4. Tabellen aller Einzelmesswerte der Durchflusszytometrie.....	83
9. Danksagungen.....	87
10. Lebenslauf.....	88

1. Einleitung

1.1. Biomaterialien

In den letzten beiden Jahrzehnten hat der Einsatz von implantierbaren Biomaterialien in verschiedenen Bereichen der Medizin deutlich zugenommen. Verwendet werden Implantate zur Rettung von Leben und zum Erhalt von Extremitäten (z.B. Herzklappen, Katheter, Gefäßprothesen), bei der Wiederherstellung verloren gegangener Funktionen (z.B. Gelenkprothesen) und in der rekonstruktiven Chirurgie (z.B. implantierbare Kunststoffnetze zur Bauchwandrekonstruktion). Biomaterialien wie Gelenkprothesen, Netze oder Schrittmacherelektroden werden in der Medizin zur Langzeitanwendung im menschlichen Körper implantiert oder sind wie bei Kathetersystemen auch nur für eine kurzzeitige Anwendung vorgesehen. Es ist dabei notwendig, zwischen Nutzen und Risiko von Biomaterialien abzuwägen. Bei Implantaten, die der Lebensverlängerung dienen, ist ein gewisses Risiko über einen bestimmten Zeitraum akzeptabel. Im Gegensatz dazu ist zum Beispiel in der rekonstruktiven Chirurgie ein hohes Maß an Sicherheit und eine lange Lebensdauer des Implantates erforderlich (Pizzoferrato et al., 1985; Wintermantel et al., 1999).

Implantierbare Biomaterialien sollten im menschlichen Organismus zwei Eigenschaften erfüllen. Neben einer hohen Biofunktionalität spielt auch die Biokompatibilität des Implantates eine große Rolle. Die Funktion und die Lebensdauer eines Implantates bestimmen die Biofunktionalität. Ein möglichst geringer Einfluss des Implantates auf das umliegende Gewebe auf der einen Seite und ein geringer Einfluss des Gewebes auf das Implantat auf der anderen Seite sprechen für eine hohe Biokompatibilität (Pizzoferrato et al., 1985). Das ideale implantierbare Material sollte daher keinen karzinogenen, toxischen, allergischen oder lokal entzündlichen Effekt auf umliegende Zellen oder Gewebe ausüben und ebenso keine Wundheilungsstörungen verursachen. Bei Verwendung der implantierbaren Kunststoffnetze sollte das Material keine Adhäsionen verursachen. Diese hohen Ansprüche führen zu der Notwendigkeit, implantierbare Biomaterialien im Hinblick auf Biofunktionalität und Biokompatibilität in Tierversuchen und Zellkulturversuchen ausgiebig zu testen (Jenkins et al., 1983; Schumpelick 1999; Deligiannidis et al., 2002).

Pizzoferrato formulierte 1985 die These, dass der Grad der Toxizität eines Biomaterials *in-vitro* meist umgekehrt proportional zu seiner Biokompatibilität *in-vivo* ist. Er schränkt aber auch gleichzeitig ein, dass man nicht immer alle Ergebnisse der *in-vitro* Untersuchungen auf den Menschen übertragen kann, da es sich bei Zellkulturen um kein komplexes Gewebesystem handelt. Die Ergebnisse aus *in-vitro* Untersuchungen müssten daher immer mit *in-vivo* Studien verglichen werden, bevor eine genaue Aussage über die Toxizität eines Biomaterials getroffen werden kann. Die *in-vitro* Untersuchungen haben aber den Vorteil, dass die verwendeten Zellen eine hohe Sensitivität auf toxische Materialien aufweisen und schnell Ergebnisse liefern. Zusätzlich erlaubt der Zellkulturversuch eine gewisse Abstufung der Toxizität und eine Standardisierung der experimentellen Bedingungen. Somit haben sich nach Abwägung der Vor- und Nachteile Zellkulturversuche als geeignete Methode erwiesen, Aussagen über die Zytotoxizität von Biomaterialien zu treffen (Pizzoferrato et al., 1985).

1.2. Biomaterialien in der Hernienchirurgie

1.2.1. Historischer Überblick

Seit ca. 60 Jahren werden im Bereich der Hernienchirurgie implantierbare Biomaterialien in Form von Kunststoffnetzen aus verschiedenen Materialien zur Verstärkung der Bauchwand verwendet. Die ersten polymeren Kunststoffnetze aus Nylon wurden 1944 von Aquaviva entwickelt und eingesetzt. Die Verwendung dieser Nylon-Netze führte zu einer erhöhten Infektionsrate und einer vermehrter Fistelbildung, so dass diese Methode schnell wieder verlassen wurde (Coda et al., 2003).

Polyester ist ein weiterer polymerer Kunststoff, der schon 1939 entwickelt, aber erst 1956 als Kunststoffnetz unter dem Namen Mersilene® eingeführt wurde. Dieses Netz zeigte in Untersuchungen zufrieden stellende Ergebnisse und konnte sich im klinischen Gebrauch durchsetzen. Das von Usher 1959 entwickelte Marlex®-Netz bestand ursprünglich auch aus Polyester, wurde aber 1963 durch eine Neukonstruktion aus Polypropylenfäden ersetzt. Die Verwendung von Polyester-Netzen nahm im Laufe der Zeit mit zunehmender Popularität des Polypropylen deutlich ab (Usher et al., 1959; Lau, 2002).

Ein weiterer Kunststoff zur Herstellung implantierbarer Netze war das 1938 entwickelte Polytetrafluorethylen (PTFE). Ein Netz aus diesem Polymer wurde aber erst 1983 in der

Hernienchirurgie eingesetzt. Das PTFE-Netz hat eine Porengröße von unter 10 µm und ist damit eher eine Art Folie als ein Netz (De Bord, 1998).

Heutzutage steht eine Vielzahl verschiedener Netze aus unterschiedlichen Materialien zur Verfügung. Die Verwendung von resorbierbaren Materialien wie z.B. Polyglactin 910 oder Polyglykolsäure konnten sich wegen des nicht dauerhaften Bruchlückenverschlusses bei größeren Hernien und die dadurch bedingte hohe Rezidivrate nicht richtig durchsetzen. Resorbierbare Polyglactinfäden werden nur noch in Kombination mit Polypropylenfäden hergestellt. In der Hernienchirurgie kommen im wesentlichen Netze aus Polyester, PTFE, Polypropylen und Polypropylen in Kombination mit Polyglactin zum Einsatz, die im Laufe der letzten Jahre mehrfach modifiziert und neu konstruiert wurden. (Lau, 2002; Peiper et al., 2002).

1.2.2. Operative Methoden der Hernienversorgung

Im Laufe der letzten 100 Jahre wurden im Bereich der Narben- und Leistenhernienchirurgie zahlreiche Methoden zur operativen Versorgung der Hernien entwickelt. Gegenwärtig kommen verschiedene Modifikationen dieser Methoden zur Anwendung. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen konventionellen Methoden und der Implantation von Fremdmaterial oder autodermalen Plastiken. Als konventionelle Methoden gelten z.B. der einfache Faszienschluß durch direkte Stoß-auf-Stoß Naht, die 1901 entwickelten Fasziendopplung nach Mayo bei Narbenhernien (Mayo, 1901; Paul et al., 1997) oder die von Shouldice entwickelte Methode zur operativen Versorgung von Leistenhernien (Shearburn et al., 1969). Die autodermale Hernioplastik, die auch Kutisplastik genannt wird, spielt in Deutschland zur operativen Versorgung von Hernien keine Rolle mehr (Korenkov et al., 2002).

Bei der Implantation von Kunststoffnetzen wird grundsätzlich zwischen drei verschiedenen Methoden unterschieden. Erstens die so genannte Onlay-Implantation, bei der das Netz auf der äußeren Muskel-Faszienschicht der Bauchwand am Übergang zur Subkutis fixiert wird. Zweitens die Inlay-Implantation, bei der das Netz vergleichbar mit der einfachen Stoß-auf-Stoß Naht zwischen den Muskelrändern vernäht wird. Diese Technik konnte sich aber nicht richtig durchsetzen, da die Rezidivrate mit bis zu 46% sehr hoch war. Und drittens die Sublay-Implantation, die in Deutschland die gebräuchlichste Methode darstellt. Bei dieser Methode werden die Netze präperitoneal unter der Muskulatur platziert.

Langzeitstudien der Sublay-Implantation zeigen die besten Ergebnisse und die geringsten Komplikationen, da die Netze durch den abdominellen Druck zusätzliche Stabilität erhalten und besser vor Dislokationen geschützt sind (Vestweber et al., 1997; Schumpelick et al., 1999; Korenkov et al., 2002).

Des Weiteren existieren von der Sublay-Implantationstechnik verschiedene Modifikationen. Zu nennen sind hier beispielsweise die Herniotomie nach Lichtenstein, bei der das Netz unter der Aponeurose des Musculus obliquus externus abdominis zu liegen kommt (Lichtenstein et al., 1989; Amid, 2003), die von Schumpelick 1996 vorgestellte transinguinale präperitoneale Prothese (TIPP) und die laparoskopischen Techniken wie die transabdominelle präperitoneale (TAPP) oder die totale extraperitoneale Prothese (TEP), bei der die Netze ebenfalls in einer Sublay Position implantiert werden (Schumpelick und Arlt, 1996; Schumpelick et al., 1999).

1.2.3. Implantierbare Kunststoffnetze

Heute ist die Verwendung von Biomaterialien in der moderne Hernienchirurgie nicht mehr wegzudenken. Weltweit werden pro Jahr über eine Million Kunststoffnetze implantiert. Ihren Einsatz finden diese so genannten Meshes vor allem in der Leisten- und Narbenhernienchirurgie. Die primäre Aufgabe der Kunststoffnetze ist die Verstärkung und Stabilisierung der Bauchwand. Dies wird zum einen durch den mechanischen Verschluss und zum anderen durch die Induktion einer festen Narbenplatte durch das implantierte Netz erreicht (Bellon et al., 1995; Klinge et al., 1999; Klosterhafen et al., 2000; Klosterhafen et al., 2002).

In einem Vergleich zweier Umfragen von 1995 und 2001 unter 732 chirurgischen Kliniken in Deutschland zeigte Korenkov einen Anstieg der Anzahl von Hernienoperation und somit auch eine deutliche Zunahme der Verwendung von implantierbaren Kunststoffnetzen. Während 1995 noch 85% der Kliniken bei der Versorgung von primären Narbenhernien die konventionelle Technik bevorzugten, waren es 2001 gerade einmal 20%. Ca. 80% der Hernien mit einem Durchmesser über 5 cm werden heutzutage mit einem implantierbaren Netz versorgt, das in der Mehrheit der Fälle in Sublay-Position implantiert wird (Korenkov et al., 2002). Es existieren inzwischen auch Studien, die schon bei kleineren Hernien ab einem Durchmesser von 2 cm eine Netzversorgung empfehlen (Luijendijk et al., 2000). Bei großen Hernien werden in Deutschland am häufigsten Polypropylen-Netze implantiert,

von denen mit ca. 33% das Prolene®-Netz die größte Gruppe darstellt (Korenkov et al. 2002). Zusätzlich zu den Narbenhernien werden heute auch primäre Leistenhernien und vor allem Rezidivleistenhernien in zunehmender Zahl mit implantierbaren Kunststoffnetzen versorgt (Barrat et al., 2003).

Die konventionellen Methoden zur Versorgung von Hernien wie die Mayo-Faszien-Dopplung oder die direkte Stoß-auf-Stoß-Nahttechnik zeigen keine zufrieden stellende Ergebnisse und weisen Rezidivraten von 20-50% auf (Langer et al., 1985; Trupka et al., 1997; Langer et al., 2003). Mit der Zunahme der Implantation von Kunststoffnetzen konnte die Rezidivrate auf weniger als 10% gesenkt werden (Amid et al., 1992, Lichtenstein et al., 1993, Amid et al., 1996, Shulman et al., 1996), gleichzeitig stieg damit aber auch die Rate der Komplikationen.

In 30-50 % der Fälle entstand nach der Implantation eines Netzes ein Serom oder Hämatom im Bereich der Implantationsstelle, 10-20% der Patienten klagten über Parästhesien und 25% berichteten über eine eingeschränkte Beweglichkeit im Bereich der Bauchwand (Amid et al., 1994, Langer et al., 1996, Schumpelick et al., 1996). Bis zu 50% der Patienten, denen ein großflächiges Netz implantiert wurde, klagten über Beschwerden im Sinne von Missempfindungen, Nervenirritationen, Bewegungseinschränkungen oder lang anhaltende Schmerzen im Implantationsbereich. (Klein et al., 1996; Klinge et al., 1996; Vestweber et al., 1997).

In einem speziellen Fall wurde von einem Patienten berichtet, bei dem nach einer laparoskopischen Implantation eines Netzes ein unspezifisches und konservativ nicht beherrschbares inguinales Schmerzsyndrom aufgetreten war. Auch nach mehrfachen Revisionen mit Entfernung von Clips und Nervendurchtrennungen konnten die Schmerzen nicht gelindert werden. Die anschließend notwendige Explantation des Netzes zeigte eine massive Schrumpfung und Faltung des Implantates (Schumpelick et al., 1997).

Des Weiteren findet man in der Literatur Berichte über Netzwanderungen mit Arrosionen von Organen wie Haut, Darm oder auch Blase (Hume et al., 1996). In einigen Fällen bildete sich nach Implantation eines Netzes eine enterocutane oder colovesicale Fistel, die eine anschließende Explantation der Netze und operative Versorgung der Fistel notwendig machte (Gray et al., 1994; De Guzman et al., 1995). Bei einem Patienten trat eine enterocutane Fistel nach einer Polypropylennetzimplantation erst nach zehn Jahren auf. Das Implantat hatte sich massivst infiziert und war disloziert (Losanoff et al., 2002).

Liakakos et al. berichteten in ihrer Studie von einer akuten Infektion eines Polypropylen-Netzes 12 Jahre nach der Implantation (Liakakos et al., 1994). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass Biomaterialien die Persistenz der Bakterien in der Wunde begünstigen (Osterberg et al., 1979) und nach Jahren wieder explantierte Polypropylen-Netze eine deutliche Bakterienbesiedlung aufwiesen (Peiper et al., 2002). Die nachgewiesene Bakterienpersistenz könnte eine Erklärung für die nach Jahren auftretenden Infektionen des Implantatlagers sein (Taylor et al., 1999). Diese Beispiele zeigen, dass sich auch Jahre nach der Implantation der Polypropylen-Netze noch Komplikationen entwickeln können, die eine Explantation der Netze notwendig macht.

1.3. Eigenschaften des Polypropylen-Netzes

1.3.1. Chemische und physikalische Eigenschaften

Polypropylen ist eines der am meisten verwendeten Materialien im Bereich der Hernienchirurgie (Klinge et al., 1999). Ausgangspunkt dieses Polymers ist das Propen mit der Summenformel $-\text{C}_3\text{H}_6\text{-}$ (Strukturformel siehe **Abb. 1**). Hergestellt wird das Polypropylen durch Niederdruck-Fällungs-Polymerisation von Propengas an metallorganischen Katalysatoren (Saechtling, 2001). Polypropylen ist ein Thermoplast mit einem Erweichungspunkt von 160°C und mit einem Molekulargewicht von 190.000 g/mol. Die einzelnen Faserstoffe erreichen eine Festigkeit von Stahl obwohl Polypropylen nur ein Achtel der Dichte von Eisen besitzt (Schumpelick et al., 1999).

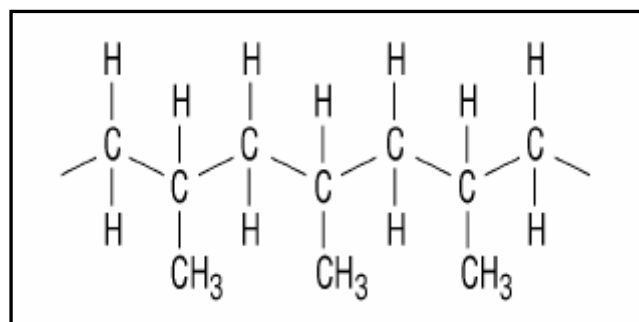


Abb. 1: Strukturformel von Polypropylen (Quelle: Saechtling, 2001)

1.3.2. Morphologische Eigenschaften

Das in der **Abb. 2** dargestellte Prolene[®]Netz (Ethicon, Norderstedt) besteht aus einem nicht resorbierbaren Monofilament mit einem Durchmesser von ca. 0,15 mm. Es hat eine Porengröße von ca. 1,0-1,6 mm und ein Flächengewicht von 108,5 g/m². Somit gehört das Prolene[®]Netz zu den eher kleinporigen Netzen (Klinge et al., 1998). Nach Angaben des Herstellers besteht das Polypropylen-Netz aus einem monofilen, hydrophoben Faden mit glatter, porenfreier Oberfläche, der keinem hydrolytischen Abbau unterliegt. Das in verschiedenen Größen lieferbare Netz kann in unterschiedliche Formen geschnitten werden, ohne an Elastizität oder mechanischer Stabilität zu verlieren (Ethicon, Norderstedt).

Es existieren unter den Polypropylen-Netzen der verschiedenen Herstellern Unterschiede in der Beschaffenheit der Netze und somit auch in ihrem Einfluss auf das umliegende Gewebe. Die Netze unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Flächengewicht und der Porengröße. Netze mit größeren Poren und einem niedrigeren Gewicht üben einen geringeren Einfluss auf das umliegende Gewebe aus (Peiper et al., 2002).

Polypropylen-Netze induzieren nach der Implantation eine akute inflammatorische Reaktion des umliegenden Gewebes. Histologische Untersuchungen zeigen, dass diese Entzündungsreaktion bei Polypropylen und speziell bei den Prolene[®]-Netzen hauptsächlich durch eine Rekrutierung von polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen gekennzeichnet ist und anschließend von einer perifilamentären Fibrose begleitet wird (Klosterhafen et al., 1997; Schumpelick et al., 1999; Rosch et al., 2003). Die Poren der Netze werden zunehmend von Zellen wie Fibroblasten durchwachsen, so dass schließlich das Netz vollständig in eine Narbenplatte eingewachsen ist. Explantierte Netze zeigten in klinischen Studien und in Tierversuchen durch die Fibrosierung eine Verhärtung und deutliche Schrumpfung um ca. 20-30 % im Vergleich zur Ursprungsgröße (Bellon et al., 1995; Klinge et al., 1998; Klosterhafen et al., 2002). Bei der Implantation der Polypropylen-Netze ist darauf zu achten, dass das Peritoneum intakt bleibt, da gerade das Polypropylen bei direktem Kontakt mit dem Intestinum zu massiven Adhäsionen bis hin zur Fistelbildung führen kann. (Vestweber et al., 1997; Bellon et al., 1998; Vrijland et al., 2000; Brent et al., 2003).

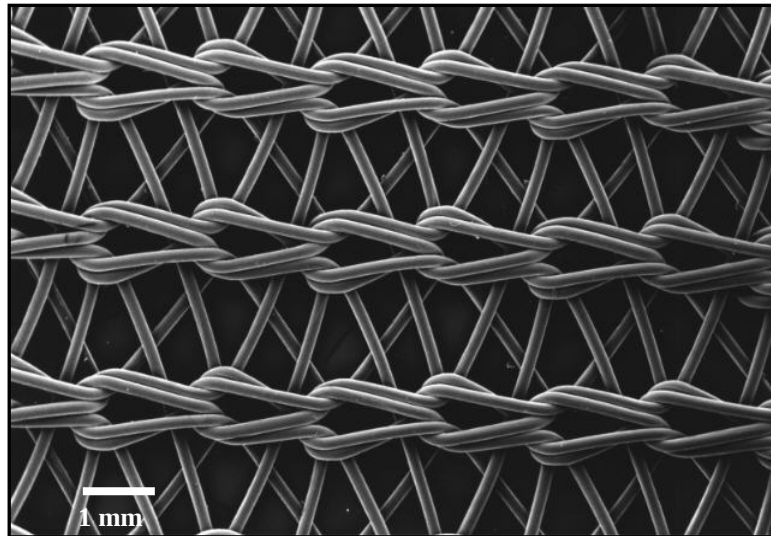


Abb. 2 : Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme eines Polypropylen-Netzes (siehe 2.7.);
Original: 10fache Vergrößerung

1.4. Marker zur Bestimmung der zellulären Vitalität

1.4.1. Annexin V – Protein zur Apoptosebestimmung

Der Vorgang der Zellapoptose ist durch viele verschiedene Merkmale charakterisiert wie zum Beispiel die Aggregation des Chromatins an der Kernmembran, Schrumpfung des Zytoplasmas und Fragmentation der DNA.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die Veränderung der Zellmembran. Die Zellmembran besteht aus einer Doppellipidschicht mit asymmetrisch verteilten Phospholipiden. Phosphatidylserine sind negativ geladene Phospholipide, die in einer gesunden Zelle im Gegensatz zu anderen Phospholipiden wie Phosphatidylcholin nur auf der inneren Seite der Zellmembran vorkommen. Die Apoptose führt unabhängig vom Zelltyp zu einer Translokation des Phosphatidylserins von der inneren auf die äußere Seite der Membran (siehe **Abb. 3**). Dieser Vorgang zählt zu der frühen Phase der Apoptose, in der die Zellmembranen noch intakt sind (Darzynkiewicz et al., 1997; van Engeland et al., 1998).

Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, an Phospholipide bindendes Protein mit sehr hoher Affinität für Phosphatidylserin. Das macht Annexin V zu einem Marker für die frühe Phase der Apoptose. Die Durchflusszytometrie hat sich hierbei als geeignete Methode erwiesen,

mit Hilfe von Fluorescein (FITC) konjugiertem Annexin V die Apoptoserate innerhalb einer Zellsuspension zu bestimmen. Zusätzlich werden die Zellen mit Propidiumjodid angefärbt, um die apoptotischen Zellen von den nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Propidiumjodid hat die Eigenschaft, DNA zu färben und kann somit nur nekrotische Zellen mit defekter Zellmembran markieren. Zellen in der frühen Phase der Apoptose mit intakter Membran sind somit Annexin V positiv aber Propidiumjodid negativ angefärbt (Vermes et al., 1995).

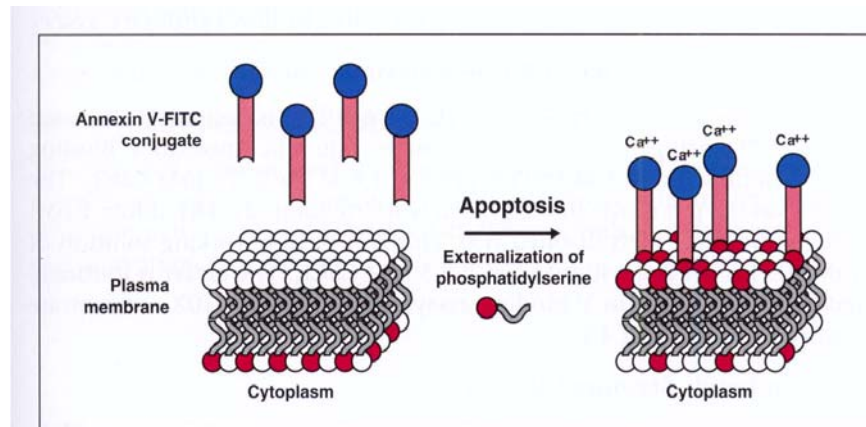


Abb. 3: Schematische Darstellung der Annexin V Färbung. Bei gesunden Zellen kann Annexin V nicht binden; die Phosphatidylserine sind auf der Innenseite der Membran lokalisiert. In der frühen Apoptose kehren sich die Phosphatidylserine nach außen um und Annexin V kann in Anwesenheit von Calcium an das Phospholipid binden (Quelle: Pharmingen, Heidelberg)

1.4.2. Ki-67 – Marker der Zellproliferation

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ki-67 lässt sich eine Aussage über die Proliferationsrate einer Zellkultur treffen. Dieser Antikörper bindet an das humane Ki-67 Antigen, welches nur innerhalb des Kerns proliferierender Zellen zu finden ist. Nicht proliferierende Zellen, die sich in der Ruhephase des Zellzyklus befinden, exprimieren kein Ki-67 Antigen (pKi-67) (Gerdes et al., 1984). Speziell die Durchflusszytometrie und die Immunhistochemie haben sich als geeignet erwiesen, mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ki-67 die Proliferationsrate von Zellen zu bestimmen. pKi-67 ist einer der am meist benutzten Marker zur Ermittlung der Proliferationsrate von Zellen aus Zellkulturen, soliden Tumoren oder in Geweben und hat sich somit zu einer Standardmethode entwickelt. Voraussetzung für die durchflusszytometrische Proliferationsbestimmung ist die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, damit die monoklonalen Ki-67 Antikörper in den Zellkern gelangen können (Schwartz et al., 1985). Es existieren heute viele

verschiedene Methoden die Zellen zu fixieren, die für jede einzelne Zellkultur speziell getestet werden muss. Die verwendete Methode mit Paraformaldehyd und Triton-X 100-Lösung scheint dabei die besten Ergebnisse zu liefern und hat sich als Standardmethode durchgesetzt (Endl et al., 2001).

1.4.3. Hitzeschockprotein 70 (HSP 70) – Indikator für zellulären Stress

Das HSP 70 gehört zu der Familie der Hitzeschockproteine, die hauptsächlich im Nukleus, in den Nukleoli und im Zytoplasma der Zellen vorkommen und an Reparaturprozessen von geschädigten Proteinen oder an der DNA-Replikation innerhalb der Zelle beteiligt sind (Welch und Suhan, 1986; Milarski et al., 1989). Untersuchungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie haben gezeigt, dass eine geringe Expression des HSP 70 auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet. Im Gegensatz dazu reagieren Zellen unter Stress (z.B. bei einer Temperaturerhöhung auf über 42°C über einen längeren Zeitraum) mit einem deutlichen Anstieg der HSP 70-Expression (He und Fox, 1996). Die schnelle Reaktion auf zellulären Stress macht dieses Protein zu einem geeigneten Marker für Zellkulturversuche oder histologische Gewebsschnitte. Klosterhafen nutzte die HSP 70 Bestimmung zur Untersuchung von explantierten Kunststoffnetzen nach Langzeitimplantation im Menschen (Klosterhafen et al., 2000). Die Durchflusszytometrie stellte sich als weitere geeignete Methode dar, die zelluläre Expression des HSP 70 Proteins innerhalb der Zellen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers zu bestimmen. (He und Fox, 1996; Hang und Fox, 1996).

1.5. Aufgabenstellung

Kunststoffnetze aus Polypropylen werden seit ca. 50 Jahren in der Chirurgie zur Versorgung von Narben- und Leistenhernien eingesetzt. Der Gebrauch dieser so genannten Meshes führte auf der einen Seite zu einer deutlichen Abnahme der Rezidivraten, auf der anderen Seite stieg mit der zunehmenden Verwendung implantierbarer Polypropylen-Netze auch die Anzahl der Früh- und Spätkomplikationen. Diese Komplikationen sind in zahlreichen Studien beschrieben worden (siehe 1.2.3.) und zeigen deutlich, dass die Biokompatibilität der Netze noch nicht optimal ist. Leider ist aber über die Interaktion auf molekularer Ebene zwischen den implantierbaren Kunststoffnetzen und dem umliegenden Gewebe nur wenig bekannt. Es ist der Verdienst der Arbeitsgruppe um Schumpelick,

erstmals immunhistochemische Untersuchungen an explantierten Netzen durchgeführt zu haben. Es zeigte sich in dieser Studie neben einer gesteigerten proliferativen Aktivität auch eine erhöhte Apoptoserate der Zellen, die aus der direkten Umgebung von explantierten Polypropylen-Netzen stammten (Schumpelick et al., 1999; Klosterhafen et al., 2000).

Aufgrund der in der Literatur bisher fehlenden Zellkulturuntersuchungen soll in einem *in-vitro* Modell der Einfluss eines implantierbaren Polypropylen-Netzes (Prolene[®], Ethicon, Norderstedt) auf humane Fibroblasten getestet werden. Humane Fibroblasten erweisen sich hierbei als geeignete Primärzellen, da sie nach der Implantation des Netzes *in-vivo* für die Durchwachsung der Netze und die Bildung einer Narbenplatte verantwortlich sind (Klinge et al., 1998; Klosterhafen et al., 2002). Untersucht werden dazu mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Apoptoserate (programmierter Zelltod), die proliferative Aktivität und die HSP 70 Expression der Fibroblasten nach verschiedenen Inkubationszeiten mit dem Polypropylen-Netz.

Vom Hersteller werden die Polypropylen-Netze mit Ethylenoxid-Gas sterilisiert angeboten und sollten nicht resterilisiert werden. Jedoch wird auf Untersuchungen verwiesen, die ergaben, dass die Wiederaufbereitung von aus der Packung entnommenen Netzen nicht von Nachteil ist, wenn sie nicht mehr als einmal in einem Dampfautoklaven bei 121°C für 20 min resterilisiert werden. Daraus stellen wir uns die Fragen, ob die resterilisierten Polypropylen-Netze einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Fibroblasten in unserem *in-vitro* Modell haben und ob der Vorgang des Resterilisierens möglicherweise eine Strukturveränderung der Netze bewirkt. Untersucht werden dazu mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Apoptose- und die Proliferationsrate der Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit den resterilisierten Polypropylen-Netzen. Um die Struktur der resterilisierten und der nicht resterilisierten Netze untersuchen zu können wurden die Netze unter einem Rasterelektronenmikroskop analysiert und miteinander verglichen. Zusätzlich wurden Proben von destilliertem Wasser, das jeweils für 48 Std mit den Netzen inkubiert wurden in einem Massenspektrometer untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Zellen

2.1.1. Verwendete Primärzellen

Die *in-vitro* Untersuchungen der Polypropylen-Netze erfolgten mit humanen Fibroblasten (HFIB, Cell-lining, Berlin). Die Fibroblasten stammten von einer 26jährigen Frau der weißen Rasse („caucasien female“).

2.1.2. Kulturmedium

Als Basismedium für die Kultivierung von humanen Fibroblasten wurde RPMI-1640-Medium (Gibco BRL, Berlin) verwendet. Dem Medium wurde fötales Kälberserum (FKS), Glutamin, Hepes-Puffer (Gibco BRL, Berlin), sowie zur Verhinderung von Bakteriumswachstum eine Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt (siehe Anhang). Die Zellen wurden in einem mit 5% CO₂ begasten Feuchtbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C kultiviert.

2.1.3. Kultivierung der Zellen

2.1.3.1. Mediumwechsel

Zur Vitalitätserhaltung der Fibroblasten wurde alle 48 Std ein Mediumwechsel durchgeführt, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich der Zusätze von den Zellen metabolisiert wurden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfielen. Das verbrauchte Medium wurde mit Hilfe einer Pipette abgenommen, die Zellen mit kalter „Phosphate Buffered Saline“ Lösung (Dulbecco's PBS, Gibco BRL, Berlin) gewaschen und anschließend die Zellkulturflasche mit frischem Medium aufgefüllt.

2.1.3.2. Passagieren der Zellen

Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte in Zellkulturflaschen der Firma Nunc. Nach der Bildung eines Monolayers (ca. 80-90% Konfluenz) wurden die adhärent wachsenden Fibroblasten mit PBS gewaschen und mit einer 1:250 verdünnten Trypsin-Lösung (Gibco BRL, Berlin) zur Ablösung der Zellen für 5-10 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurden die Fibroblasten in 15 ml Röhrchen überführt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (5 min, 1200 U/min, 4° C) Anschließend wurden sie in einer Konzentration von ca. $1-1,5 \times 10^6$ Fibroblasten in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium ausgesät.

2.1.3.3. Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung

Die Bestimmung der Zellzahl und die Überprüfung der Vitalität erfolgte mit Hilfe der Trypanblau-Färbung. Dabei wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%, Sigma, St Louis, USA) in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und in einer Zählkammer (Typ Neubauer, Brand, Ludwigshafen) mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axioplan, Oberkochen) ausgezählt. Trypanblau kann nur durch die perforierte Membran toter Zellen diffundieren und diese blau anfärben. Im Gegensatz dazu können die vitalen Zellen von dem Trypanblau nicht angefärbt werden und erscheinen unter dem Mikroskop farblos. Berechnet wurde der prozentuale Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl.

2.1.3.4. Kryokonservierung der Zellen

Zur Langzeitlagerung der Fibroblasten wurden die Zellen wie unter 2.1.3.2. beschrieben trypsiniert, gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^6 in 1 ml Einfriermedium (siehe Anhang) aufgenommen. Anschließend wurden die Fibroblasten in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) überführt. Die Röhrchen wurden zunächst in Zellstoff eingewickelt und für einen Tag bei -80°C schonend eingefroren. Anschließend wurden die Röhrchen im flüssigen Stickstoff gelagert.

2.2. Endotoxintest

Um eine mögliche bakterielle Kontamination und somit einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Fibroblasten ausschließen zu können, wurde das bakterielle Endotoxin im Medium der Versuchsansätze gemessen. Der Endotoxintest erfolgte mit Hilfe des Limulus Amöbozyten Lysat (LAL) Test (COATEST® Endotoxin; Chromogenix AB; Mölndal, Schweden). Nach Angaben des Herstellers enthält das LAL ein Enzym, das in Anwesenheit von bakteriellem Endotoxin aktiviert wird. Dieses aktivierte Enzym ist in der Lage aus dem zugefügten chromogenen Substrat S-2423 para-Nitro-Anilin (pNA) herauszulösen und gelb anzufärben. Die pNA Entstehung kann photometrisch gemessen werden und erlaubt eine quantitative Bestimmung des bakteriellen Endotoxins im flüssigen Medium. Für diesen Versuch wurden die Fibroblasten mit den Proben der nicht resterilisierten und resterilisierten Netze für 24 bzw. 48 Std im Brutschrank inkubiert und anschließend das Medium zur quantitativen Bestimmung des bakteriellen Endotoxins abgenommen. Nach Vorinkubation der Proben mit der LAL-Reagenz wurde das chromogene Substrat S-2423 in die Mikroplatten hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und in einem Mikroplattenleser bei 37°C und 405 nm ausgewertet.

2.3. Kunststoffnetze

2.3.1. Verwendete Kunststoffnetze

Für die Versuche wurden implantierbare Kunststoffnetze aus Polypropylen (Ethicon, Norderstedt) verwendet. Polypropylen ist ein Polymer mit der Summenformel $-\text{[C}_3\text{H}_6\text{]}_n-$. Netze aus diesem Material sind nicht resorbierbar und weisen eine sehr gute mechanische Stabilität aus. Vom Hersteller werden die Netze mit Ethylenoxid-Gas sterilisiert.

2.3.2. Aufbereitung der Netze

Die Polypropylen-Netze wurden unter sterilen Bedingungen auf eine Größe von 2 x 2 cm (ca. 35 mg) zerschnitten und sofort für die Versuche verwendet. Für die Ansätze mit den resterilisierten Netzen wurden die Netze in Autoklavierfolie (SBW, Self Seal Sterilisation Pouch, Smith Brothers, Whitehaven) eingeschweißt und nach Angaben des Herstellers bei

121°C für 20 min in einem gewöhnlichen Dampfautoklaven (Webeco Modell CS-V, Webeco, Bad Schwartau) resterilisiert und anschließend auch für die entsprechenden Versuche mit den Fibroblasten inkubiert.

2.4. Versuchsaufbau

2.4.1. Proliferationsindex und Apoptoserate

Für die Bestimmung des Proliferationsindex und der Apoptoserate wurden die Fibroblasten nach der Bildung eines Monolayers, wie unter 2.1.3.2. beschrieben, geerntet. Die Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Vertiefung in eine Standard-6-Loch-Platte (Nunc Brand Products, Dänemark) eingesät und mit den Polypropylen-Netzen für 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 und 48 Std, wie unter 2.1.2. beschrieben, inkubiert. Der Versuch bestand insgesamt aus drei verschiedenen Ansätzen (siehe **Abb. 4**). Gruppe 1: Inkubation der Fibroblasten mit nicht resterilisierten Netzen, Gruppe 2: Inkubation der Fibroblasten mit resterilisierten Netzen und Gruppe 3: Ansätze mit Fibroblasten ohne die Zugabe eines Netzes als Kontrollgruppe.



Abb. 4: Versuchsaufbau der *in-vitro* Untersuchung

In den oberen Vertiefungen der 6-Loch-Platte befinden sich Fibroblasten mit nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen; in der mittleren Reihe Fibroblasten mit resterilisierten Polypropylen-Netzen; in der unteren Reihe als Kontrollgruppe nur Fibroblasten

2.4.2. Hitzeschockprotein 70 Expression (HSP 70)

Für die Messung der HSP 70 Expression wurde die Fibroblasten in einer Konzentration wie unter 2.4.1. beschrieben in eine Standard-6-Loch-Platte eingesät (siehe **Abb. 5**) und für die entsprechenden Zeiten inkubiert (siehe 2.1.2.). In diesem Versuchsansatz wurden Fibroblasten nach Inkubation mit nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen mit einer Kontrollgruppe ohne Netze verglichen.



Abb. 5: Versuchsaufbau der *in-vitro* Untersuchung der HSP 70 Expression

In der oberen Reihe der Vertiefungen befinden sich Fibroblasten mit nicht resterilisierten Netzen; in der unteren Reihe befinden sich Fibroblasten als Kontrollgruppe

2.5. Zellbiologische Methoden

2.5.1. Durchflusszytometrie

Der Proliferationsindex, die Apoptoserate und die Hitzeschockprotein 70 Expression wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACscan[®]; Becton Dickinson, Heidelberg) nach Anfärbung der Fibroblasten mit speziellen Antikörpern bestimmt.

2.5.1.1. Annexin V Färbung

Die Aufbereitung der Fibroblasten erfolgte mit Hilfe des Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen; Heidelberg). Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Fibroblasten aus den Standard-6-Loch-Platten mit Hilfe von Trypsin-Lösung geerntet, in 5 ml Röhrchen (Falcon, Round-Bottom Tubes, BD, Heidelberg) überführt und mehrmals mit PBS gewaschen (4°C, 1200 U/min, 5 min). Nach der Zugabe von 100 µl des „Binding-Buffers“ (siehe Anhang), 5 µl Annexin V, 2 µl Propidium-Iodid-Lösung (siehe Anhang) und fünfzehn minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurden nochmals 400 µl des „Binding-Buffers“ zu der Zellsuspension gegeben, anschließend sofort im Durchflusszytometer gemessen und mit Hilfe des Programms CellQuest Version 3.2 ausgewertet. Als Kontrollen dienten 1. ungefärbte Fibroblasten, 2. Ansätze, die nur mit Annexin V gefärbt und 3. Ansätze, die nur mit Propidiumiodid gefärbt wurden.

2.5.1.2. Ki-67 Färbung

Die Fibroblasten wurden wie unter 2.5.1.1. geerntet und anschließend mit einem Wasch-Puffer (siehe Anhang) gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl des Waschpuffers in jedes Röhrchen folgte die Fixierung der Fibroblasten mit 500 µl 2%iger Paraformaldehyd-Lösung (siehe Anhang) für 10 min auf Eis. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer 0,25%igen Triton-X-100-Lösung (siehe Anhang) für 5 min auf Eis inkubiert und zweimal mit dem Wasch-Puffer gewaschen (4°C, 1200 U/min, 5min). Die Fibroblasten wurden mit dem FITC-konjugierten monoklonalen Maus Antikörper gegen das humane Ki-67-Antigen (Verdünnung 1:10, Code Nr.: F 0788, Dako, Glostrup, Dänemark) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals mit dem Waschpuffer zentrifugiert. Als letzter Schritt folgte die Resuspendierung in 500 µl der Diluid Acid free-Lösung (JT Baker, Deventer, Holland) für die Messung im Durchflusszytometer. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Inkubation mit dem Ki-67-Antikörper.

2.5.1.3 Hitzeschockprotein 70 Färbung

Die Aufbereitung der Fibroblasten für die HSP 70 Messungen im Durchflusszytometer erfolgte wie unter 2.5.1.1. beschrieben. Die Fibroblasten wurden aus den Standard-6-Loch-

Platten geerntet und wie unter 2.5.1.2. beschrieben fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten monoklonalen Antikörper (Maus) gegen das humane Hitzeschockprotein 70-Antigen (Anti-Hsp70, Cat.-Nr.: 386032, Calbiochem, USA) für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen mit dem Wasch-Puffer (4°C, 1200 U/min, 5 min) erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper (FITC-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins, Code-Nr.: F 0313, Verdünnung 1:20, Dako, Glostrup, Dänemark) für 45 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit und einem weiteren Waschschriff mit der 1%igen FKS-Lösung (siehe Anhang) wurden die Fibroblasten wie unter 2.5.1.2. beschrieben in Diluid Acid Free-Lösung resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen. Als Negativkontrollen dienten in diesem Fall Ansätze, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden. Die Positivkontrolle waren Fibroblasten, die im Wasserbad auf 42°C für 15 min erhitzt und somit thermischen Stress ausgesetzt wurden (He und Fox, 1996; Hang und Fox, 1995; Milarski et al., 1989).

2.6. Immunzytologische Methoden

2.6.1. Herstellung von Zytozentrifugenpräperaten

Die Fibroblasten wurden aus den 6-Loch-Platten geerntet (siehe 2.1.3.2.) und in 100 µl PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei 700 U/min für 5 min mit einer Zytozentrifuge (Shandon, Cytospin 2, Pittsburgh, PA) auf Objektträger zentrifugiert. Nach dem Trocknen über Nacht wurden die Objektträger bei -80° C gelagert und anschließend immunzytochemisch angefärbt.

2.6.2. Immunzytochemischer Nachweis der HSP 70 Expression

Der immunzytochemische Nachweis des Hitzeschockproteins 70 erfolgte mit Hilfe der APAAP-Methode (Code-Nr.: D 0651, Dako, Glöstrup, Dänemark) nach folgender Anleitung:

- 10 min Fixierung der Fibroblasten mit Aceton, anschließend 10 min Einwirken in Chloroform
- 5 min Lufttrocknen
- 20 min Inkubation mit Blocking-Solution (Dako, Glöstrup, Dänemark)
- 30 min Inkubation mit Primärantikörper (Anti-HSP 70, 1:200 in Tris verdünnt, siehe 2.5.1.3.)
- 30 min Inkubation mit sekundären Antikörper (Ansatz: 200 µl des sekundären AK auf 500 µl Humanserum auf 3,3 ml 10%iger FKS-Lösung)
- 30 min Inkubation mit dem APAAP-Komplex (1:50 verdünnt, 100 µl APAAP auf 4,9 ml FKS)
- 15 min Inkubation mit sekundären Antikörper
- 15 min Inkubation mit dem APAAP-Komplex
- Färben der Zellen
- ca. 1 min gegenfärben mit HE

Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Jedem Schritt folgte ein dreimaliges Spülen mit Tris-Puffer. Die Präparate wurden mit Aquatex® (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Anschließend wurden die Präparate lichtmikroskopisch ausgewertet und fotografiert. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten Ansätze wie unter 2.5.1.3. beschrieben.

2.7. Rasterelektronenmikroskopie

2.7.1. Aufbereitung der Netze

Wie schon in den vorangegangenen Versuchen verwendeten wir für die Rasterelektronenmikroskopie implantierbare Kunststoffnetze aus Polypropylen (Prolene[®], Ethicon, Norderstedt). Die nicht resterilisierten Kunststoffnetze wurden unter sterilen Bedingungen auf eine Größe von ca. 1 cm² zerschnitten und sofort für die Untersuchungen verwendet. Die resterilisierten Netze wurden auch auf eine Größe von ca. 1 cm² zerschnitten, wie unter 2.3.2. beschrieben, nach Angaben des Herstellers in einem Dampfautoklaven resterilisiert und anschließend für die drei verschiedenen Versuchsansätze verwendet.

2.7.2. Versuchsaufbau

Mit der Rasterelektronenmikroskopie sollten die nicht resterilisierten und die resterilisierten Polypropylen-Netze unter drei verschiedenen Bedingungen verglichen werden. In der ersten Gruppe wurden die nativen Netze und die resterilisierten Netze ohne weitere Aufbereitung oder Inkubation sofort im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die zweite Gruppe bildeten nicht resterilisierte und resterilisierte Polypropylen-Netze, die nach 48stündiger Inkubation im speziellen Zellkulturmedium (siehe 2.1.2.) in einer 6-Loch-Platte (siehe **Abb. 4**) bei 37° C im Rasterelektronenmikroskop untersucht wurden. In der dritten Gruppe wurden die Aufnahmen der Netze erst nach 48stündiger Inkubation mit Fibroblasten im Kulturmedium angefertigt. Dafür wurden die Fibroblasten bis zur Anzucht eines Monolayers im Brutschrank kultiviert, geerntet und dann in einer Konzentration von 3×10^4 Fibroblasten in die 6-Loch-Platten ausgesät (**Abb. 4**). Anschließend wurden die resterilisierten und nicht resterilisierten Netze in die Vertiefungen gegeben und wie unter 2.1.2. beschrieben inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Netze aus den Platten entfernt, gespült, getrocknet und für die Rasterelektronenmikroskopie aufbereitet.

2.7.3. Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie

Alle Netzproben wurden in einem critical point dryer (E 300, Polaron) getrocknet und flach auf eine Aluminiumplatte aufgebracht. Nach dem Besputtern der Netze mit Platin-Paladium (SCD 040, Blazes) wurden die Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (SEM 505, Phillips) bei 10-15 kV durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf APX 100 Filmen (Agfa) dokumentiert. Die rasterelektronischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Universität zu Lübeck unter der Anleitung und mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. med. Thilo Wedel.

2.8. Lyophilisation

2.8.1. Herstellung der Lyophilisate

Aus den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Fibroblasten nach Inkubation mit nicht resterilisierten und resterilisierten Polypropylen-Netzen ergaben sich neue Fragestellungen. Um herauszufinden, ob der Einfluss direkt von den Netzen auf die Zellen ausgeht oder ob möglicherweise aus den Netzen eine Substanz herausgelöst wird, die dann wiederum einen schädlichen Einfluss auf das Wachstum der Fibroblasten ausübt, wurde mit *Aqua dest.* ein Extrakt der löslichen Bestandteile der Netze hergestellt, wobei ausschließlich Glasgefäße benutzt wurden.

Die resterilisierten und nicht resterilisierten Polypropylen-Netze wurden wie unter 2.3.2. beschrieben aufbereitet, aufgerollt und für 48 Std zusammen mit 1 ml *Aqua dest.* in kleinen sterilen Glasgefäßen (Präparategläser 35 x 12 mm, Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) im Brutschrank bei 37 °C gelagert (siehe **Abb. 6**). Als Kontrolle diente ein Glasgefäß, das nur mit 1 ml *Aqua dest.* gefüllt war. Es wurden bewusst Glasgefäße gewählt, um eine Verunreinigung des *Aqua dest.* durch Kunststoffgefäße auszuschließen. Nach 48 Std wurden die Netze aus den Gefäßen entfernt und die Lösung durch Lyophilisation konzentriert (Christ L1/ Alpha 1, Fa. Christ, Osterode). Das Prinzip der lyophilen Trocknung beruht auf der schnellen Verdunstung des *Aqua dest.* unter Vakuum und sterilen Bedingungen. Anschließend wurden die Gefäße wieder mit ca. 50 µl *Aqua dest.* gefüllt.

2.8.2. Inkubation der Fibroblasten mit den Lyophilisaten

Die Fibroblasten wurden wie unter 2.4.1. beschrieben in 6-Loch-Platten eingesät. Anschließend wurde zu den Fibroblasten die 50 µl des konzentrierten Extraktes hinzugefügt und für 48 Std im Brutschrank inkubiert. Gruppe 1 waren Fibroblasten nur mit Aqua dest aus der Kontrollgruppe. Gruppe 2 bildeten Fibroblasten mit dem konzentrierten Extrakt der löslichen Bestandteile der nicht resterilisierten Polypropylen-Netze (NRS). Gruppe 3 bestand aus den Fibroblasten mit dem Extrakt der löslichen Bestandteile der resterilisierten Netze (RS). Nach 48 Std erfolgte die Aufbereitung der Netze und die Annexin V Färbung wie unter 2.5.1.1. beschrieben. Anschließend wurde die Apoptoserate der Fibroblasten mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen.



Abb. 6: Resterilisierte und nicht resterilisierte Polypropylen-Netze mit 1 ml *Aqua dest.* in Glasgefäßen

2.9. Massenspektrometrie

Die Lyophilisate (siehe 2.8.1.) der löslichen Bestandteile der nicht resterilisierten und resterilisierte Netze sowie die Negativkontrolle wurden mit Hilfe eines *Fourier-transform ion cyclotron resonance* Massenspektrometers (FT-ICR MS, Apex II, Bruker-Daltonic, Billerica, USA) analysiert. Das Instrument ist mit einer Elektrospray-Ionenquelle (ESI)

ausgerüstet. 10 µl der jeweiligen Proben wurden in 200 µl einer speziellen Elektrospray-Lösung aufgenommen und mit einer Rate von 2 µl/min in das Massenspektrometer gesprüht. Die Massenspektren positiver Ionen der verschiedenen Proben wurden unter gleichen experimentellen Bedingungen aufgenommen, nachdem das Gerät extern mit Peptiden bekannter Masse geeicht worden war. Die Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biophysik des Forschungszentrums Borstel unter der Anleitung von PD Dr. rer. nat. Buko Lindner.

2.10. Statistik

Zum Gruppenvergleich kam der zweiseitige U-Test nach Mann und Whitney für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Ein p-Wert $\leq 0,05$ galt als signifikant. Zur Erhebung der Statistik wurde das Programm SPSS Version 11.0 (Fa SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Vitalitätsprüfung und Endotoxintest

Um sicher zu gehen, dass die Versuche auch mit intakten Fibroblasten durchgeführt wurden, testeten wir mehrfach im Laufe der Untersuchungen die Vitalität der Zellen. Die mit Hilfe der Trypanblau-Färbung (siehe 2.1.3.3.) überprüfte Vitalität der Fibroblasten lag regelmäßig über 98%.

Der photometrische Test auf bakterielle Endotoxine wurde zum Ausschluss einer Kontamination der verwendeten Netzproben durchgeführt, da eine bakterielle Kontamination einen schädlichen Einfluss auf die Vitalität der Fibroblasten ausgeübt und somit die Messergebnisse verfälscht hätte. Bei den mit dem LAL-Test (siehe 2.2.) nach 24 bzw. 48 Std untersuchten Netzstichproben fanden sich Endotoxin-Werte deutlich unterhalb des vom Hersteller angegebenen Grenzwertes von 0,06 EU/ml (5 pg/ml) (siehe **Abb. 7**). Somit kann ein Einfluss auf die durchflusszytometrische Messung der Apoptoserate und Zellproliferation durch eine möglicherweise bakterielle Kontamination der Netzproben ausgeschlossen werden.

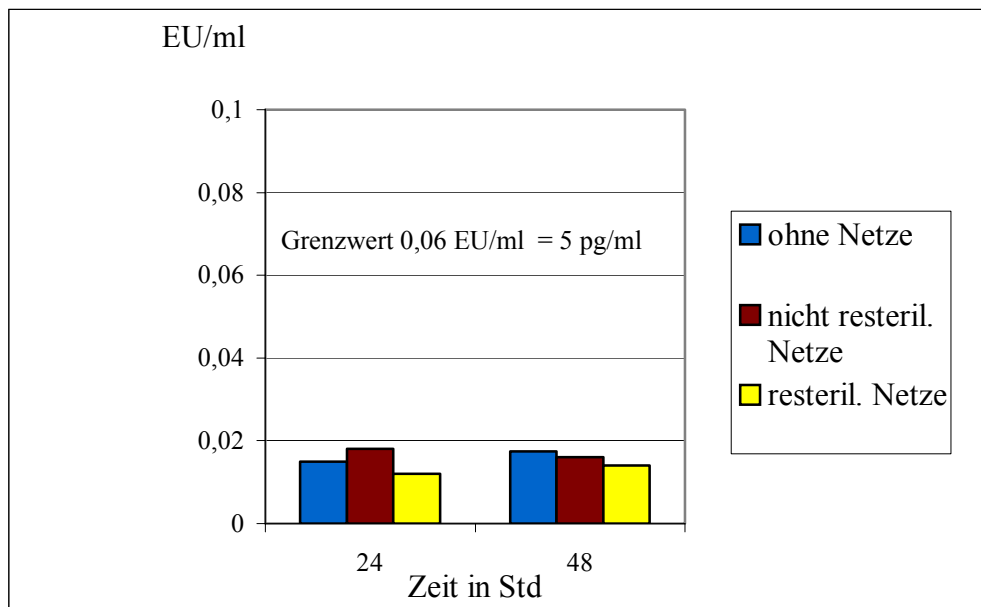


Abb. 7: Graphische Darstellung der Messergebnisse des bakt. Endotoxins im flüssigen Medium nach verschiedenen Zeitpunkten, Grenzwert 0,06 EU/ml

3.2. Durchflusszytometrische Apoptosebestimmung

Um einen möglichen Einfluss der nicht resterilisierten und resterilisierten Polypropylen-Netze auf die Fibroblastenkultur zu testen, wurde die Apoptoserate der Fibroblasten mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Nach den einzelnen Inkubationszeiten im Brutschrank (siehe 2.1.2. und 2.4.1.) folgte die Aufbereitung der Zellen mit Annexin V und anschließend die Messung und Auswertung der Fibroblasten im Durchflusszytometer (siehe 2.5.1.1.).

In der **Tab. 1** und **Abb. 8** werden im Überblick die Ergebnisse der Annexin V- Analysen im Durchflusszytometer dargestellt. Besonders deutlich wird hier der massive Anstieg der Apoptoserate über den gesamten Zeitraum von 48 Std in der Gruppe der resterilisierten Netze im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne Zugabe eines Netzes. Bei dieser Gruppe steigt die Apoptoserate signifikant ($p = 0,02$) um das über 20fache von initial 2,16% zum Zeitpunkt 0 auf 47,95 % nach 48 Std an (**Tab 1**). Zusätzlich sieht man auch einen signifikanten Anstieg ($p = 0,02$) der Annexin V positiven Fibroblasten in der Gruppe der nicht resterilisierten Netze gegenüber dem Kontrollwert zum Zeitpunkt 0. Hier steigt die Apoptoserate von initial 2,16 % etwa um das 10fache auf 19,25 % an (**Tab 1**). Allerdings zeigt sich auch in den Ansätzen ohne Zugabe eines Netzes ein Anstieg der Apoptoserate von initial 2,16% auf 10,26% (**Tab 1**). Dieser leichte Anstieg der Apoptoserate ist wahrscheinlich eine Folge der speziellen Zellkulturbedingungen (siehe 2.1.3.1.). Ein weiterer signifikanter Unterschied ($p=0,04$) besteht zwischen den Fibroblasten nach 48 Std Inkubation mit nicht resterilisierten Netzen und den Fibroblasten nach 48 Std Inkubation mit den resterilisierten Netzen. Die Apoptoserate liegt nach 48 Std bei den nicht resterilisierten Netzen bei 19,75% im Vergleich zu den resterilisierten Netzen, deren Wert mit 48 % deutlich höher ausfällt.

Somit zeigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Annexin V-Bestimmung eine erhöhte Apoptoserate der Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen und eine kontinuierlich steigende und nach 48 Std deutlich erhöhte Apoptoserate bei den resterilisierten Netzen gegenüber der Kontrollgruppe (siehe **Abb. 8**).

Zeit (Std)	ohne Netze	SD	NRS Netze	SD	RS Netze	SD
0	2,16	0,71	-	-	-	-
6	3,52	0,70	6,14	3,58	6,10	2,24
12	3,38	1,33	5,49	1,70	6,60	2,30
18	5,30	2,38	7,10	2,28	18,38	5,23
24	6,18	1,32	7,58	2,75	18,32	6,46
30	4,86	2,02	6,45	3,59	25,71	8,00
36	3,68	1,60	8,29	6,32	40,04	3,34
42	6,83	1,28	10,75	3,50	42,50	24,82
48	10,26	7,28	19,25	12,33	47,95	19,55

Tab. 1: Apoptoserate der Fibroblasten (%).

Mittelwerte (n = 4) mit Standardabweichung (SD) der drei Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten (RS= resterilisiert; NRS = nicht resterilisiert)

signifikante Unterschiede:

ohne Netze(0 Std) / ohne Netze (48 Std) p = 0,02
 ohne Netze (0 Std) / NRS Netze (48 Std) p = 0,02
 ohne Netze (0 Std) /RS. Netze (48 Std) p = 0,02
 ohne Netze (48 Std) / RS Netze (48 Std) p = 0,02
 NRS Netze (48 Std) / RS. Netze (48 Std) p = 0,04

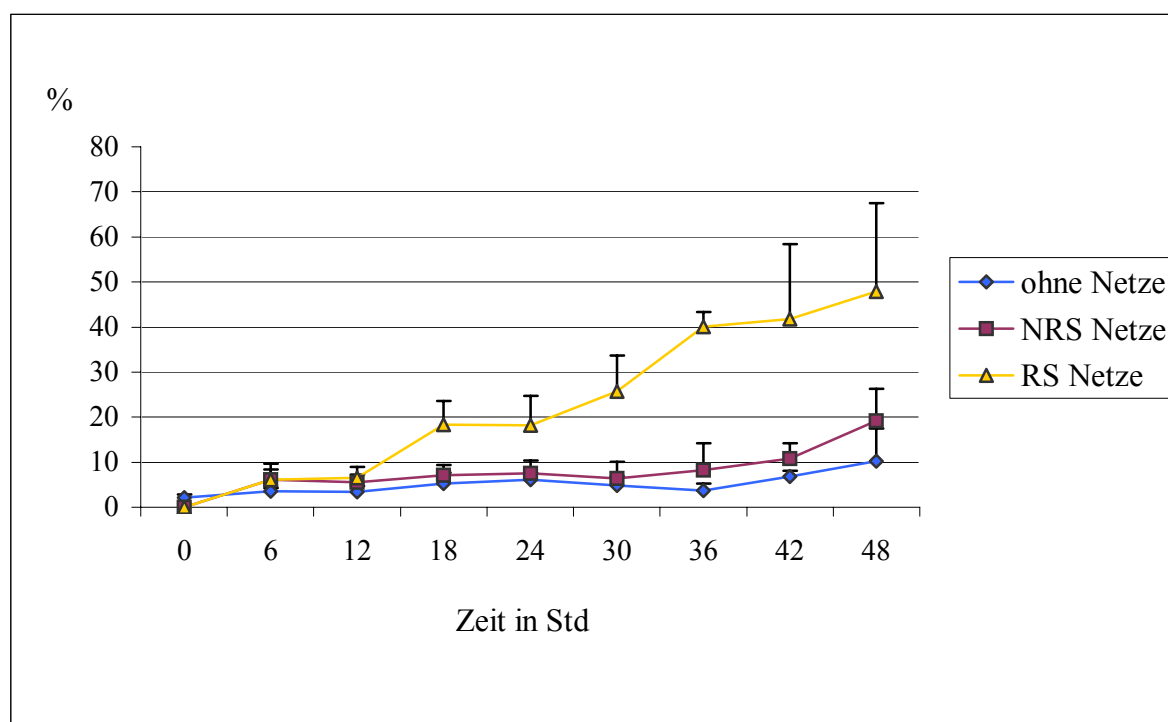


Abb. 8: Graphische Darstellung der in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse

Zeitlicher Verlauf der Apoptoserate (%) der drei Ansätze (n = 4 pro Zeitpunkt und Gruppe)

3.2.1. Histogrammbeispiele zur Annexin V-Messung

Abb. 9 zeigt beispielhaft einige Histogramme der durchflusszytometrischen Apoptoseratebestimmungen der Fibroblasten nach 24 Std Inkubation der Zellen sowohl mit nicht resterilisierten als auch mit resterilisierten Polypropylen-Netzen. Der Vergleich der Histogramme mit der Kontrollgruppe zeigt, dass schon nach 24 Std einen deutlichen Anstieg der Annexin V-positiven Fibroblasten bei Zugabe der resterilisierten Polypropylen-Netze zu verzeichnen ist. Zusätzlich wird anhand dieser Histogramme deutlich, dass auch nach Inkubation mit einem nicht resterilisierten Netz die Apoptoserate der Fibroblasten im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht ist.

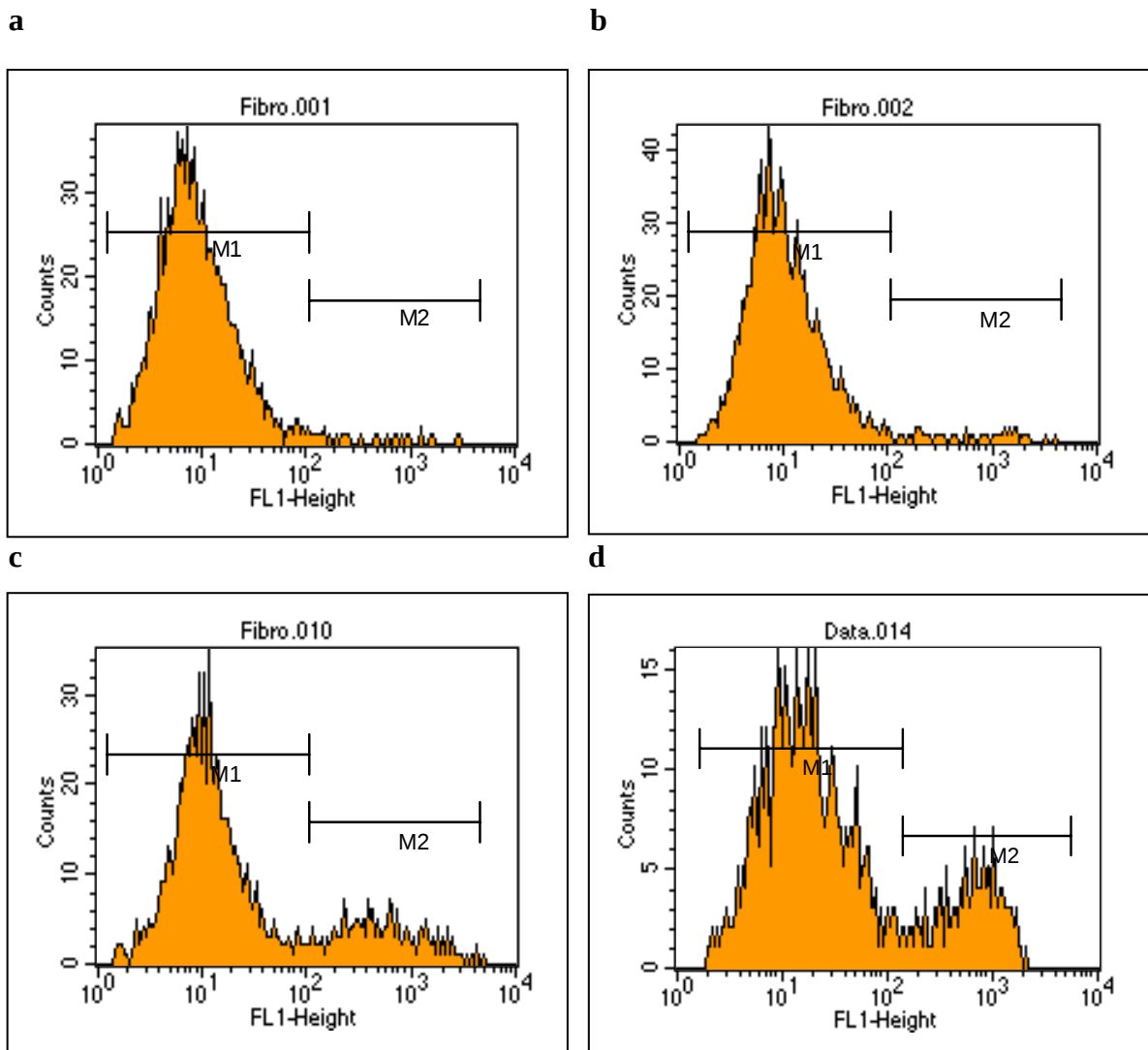


Abb. 9: Histogrammbeispiele der durchflusszytometrischen Annexin V Messung nach 24 Std

(M1 = Anteile der Annexin V negativen Fibroblasten; M2 = Anteile der Annexin V positiven Fibroblasten a: Negativkontrolle; b: Fibroblasten ohne Zugabe eines Polypropylen-Netzes; c: Fibroblasten inkubiert mit einem nicht resterilisierten Polypropylen-Netz; d: Fibroblasten inkubiert mit einem resterilisierten Polypropylen-Netz)

3.3. Durchflusszytometrische Ki-67 Bestimmung

Die Ki-67 Messung im Durchflusszytometer zur Bestimmung des Proliferationsindex der Fibroblasten ist ein weiterer Parameter, um einen möglichen Einfluss der nicht resterilisierten und resterilisierten Polypropylen-Netze auf die Zellen in dem *in-vitro* Modell zu untersuchen. Die Fibroblasten wurden in verschiedenen Inkubationsschritten mit den Netzen inkubiert (siehe 2.1.2. und 2.4.1.), mit einem Antikörper gegen das Ki-67 Antigen gefärbt (siehe 2.5.1.2.) und anschließend im Durchflusszytometer ausgewertet.

In der **Tab. 2** und **Abb. 10** werden im Überblick die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Proliferationsbestimmungen dargestellt. Die Proliferationsindizes der Ansätze nach 48 Std Inkubation der Fibroblasten ohne Netze und mit nicht resterilisierten Netzen zeigen im Verlauf der Messungen nur geringe Unterschiede. Der leichte Abfall der Proliferationsindizes am Ende des Versuchszeitraumes ist vermutlich eine Folge der speziellen Zellkulturbedingungen (siehe 2.1.3.1.). Anders verhält sich der Proliferationsindex bei den Fibroblasten nach 48 Std Inkubation mit resterilisierten Netzen. Hier zeigt sich über den gesamten Versuchszeitraum ein kontinuierlicher und nach 48 Std signifikanter Rückgang der proliferativen Aktivität der Fibroblasten. Der Proliferationsindex der Zellen liegt zum Zeitpunkt 0 bei 85,71 % und fällt nach 48stündiger Inkubation mit den resterilisierten Polypropylen-Netzen auf 41,77 % ($p=0,02$).

Des Weiteren besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit resterilisierten Netzen im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Zugabe eines Netzes und mit der Gruppe der nicht resterilisierten Netze ($p=0,02$). Während die Kontrollgruppe nach 48 Std einen Proliferationsindex von 80,13% aufweist, nimmt dieser in der Gruppe mit den nicht resterilisierten Netzen auf 74,71% ab und fällt in der Gruppe mit den resterilisierten Netzen sogar auf 41,77%.

Zeit (Std)	ohne Netze	SD	NRS Netze	SD	RS Netze	SD
0	85,71	1,69	-	-	-	-
6	92,02	5,10	91,6	5,39	92,36	4,07
12	85,61	4,19	84,26	8,51	73,72	17,95
18	88,59	5,01	86,78	5,34	71,60	10,10
24	82,27	6,62	81,76	3,24	69,38	16,30
30	89,50	2,34	79,09	6,95	66,09	9,92
36	80,69	11,03	79,67	9,57	59,12	13,65
42	89,97	2,67	87,32	3,19	51,81	5,06
48	80,13	8,82	74,71	11,15	41,77	8,95

Tab 2: Proliferationsindizes der Fibroblasten (%)

Mittelwert (n = 4) mit Standardabweichung (SD) der drei Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten (RS= resterilisiert; NRS = nicht resterilisiert)

Signifikante Unterschiede:

Ohne Netze (0 Std) / RS Netze (48 Std) $p = 0,02$

Ohne Netze (48 Std) / RS Netze (48 Std) $p = 0,02$

NRS Netze (48 Std) / RS Netze (48 Std) $p = 0,02$

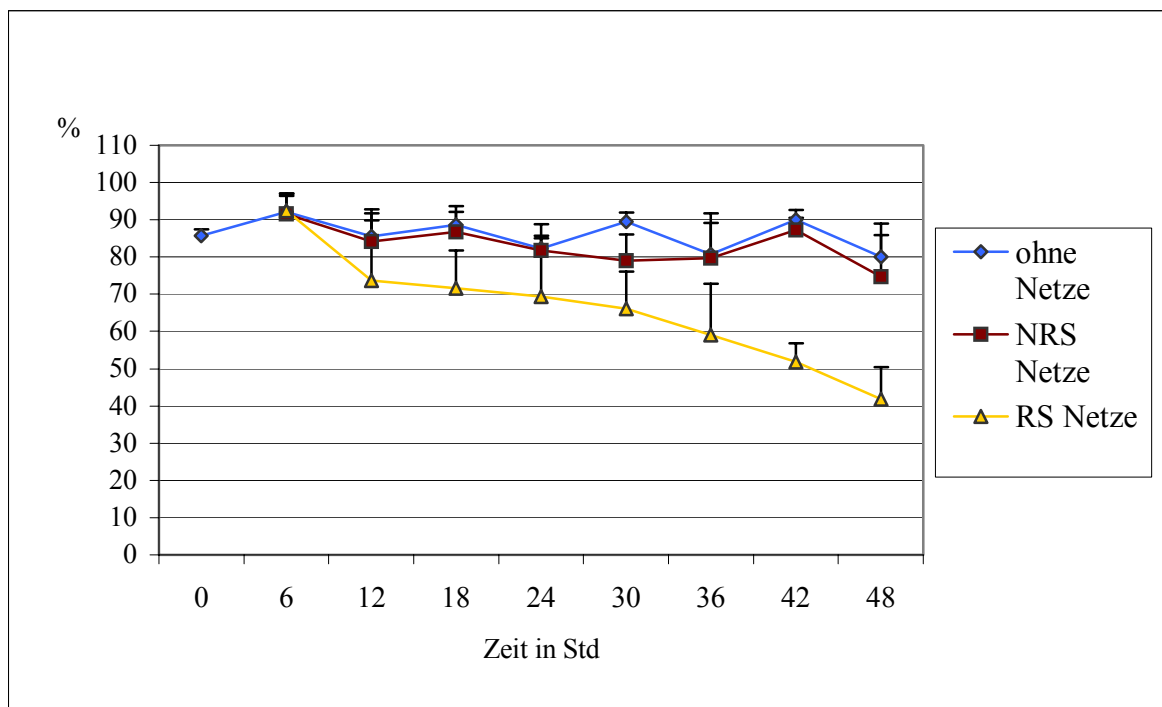


Abb. 10: Graphische Darstellung der in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse

Zeitlicher Verlauf der Proliferationsindizes (%) der drei Gruppen (n = 4 pro Zeitpunkt und Gruppe)

3.3.1. Histogrammbeispiele zur durchflusszytometrischen Ki-67 Bestimmung

Abb. 11 zeigt beispielhaft einige Histogramme zur durchflusszytometrischen Proliferationsbestimmung der Fibroblasten in drei verschiedenen Ansätzen nach 48ständiger Inkubation (siehe 2.4.1.). Zum Vergleich dient die Negativkontrolle (Fibroblasten ohne Inkubation mit dem Ki-67-Antikörper), die den Hauptpeak im Ki-67 negativen Bereich hat (**Abb. 11a**). Ein anderes Bild zeigt sich bei dem Kontrollansatz nach 48ständiger Inkubation einer Fibroblastenkultur ohne Zugabe eines Polypropylen-Netzes. Hier sieht man deutlich den Hauptpeak im Ki-67 positivem Bereich. Der hohe Peak steht hier für einen hohen Proliferationsindex (**Abb. 11b**). Ähnlich das Bild bei dem Ansatz mit dem nicht resterilisierten Polypropylen-Netz. Auch hier zeigt sich der Hauptpeak im Ki-67 positiven Bereich bei leicht einem erhöhten Ki-67 negativen Bereich (**Abb. 11c**). Anders das Histogramm nach 48 Std Inkubation der Fibroblasten mit dem resterilisierten Netz. Im Vergleich zu den anderen Ansätzen sieht man einen höheren Peak im Ki-67 negativen Bereich (**Abb. 11d**). Es wird anhand dieser Histogramme ersichtlich, dass die Fibroblasten nach 48ständiger Inkubation mit einem resterilisierten Polypropylen-Netz einen deutlich geringeren Proliferationsindex aufweisen als die Kontrollgruppe und die Fibroblasten mit einem nicht resterilisierten Netz.

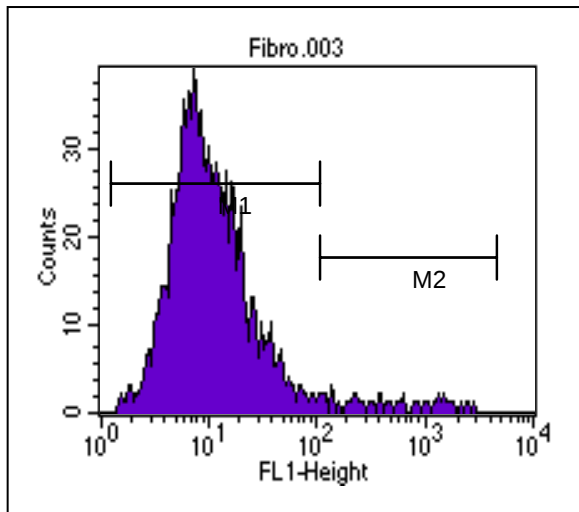
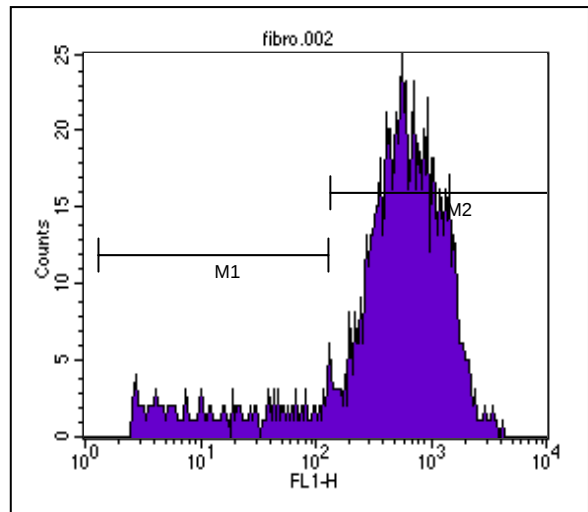
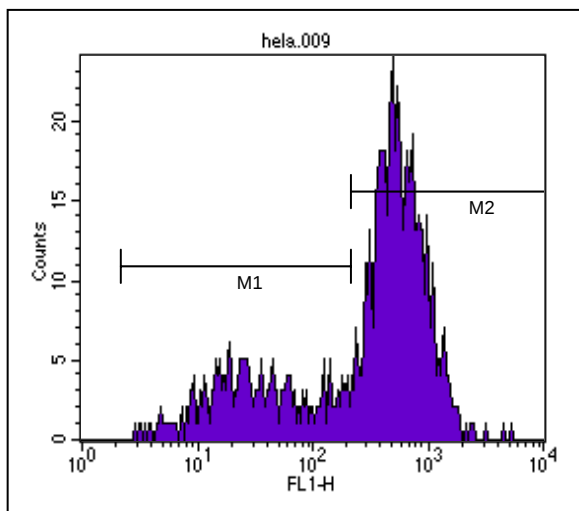
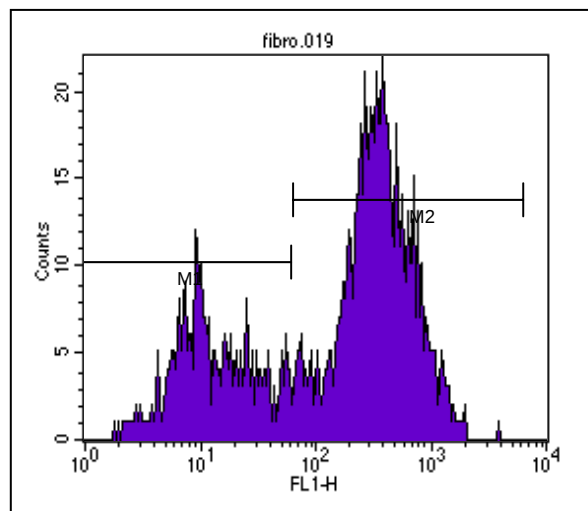
a**b****c****d**

Abb. 11: Histogrammbeispiele zur durchflusszytometrischen Ki-67 Bestimmung nach 48 Std

(M1: Anteile der Ki-67 negativen Fibroblasten; M2: Anteile der Ki-67 positiven Fibroblasten)

a: Negativkontrolle, Fibroblasten nur mit dem sek. Antikörper inkubiert; b: Fibroblasten ohne Zugabe eines Polypropylen-Netzes; c: Fibroblasten mit einem nicht resterilisierten Netz; d: Fibroblasten mit einem resterilisierten Netz

3.4. Morphologie der Fibroblastenkulturen

Um einen möglichen Einfluss der nicht resterilisierten und resterilisierten Polypropylen-Netze auf die Morphologie der Zellen zu ermitteln, wurden diese lichtmikroskopisch (ZEISS Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen) untersucht und fotodokumentiert (siehe **Abb. 12**).

Die in **Abb. 12a** dargestellten Fibroblasten entsprechen der Kontrollgruppe. Die Zellen zeigen die typische spindelförmige, mit Ausläufern versehene Morphologie von Fibroblasten in einer normalen Zellkulturflasche nach 48stündiger Inkubation im Brutschrank. Im Vergleich dazu in **Abb. 12b, c und d** die Fibroblastenkulturen der verschiedenen Ansätze in einer Sechs-Loch-Platte. Bei der Fibroblastenkultur ohne Zugabe eines Polypropylen-Netzes sieht man nach 48 Std eine normale Fibroblastenkultur wie bei der Kontrollgruppe (**Abb. 12b**). Das gleiche Bild zeigt sich auch bei der Kultur nach 48 Std Inkubation mit einem nicht resterilisierten Polypropylen-Netz. Die Zugabe eines solchen Netzes änderte nichts an der Morphologie der Zellen. Man sieht auch in dieser Aufnahme eine Zellkultur mit den für Fibroblasten typischen Ausläufern (**Abb. 12c**). Ganz anders das Bild bei den Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit den resterilisierten Netzen. Hier sieht man, dass die Zellen ihre normale spindelförmige Struktur verloren und sich die zahlreichen Ausläufer der Fibroblasten zurückgebildet haben, so dass die Zellen keinen Kontakt untereinander haben und keinen Monolayer bilden. Zusätzlich wird deutlich, dass die Fibroblasten nach 48 Std Kontakt mit einem resterilisierten Netz nicht mehr in der Anzahl vorhanden sind wie bei den Ansätzen der Kontrollgruppe oder den Fibroblasten mit einem nicht resterilisierten Netz (**Abb. 12d**).

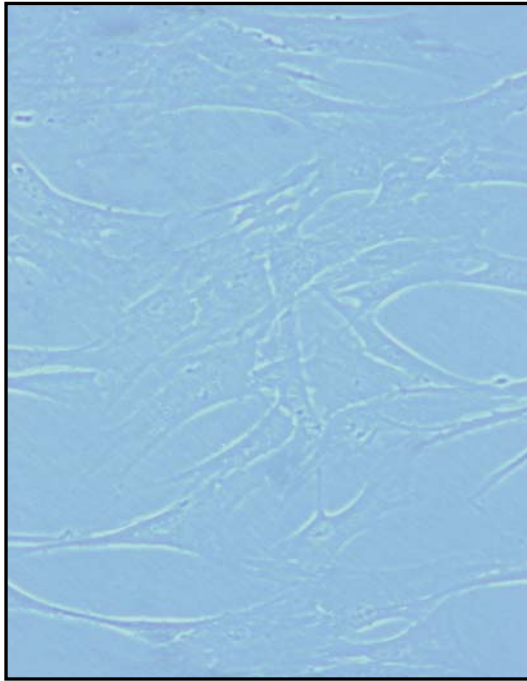
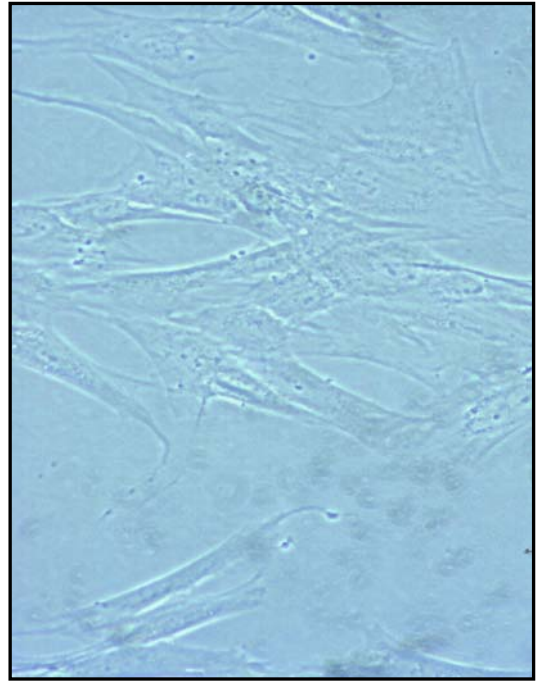
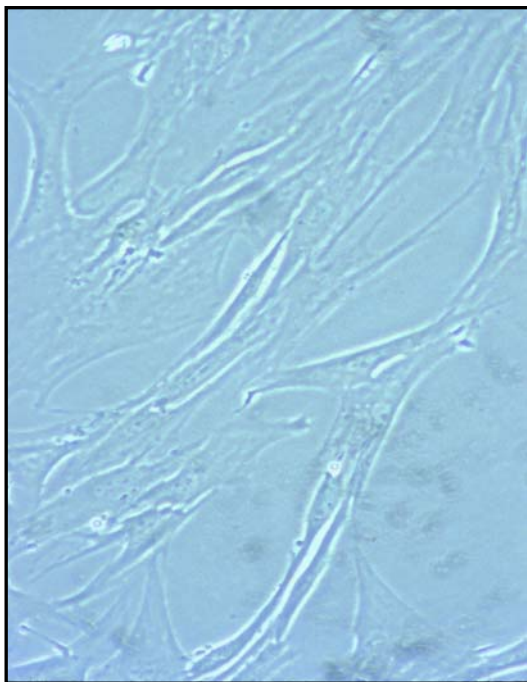
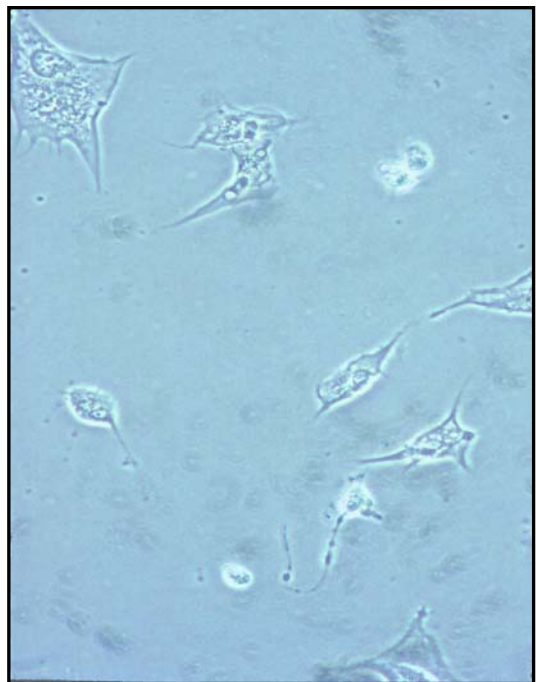
a**b****c****d**

Abb. 12: Morphologie der Fibroblastenkulturen nach 48 Std Inkubation im Brutschrank in vier verschiedenen Ansätzen

a: Fibroblasten in Zellkulturflasche; b: Kontrollgruppe, Fibroblastenkultur ohne Zugabe eines Netzes; c: Fibroblastenkultur nach 48 Std. Inkubation mit nicht resterilisierten Netzen; d: Fibroblastenkultur nach 48 Std Inkubation mit resterilisierten Netzen; alle Fotos im Original 320fache Vergrößerung

3.5. Ergebnisse der HSP 70 Bestimmung

3.5.1. Durchflusszytometrische HSP 70 Messung

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Hitzeschockprotein 70 in den Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen (siehe 2.5.1.3.) erfolgte, um eine mögliche Stressinduktion der Zellen durch die Netze zu ermitteln.

Die Ergebnisse der HSP 70 Bestimmungen im Verlauf einer 48stündigen Inkubation der Fibroblasten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ansätzen (**Abb. 13**). Die Zahl der HSP 70 negativen Fibroblasten liegen sowohl in der Gruppe ohne Zugabe eines Polypropylen-Netzes als auch bei den nicht resterilisierten Netzen bei ca. 98% (**Tab. 3**) über den gesamten Messzeitraum. Somit hat die Inkubation der Fibroblasten mit einem Kunststoffnetz keinen Einfluss auf die Expression des HSP 70 in den Zellen.

Zeit (Std)	ohne Netze	SD	NRS Netze	SD
0	98,89	0,88	-	-
6	97,81	0,66	97,88	0,91
12	97,77	1,3	98,43	1,42
18	98,14	0,87	97,83	0,8
24	99,82	0,1	99,76	0,2
30	97,25	0,51	96,75	0,72
36	90,76	0,98	90,17	1,8
42	98,38	0,34	97,66	0,32
48	99,06	0,61	99,17	0,53

Tab. 3 : Anzahl der HSP 70 negativen Fibroblasten (%)

Mittelwert (n=4) mit Standardabweichung (SD) der zwei Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten

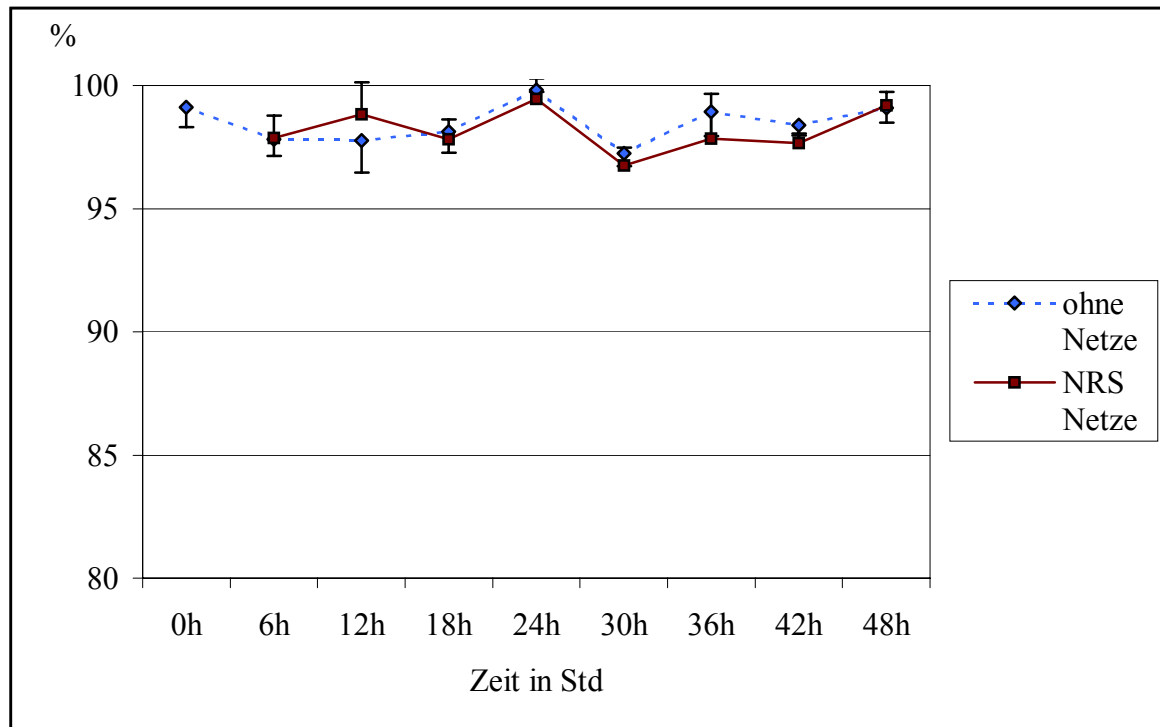


Abb. 13: Graphische Darstellung der in Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse
 Zeitlicher Verlauf der HSP 70 negativen Fibroblasten in zwei Ansätzen (n = 4 pro Zeitpunkt und Gruppe)

3.5.2. Histogramme zur HSP 70 Messung

Abb. 14 zeigt beispielhaft einige Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen der HSP 70 Expression in den Fibroblasten nach 48 Std Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Die Fibroblasten, die als Positivkontrolle in einem Wasserbad auf 42°C erhitzt wurden, zeigen im Vergleich zu der Negativkontrolle (**Abb. 14a**) einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz und somit einen deutlichen Anstieg der HSP 70 Expression (**Abb. 14b**). Die Histogramme der durchflusszytometrischen HSP 70 Bestimmung der Fibroblasten nach 48 Std ohne und mit Zugabe eines Polypropylen-Netzes liegen im selben Bereich der Fluoreszenzintensität und weisen somit keinen Unterschied in der HSP 70 Expression auf (**Abb. 14c, d**).

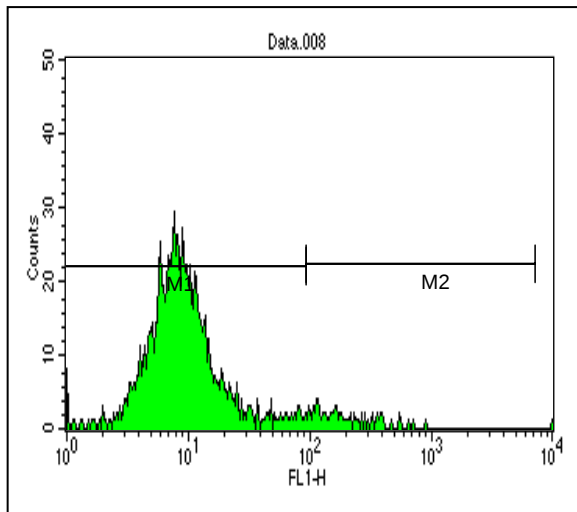
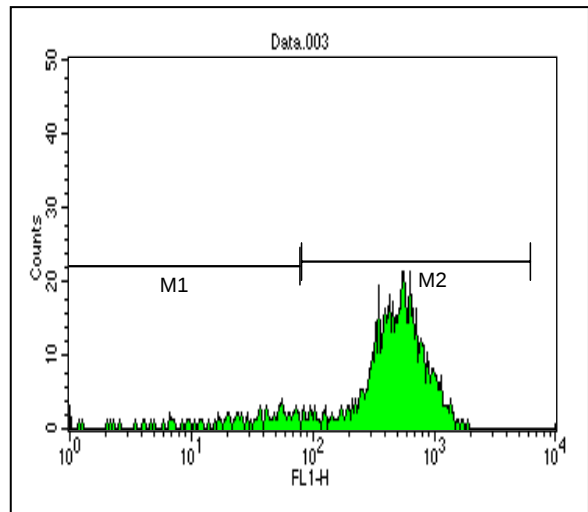
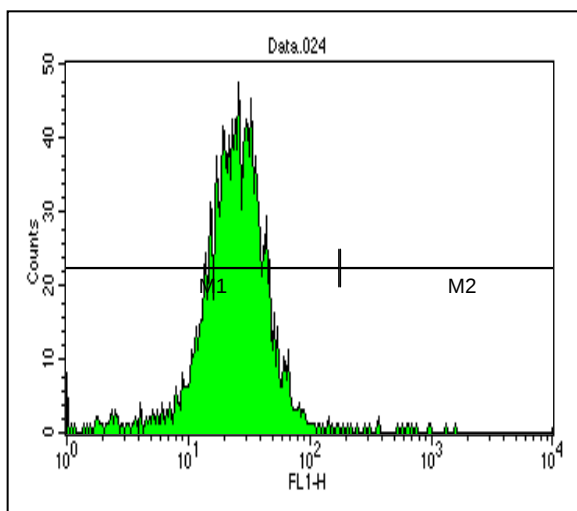
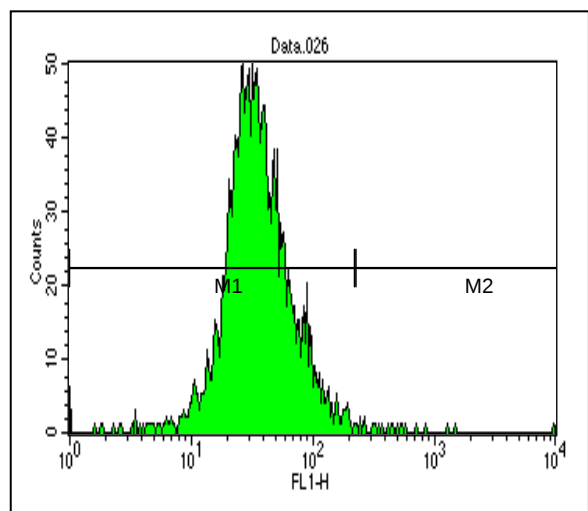
a**b****c****d**

Abb. 14: Histogrammbeispiele der durchflusszytometrischen HSP 70-Messung

(M1 = Anteil der HSP 70 negativen Fibroblasten, M2 = Anteil der HSP 70 positiven Fibroblasten)

a: Negativkontrolle, Fibroblasten inkubiert mit sek. Antikörper; b: Positivkontrolle, Fibroblasten erhitzt im Wasserbad bei 42 °C; c: Fibroblasten nach 48h ohne Inkubation mit einem Netz; d: Fibroblasten nach 48h Inkubation mit einem nicht resterilisierten Netz

3.5.3. Immunhistochemischer Nachweis der HSP 70 Expression

Der zusätzliche immunhistochemische Nachweis (siehe 2.6.) der Expression des HSP 70 Proteins in den Fibroblasten (siehe **Abb. 15**) sollte beweisen, dass die Inkubation der Zellen mit einem nicht resterilisierten Polypropylen-Netz in dem *in-vitro* Modell keinen Einfluss auf die HSP 70 Expression in den Zellen hat, so wie es die durchflusszytometrischen Messungen bereits ergaben.

Bei der Positivkontrolle der immunhistochemischen Präparate erkennt man eine deutliche rote Anfärbung des Zytoplasmas bei allen Fibroblasten im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe **Abb. 15a und b**).

Vergleicht man nun die HSP 70 Expression der Fibroblasten nach 48 Std ohne Zugabe eines Polypropylen-Netzes mit der nach Zugabe eines Polypropylen-Netzes (siehe **Abb. 15c, d**), so erkennt man in beiden Ansätzen eine schwache, gleichmäßige vorkommende rötliche Anfärbung des Zytoplasmas bei fast allen Fibroblasten. Vereinzelt sieht man eine stärkere Anfärbung des Zytoplasmas (Pfeil). Die Fibroblasten sind zwar durchgehend leicht rötlich gefärbt, aber bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei der Positivkontrolle.

Somit wird auch bei der Immunhistochemischen Färbung deutlich, dass zwischen beiden Ansätzen kein Unterschied bei der HSP 70 Expression in den Zellen durch die 48stündige Inkubation mit Polypropylen-Netzen existiert.

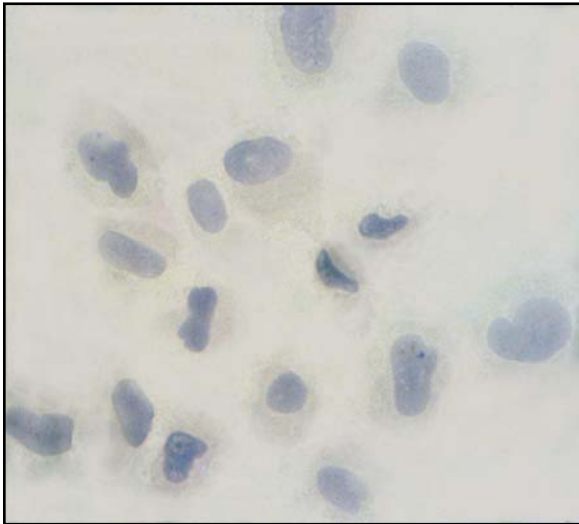
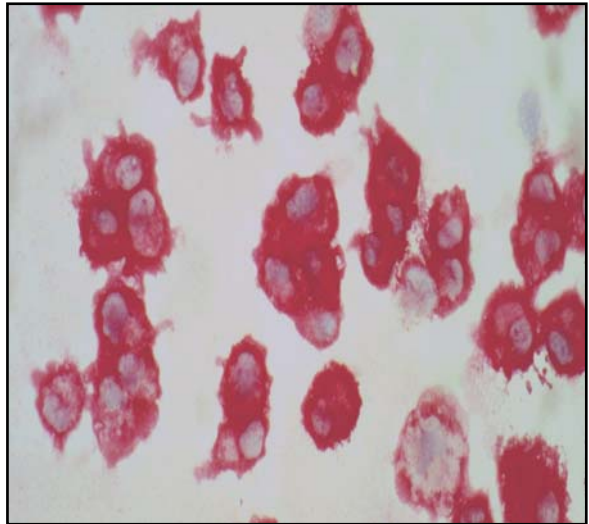
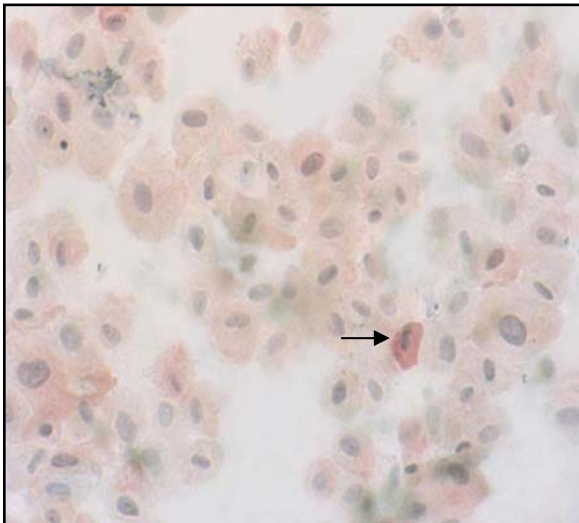
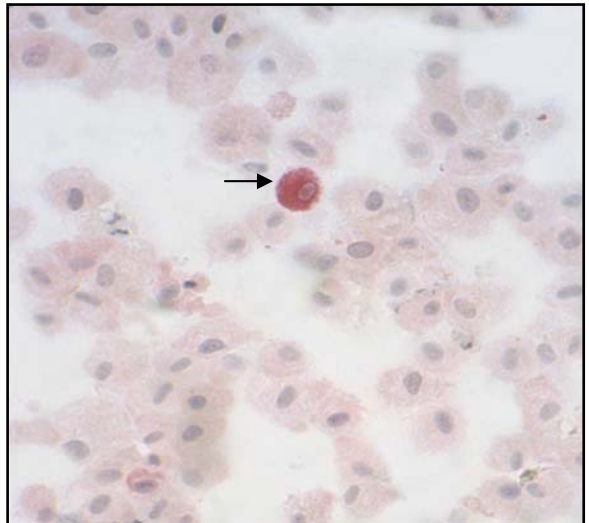
a**b****c****d**

Abb. 15: Immunhistochemische HSP 70 Färbung der Fibroblasten

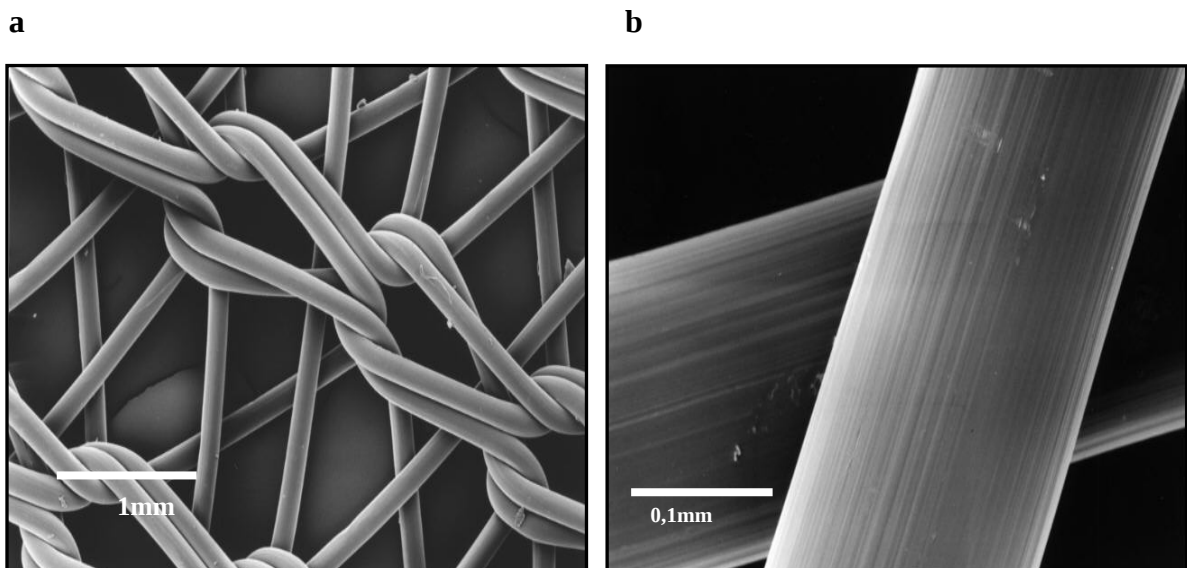
A: Negativkontrolle, Fibroblasten nach Inkubation nur mit dem sek. Antikörper; b: Positivkontrolle, Fibroblasten 10 min im Wasserbad erhitzt; im Original 630fache Vergrößerung; c: Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation ohne Zugabe eines Polypropylen-Netzes; d: Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit einem Polypropylen-Netz; im Original 400fache Vergrößerung

3.6. Polypropylen-Netze unter dem Rasterelektronenmikroskop

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie sollte die genaue Struktur der Polypropylen-Netze unter den verschiedenen Versuchsbedingungen erfasst werden. Geprüft werden sollte, ob der Vorgang des Resterilisierens der Netze oder aber auch nur die Inkubation der nicht resterilisierten Netze mit den Fibroblasten die Oberflächenstruktur der Netzfilamente auf irgendeine Art und Weise verändert. Für diese Untersuchungen wurden Proben der Netze wie unter 2.7.1. beschrieben angefertigt und in verschiedenen Ansätzen für die rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen aufbereitet (siehe 2.7.2.).

3.6.1. Nicht resterilisierte Polypropylen-Netze

Abb. 16 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von einem nicht resterilisierten Polypropylen-Netz, nativ aus der Verpackung entnommen. In der Übersichtsaufnahme (**Abb. 16a**) zeigen die Monofilamente des Netzes eine glatte Oberfläche. Bei höheren Vergrößerungen (**Abb. 16b** und **c**) sieht man schmale, flache und parallel angeordnete Rillen, die entlang der Längsachse der Filamente verlaufen. Risse oder Spalten können nicht beobachtet werden. Es zeigen sich intakte und glatte Filamente ohne Veränderung oder Schädigung der oberflächlichen Struktur.



c

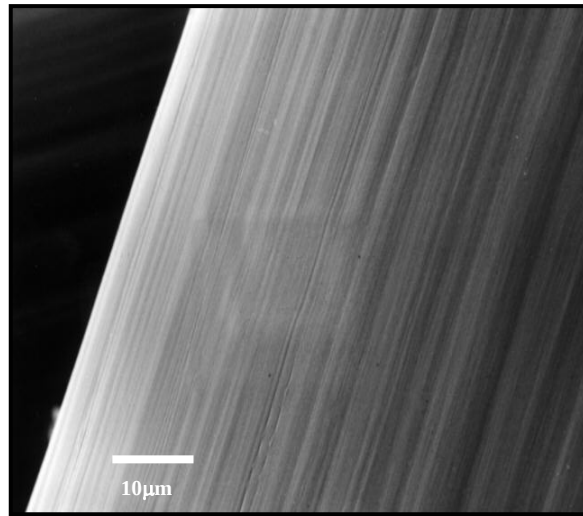


Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nicht resterilisierten Polypropylen-Netze, nativ aus der Verpackung entnommen

a: im Original 30fache Vergrößerung; b: im Original 300fache Vergrößerung; c: im Original 1200fache Vergrößerung

3.6.2. Resterilisierte Polypropylen-Netze

Die rasterelektronischen Aufnahmen in **Abb. 17** zeigen Polypropylen-Netze nach dem Resterilisieren in einem gewöhnlichen Dampfautoklaven. Hier wird deutlich, dass der Vorgang des Autoklavierens eine Veränderung der Oberflächenstruktur der Netzfilamente verursacht hat. Es fallen deutliche Risse und Spalten von unterschiedlicher Tiefe und Länge auf, so dass man den Eindruck erhält, Teile des Materials wären herausgebrochen oder zerrissen. Im Vergleich mit den nicht resterilisierten Netzen fehlt auf diesen Bildern die homogene glatte Struktur der Netzfilamente.

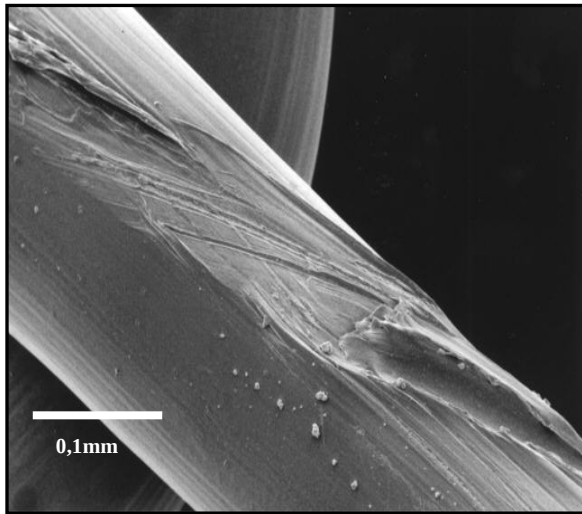
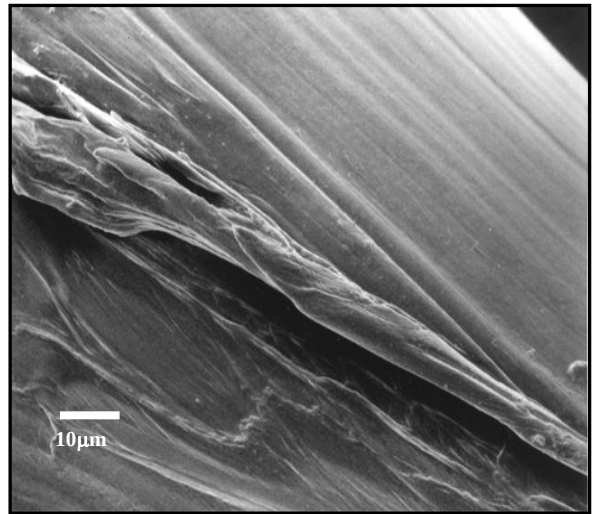
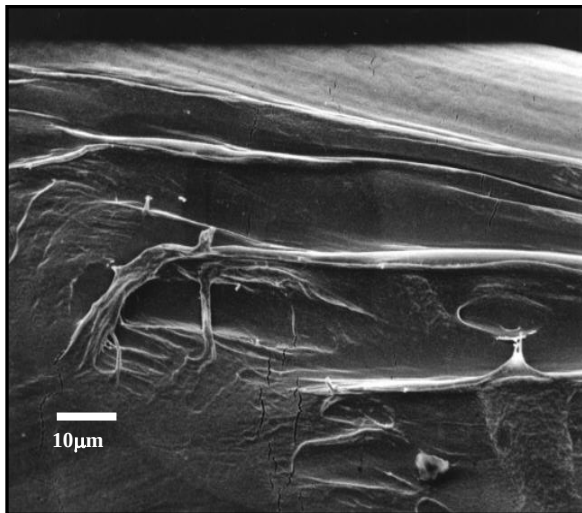
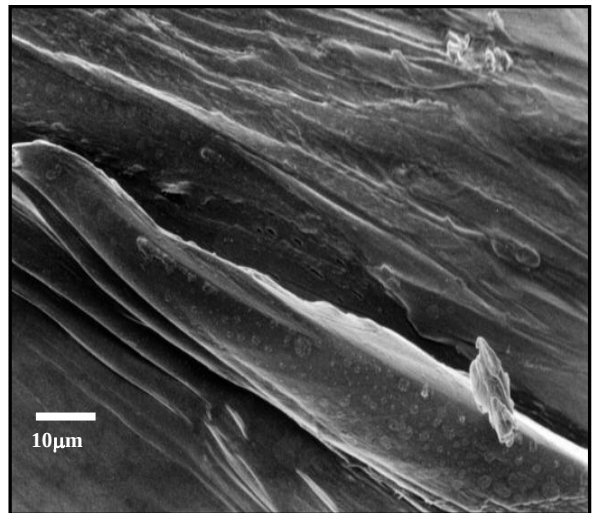
a**b****c****d**

Abb. 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der resterilisierten Polypropylen-Netze
a: im Original 300fache Vergrößerung ; b, c und d: im Original 1200fache Vergrößerung

3.6.3. Polypropylen-Netze nach Inkubation im Kulturmedium

Nach 48stündiger Inkubation der Netze in dem Zellkulturmedium beobachtet man in beiden Ansätzen sowohl bei den resterilisierten Netzen (siehe **Abb. 19**) als auch bei den nicht resterilisierten Netzen (siehe **Abb. 18**) Spalten und Risse auf der Oberfläche der Filamente. Zusätzlich zeigen sich in diesem Versuchsansatz in beiden Gruppen schwarze Punkte von variabler Größe gleichmäßig über die Netzfilamente verteilt, die am ehesten als beginnendes Zeichen einer Oberflächenveränderung der Netzfilamente zu deuten sind. Obwohl man bei den resterilisierten und den nicht resterilisierten Netzen Strukturveränderungen sehen kann, wird im Vergleich deutlich, dass in der Gruppe mit den resterilisierten Netzen die Veränderungen der Oberflächenstruktur der Netzfilamente zahlreicher und deutlicher auftreten als in der Gruppe mit den nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen.

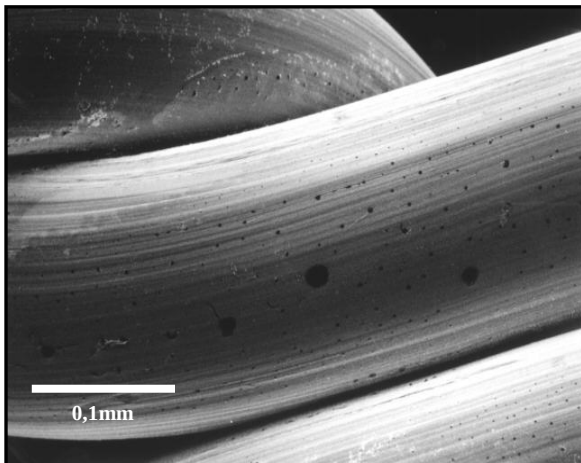
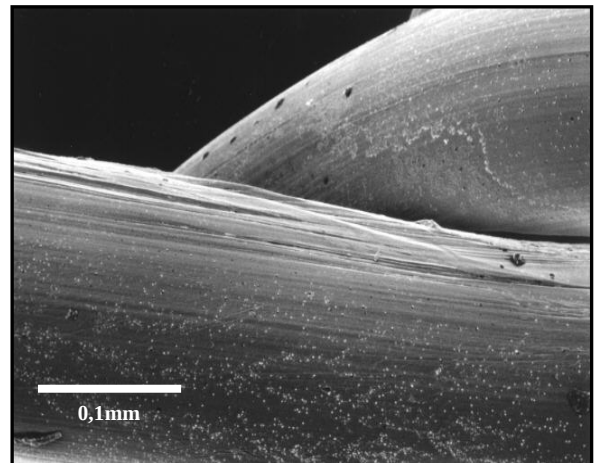
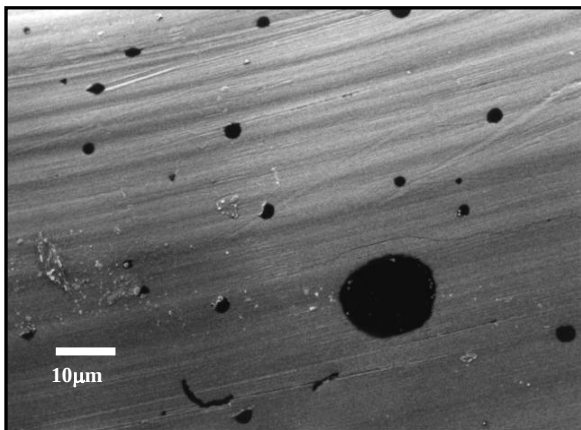
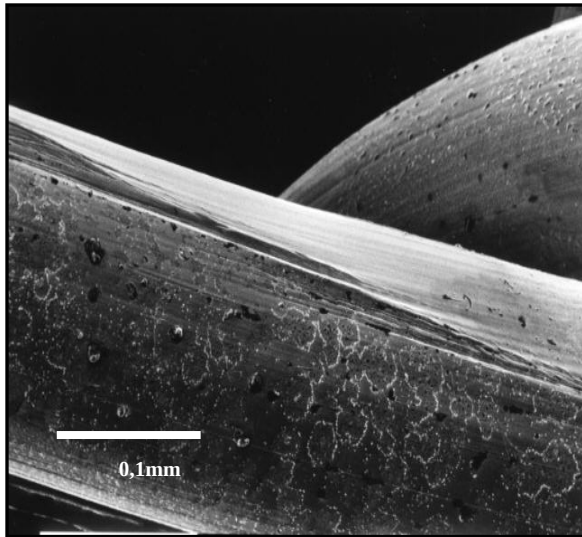
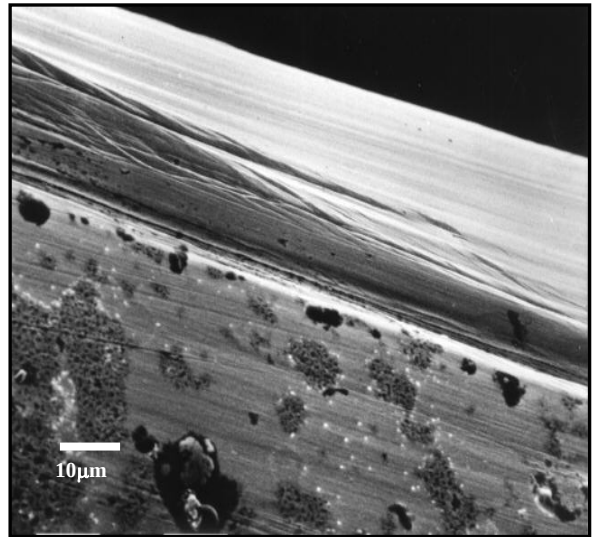
a**b****c**

Abb. 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nicht resterilisierten Polypropylen-Netze nach 48stündiger Inkubation im Kulturmedium; a und b: im Original 300fache Vergrößerung; c: im Original 1200fache Vergrößerung

a



b



c

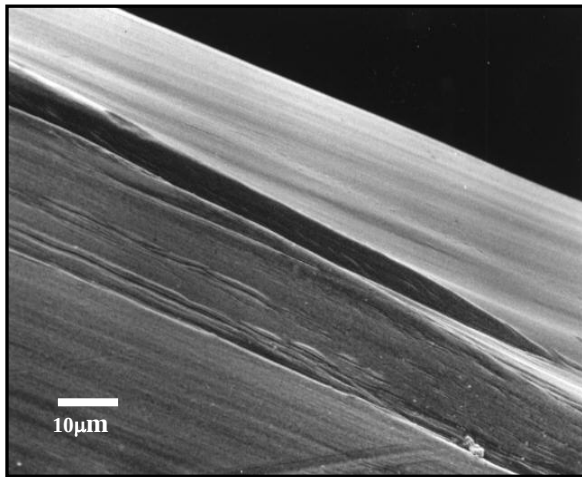


Abb. 19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der resterilisierten Polypropylen-Netze nach 48stündiger Inkubation im Kulturmedium; a: im Original 300fache Vergrößerung; b und c: im Original 1200fache Vergrößerung

3.6.4. Polypropylen-Netze nach Inkubation mit Fibroblasten

In den **Abb. 20 und 21** sieht man – ähnlich wie bei den Netzen nach 48 Std Inkubation im Kulturmedium –, dass die Netze nach dem Kontakt mit einer Fibroblastenkultur in beiden Ansätzen ebenfalls kleine Risse und Spalten auf der Oberfläche aufweisen. Zusätzlich zeigen sich auch hier in beiden Gruppen schwarze Punkte unterschiedlicher Größe, die sich gleichmäßig auf den Filamente verteilen. Diese Punkte erscheinen in der kleineren Vergrößerung wie Löcher in den Filamenten, bei stärkerer Vergrößerung entsprechen sie eher oberflächlichen Strukturveränderungen der Filamente, die sich allerdings nicht weiter in die Tiefe erstrecken (siehe **Abb. 20b, 21b**). Die kleinen Auflagerungen auf den Filamenten in beiden Ansätzen sind am ehesten Überresten der Fibroblastenkultur zuzuordnen (siehe **Abb. 20a**).

Der Kontakt mit der Zellkultur bewirkt in beiden Ansätzen eine Veränderung der Oberflächenstruktur der Polypropylen-Netze. Es wird aber in den Befunden deutlich, dass die stärkeren Veränderungen der Filamentoberfläche in der Gruppe der resterilisierten Polypropylen-Netze vorliegen. Die Oberfläche der nicht resterilisierten Netze zeigt eine homogenere Struktur im Vergleich zu den resterilisierten Netzen (siehe **Abb. 20 und 21**).

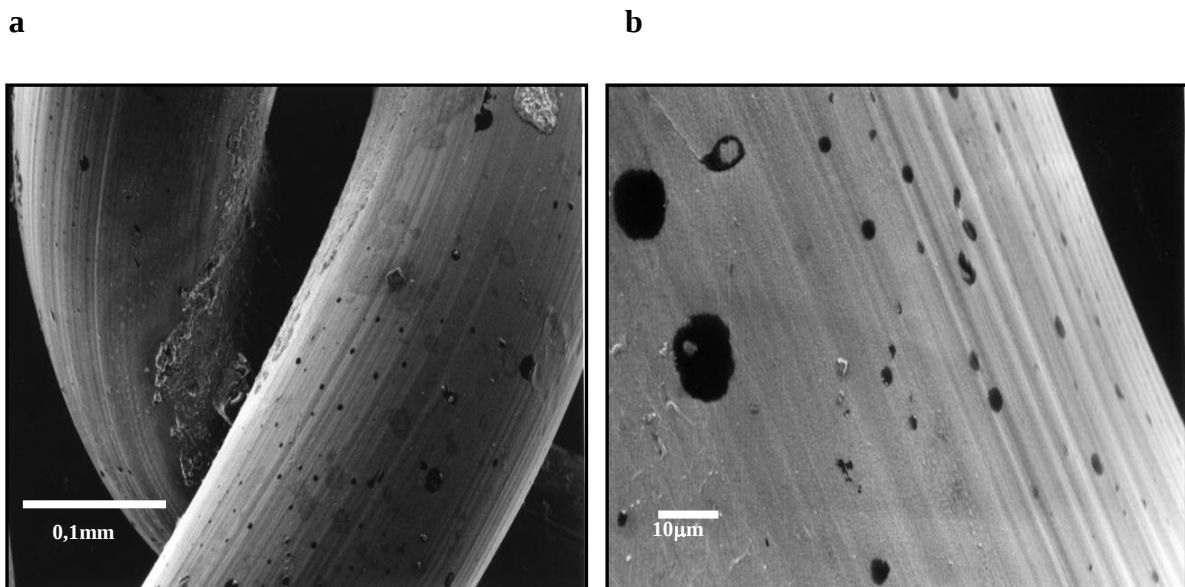


Abb. 20: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der nicht-resterilisierten Polypropylen-Netze nach 48stündiger Inkubation in einer Fibroblastenkultur; a: im Original 300fache Vergrößerung; b: im Original 1200fache Vergrößerung

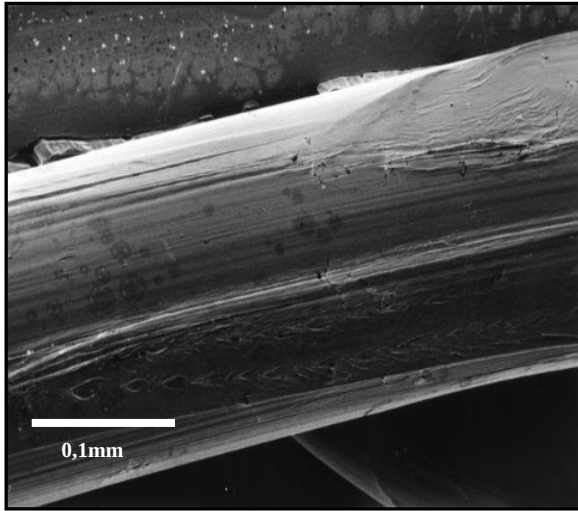
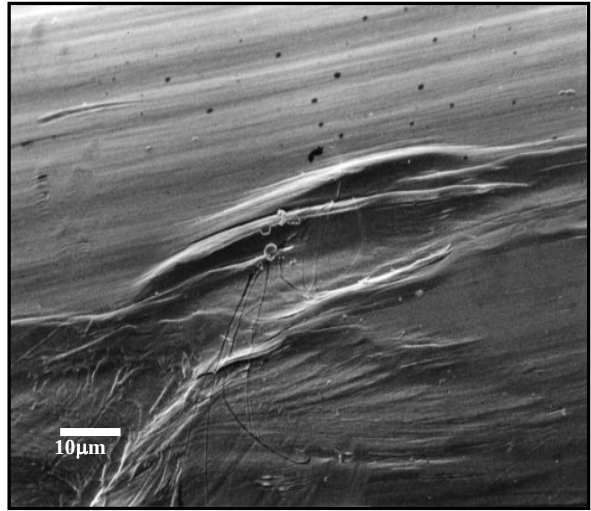
a**b**

Abb. 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der restereilisierten Polypropylen-Netze nach 48stündiger Inkubation in einer Fibroblastenkultur; a: im Original 300fache Vergrößerung; b: im Original 1200fache Vergrößerung

3.7. Lyophilisate der löslichen Bestandteile der Netze

3.7.1. Apoptosebestimmung der Fibroblasten nach Inkubation mit den Lyophilisaten

Um herauszufinden, ob der Einfluss des Polypropylen-Netzes auf die Fibroblasten direkt von den Netzen ausgeht oder ob möglicherweise durch das Zellkulturmedium oder gar durch die Zellen selbst aus den Netzen irgendeine Substanz gelöst wird, die dann wiederum einen Einfluss auf das Wachstum der Fibroblasten ausübt, wurde mit Hilfe der Lyophilisation ein in Aqua dest. konzentriertes Extrakt der löslichen Bestandteile der Netze hergestellt (siehe 2.8.1.). Anschließend wurden die Fibroblasten 48 Std zusammen mit diesem Extrakt inkubiert (siehe 2.8.2.). In **Abb. 22** erkennt man deutlich, dass in der Kontrollgruppe die Apoptoserate der Fibroblasten nur bei 0,85% liegt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe ist die Apoptoserate bei den Fibroblasten nach Zugabe des Lyophilisates der löslichen Bestandteile aus den nicht restereilisierten Netzen (NRS) signifikant um das zweifache auf 1,64% gestiegen ($p=0,021$). Ganz im Gegensatz dazu verhält sich die Gruppe, bei der die Fibroblasten 48 Std mit dem Lyophilisat der löslichen Bestandteile der restereilisierten Netze (RS) inkubiert wurden. Hier zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Kontrollgruppe um etwas mehr als das zehnfache auf 10,01%

($p=0,021$). Des Weiteren steigt die Apoptoserate auch gegenüber der Gruppe mit dem Lyophilisat der löslichen Bestandteile aus den nicht resterilisierten Netzen ebenfalls signifikant von 1,64 % auf 10,01 % ($p=0,021$). Mit diesem Versuch wird deutlich, dass nicht nur die nicht resterilisierten und resterilisierten Netze einen direkten schädlichen Einfluss auf das Wachstum der Fibroblasten haben, sondern dass auch die Extrakte, die 48 Std mit den nicht resterilisierten und resterilisierten Netzen vorinkubiert wurden, in schwächerer Form prinzipiell den selben Effekt auf das Wachstum der Zellen ausüben. Wie schon unter 3.2. beschrieben wurde, löst die direkte Inkubation der Fibroblasten mit den jeweiligen Netzproben in den Versuchen auch eine erhöhte Apoptoserate aus. Somit scheint durch den Vorgang des Resterilisierens eine Substanz aus den Netzen herausgelöst zu werden, die bei Inkubation mit den Fibroblasten eine erhöhte Apoptoserate verursacht.

Gruppe	MW nach 48 Std	SD
Kontrolle	0,85	0,32
NRS	1,65	0,33
RS	10,01	2,55

Tab.4: Annexin V positive Fibroblasten (%)

Mittelwert ($n = 4$) mit Standardabweichung (SD) der drei Gruppen nach 48stündiger Inkubation mit den Lyophilisaten

Signifikante Unterschiede:

Kontrolle (48Std) / NRS (48Std) $p=0,021$

Kontrolle (48Std) / RS (48Std) $p=0,021$

NRS (48Std) / RS (48Std) $p=0,021$

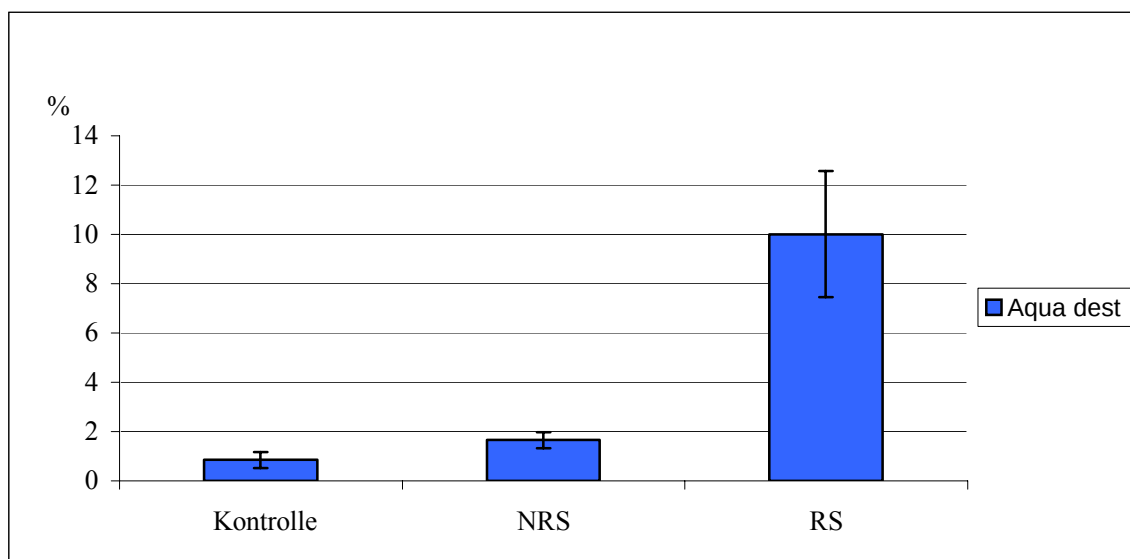
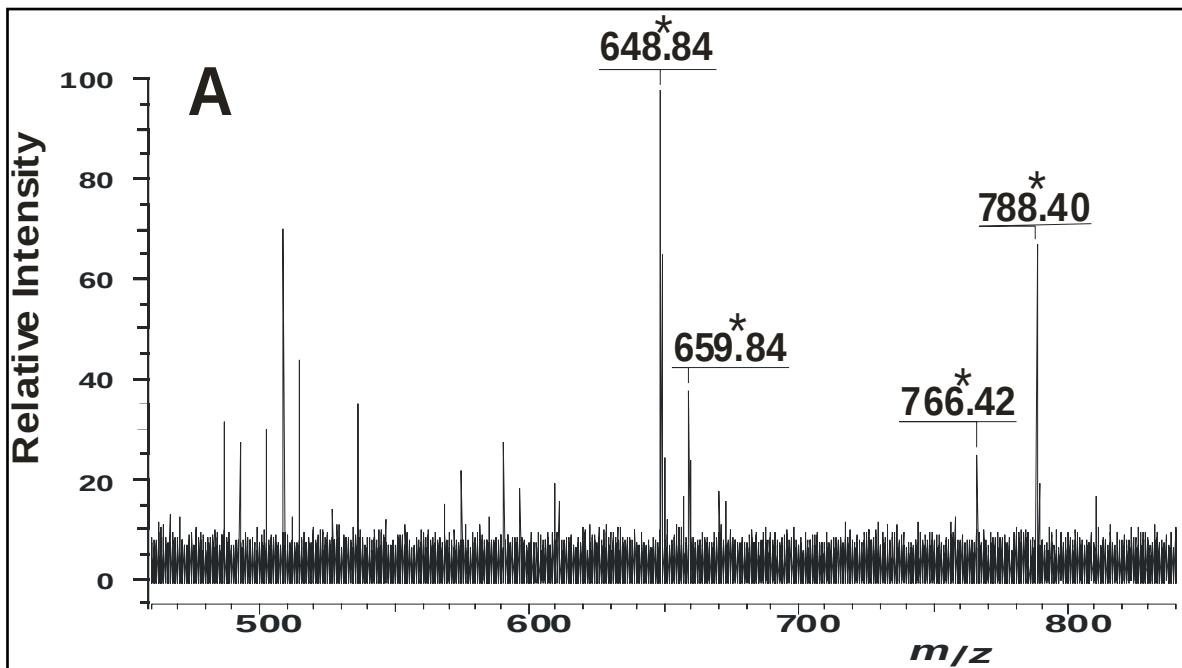


Abb. 22: Graphische Abbildung der in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse. ($n=4$ pro Gruppe)

Kontrolle: Fibroblasten mit Zugabe von *Aqua dest.*, NRS: Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit konzentriertem Extrakt der löslichen Bestandteile der nicht resterilisierten Netze, RS: Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit konzentriertem Extrakt der löslichen Bestandteile der resterilisierten Netze

3.7.2. Massenspektrometrische Analyse der Lyophilisate

Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der löslichen Bestandteile der nicht resterilisierten und resterilisierten Netze. Die Kontrollgruppe, die nur mit *Aqua dest.* durchgeführt wurde, zeigt einige Molekülionen, die als Verunreinigung in der Spraylösung und als Reste des verwendeten Eichstandards erkannt wurden (siehe **Abb. 23A**). Die gleichen Massenpeaks wurden auch im Lyophilisat der Gruppe mit den nicht resterilisierten Netzen nachgewiesen (siehe **Abb. 23B**). Ganz anders das Bild bei den Messergebnissen der löslichen Bestandteile der resterilisierten Netze (siehe **Abb. 23C**). Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der in den Lyophilisaten gelösten Moleküle. Dabei handelt es sich offensichtlich um polymere Moleküle im Massenbereich von m/z 500 bis m/z 800 mit einer sich wiederholenden Massendifferenz von 44 amu. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Vorgang des Resterilisierens Substanzen aus den Polypropylen-Netzen herauslöst, die wahrscheinlich die Ursache für die erhöhte Apoptoserate der Fibroblasten im Zellkulturversuch darstellen (siehe 3.7.1.).



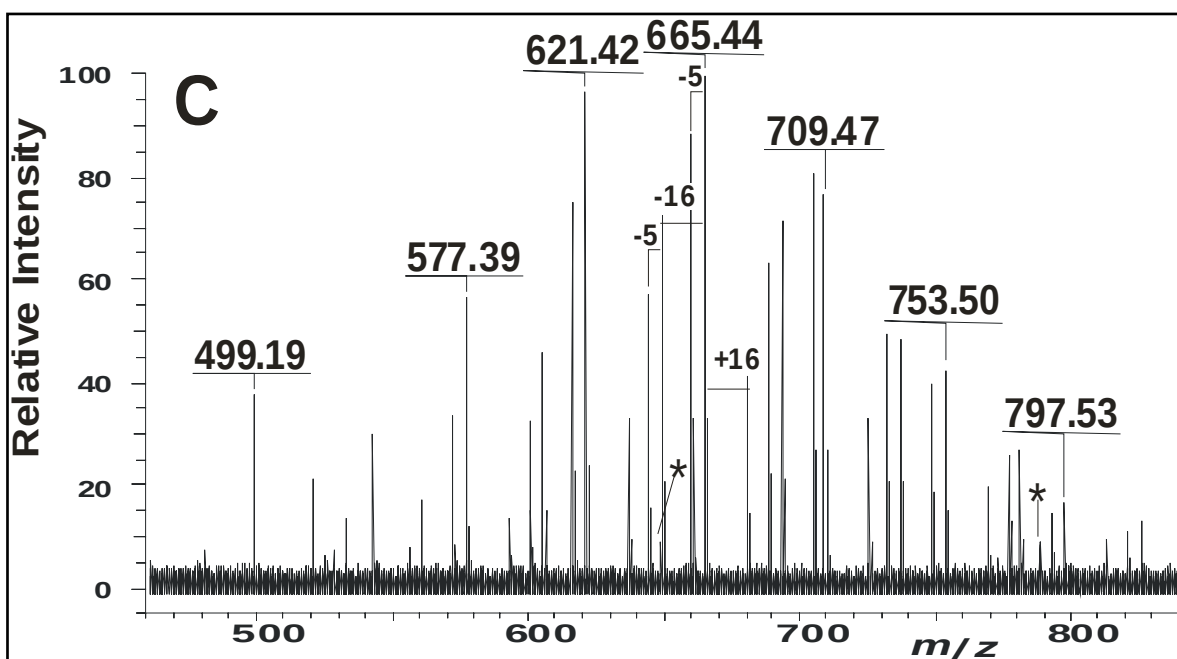
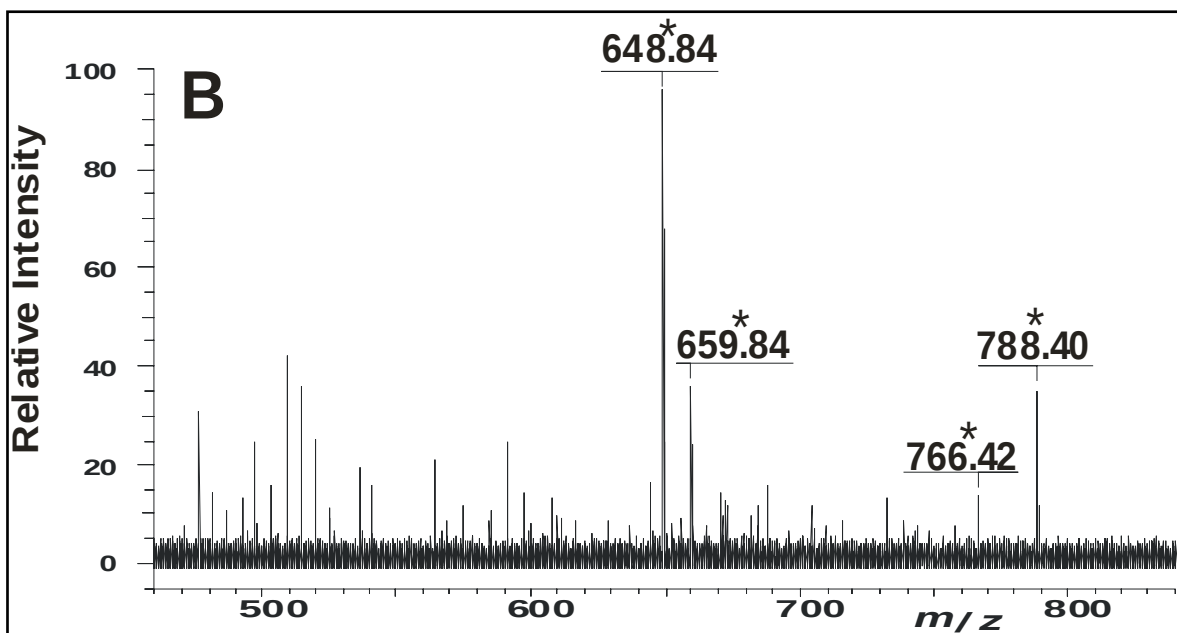


Abb. 23: Massenspektrogramm der jeweiligen Lyophilisate

A: Kontrollgruppe nur mit *Aqua dest.*, B: Lyophilisate der löslichen Bestandteile der nicht resterilisierten Netze (NRS), C: Lyophilisate der löslichen Bestandteile der resterilisierten Netze (RS)

4. Diskussion

Der zunehmende Einsatz implantierbarer Kunststoffnetze führt zu einer vermehrten Diskussion über die Verwendung dieser Netze am Menschen, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine steigende Anzahl von Patienten jünger als 40 Jahre ist und somit die implantierten Netze für die Dauer von ca. 40 bis 50 Jahre im menschlichen Körper verweilen. Auf der einen Seite stellen die Netze einen deutlichen Fortschritt in der Behandlung von Narben- und Rezidivleistenhernien dar, mit deren Hilfe die Rezidivquoten von teilweise 50% (Langer et al., 1985; Langer et al., 2003) auf unter 10% gesenkt werden konnten (Amid et al., 1992; Lichtenstein et al., 1993), auf der anderen Seite stieg mit der zunehmenden Verwendung von Kunststoffnetzen auch die Rate der Früh- und Spätkomplikationen (siehe 1.2.3.). Leider existieren bis heute neben wenigen Langzeitstudien und den üblichen histologischen Untersuchungen über die Verträglichkeit der Netze nach Langzeitimplantation keine Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene, um eine bessere Aussage über einen schädlichen oder möglicherweise kanzerogenen Einfluss der Kunststoffnetze zu treffen (Schumpelick et al., 1999, Schumpelick 1999). Es werden heutzutage eine Vielzahl von verschiedenen Netzen aus unterschiedlichen Materialien verwendet, die mit Hilfe differenter Methoden und Techniken implantiert werden können (siehe 1.2.1. und 1.2.2.) (Korenkov et al., 2002). Somit fällt es nicht immer leicht, die verschiedenen Studien zu vergleichen und eine Aussage über die Verträglichkeit der Netze zu treffen, da bis heute keine Standards bei der Wahl des Netzmaterials oder der Implantationstechnik existieren. Um so mehr besteht die Notwendigkeit, noch weitere eingehende Untersuchungen an diesen Netzmaterialien vorzunehmen.

4.1. *In-vitro* Modell

Mit dieser Arbeit habe ich versucht, ein standardisiertes *in-vitro* Modell zu erstellen, in dem die Interaktion zwischen humanen Fibroblasten und Polypropylen-Netzen (Prolene®) nach verschiedenen Inkubationszeiten auf molekularer Ebene untersucht werden können. Erste Versuche mit humanen Fibroblasten und HeLa-Zellen ergaben, dass die Proliferationsrate der Zellen nach 48stündiger Inkubation mit den Netzen im Wesentlichen unbeeinflusst blieb, während eine deutliche Zunahme der Apoptoserate zu beobachten war

(Duchrow et al., 2002). In meiner Arbeit sollten ebenfalls die Apoptoserate, der Proliferationsindex und zusätzlich die möglicherweise durch die Netze induzierte Expression von HSP 70 untersucht werden. Anders als in den ersten Versuchen erfolgten die Messungen nicht nur nach 48stündiger Inkubation, sondern in einer Versuchsreihe unter verschiedenen langen Inkubationszeiten von 6 bis 48 Std, um einen genauen Verlauf des Wachstumsverhaltens der Zellen zu beobachten (siehe 2.4.1.).

Als Primärzellen wählte ich humane Fibroblasten, da diese nach Implantation eines Polypropylen-Netzes im Menschen eine große Rolle bei der primären Gewebereaktion und anschließenden Bildung einer Narbenplatte spielen. Die Fibroblasten durchwachsen die Poren und stehen im direkten Kontakt mit den implantierten Netzen (Bellon et al., 1995; Klosterhafen et al, 1997). Somit sind humane Fibroblasten auch in dieser Versuchsreihe die geeignetsten Primärzellen. Während der verschiedenen Inkubationszeiten wurde bewusst kein Mediumwechsel durchgeführt, um die Interaktion zwischen Zellen und Netzen nicht zu beeinflussen.

Inkubiert wurden die Fibroblasten mit einer 2 x 2 cm großen Probe des Polypropylen-Netzes Prolene®. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Netzes war die Tatsache, dass Polypropylen eines der am meisten benutzten Materialien in der Chirurgie darstellt und vor allem das Prolene®-Netz in Deutschland sehr häufig in der Hernienchirurgie verwendet wird (Korenkov et al.; 2002).

Unsere eher zufällige Entdeckung, dass resterilisierte Netze schon nach kurzer Zeit das Wachstum der Zellen deutlich reduzieren und die Angaben des Herstellers, dass diese Netze unter bestimmten Bedingungen in einem Dampfautoklaven resterilisiert werden können (siehe 1.5.), war der Anlass, neben nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen zusätzlich noch resterilisierte Netze systematisch in diesem standardisierten *in-vitro* Modell zu testen.

4.2. Durchflusszytometrische Untersuchung

Die Bestimmung der Apoptoserate, des Proliferationsindex und der HSP 70 Expression der nach verschiedenen Inkubationszeiten geernteten Fibroblasten erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Gerade bei der Bestimmung dieser speziellen Parameter mit Hilfe von Annexin V und Antikörpern gegen das Ki-67 Protein und das Hitzeschockprotein 70 hat sich die Durchflusszytometrie als Standardmethode etabliert, da sie im Vergleich zu

anderen Methoden, wie z.B. der Immunhistochemie schnelle, quantitative und objektive Messungen erlaubt. Ein weiterer Vorteil der Durchflusszytometrie ist die einfache Handhabung und die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Schwartz et al., 1986; He und Fox 1996; Darzynkiewicz et al. 1997). Für unser *in-vitro* Modell scheint die Durchflusszytometrie die richtige Methode zu sein, da die Versuche jeweils aus einer Zellpopulation angesetzt und somit die Fibroblasten zwischen den einzelnen Inkubationszeiten schnell aufbereitet und sofort analysiert werden konnten.

Neben den vielen verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Apoptoserate erweist sich die durchflusszytometrische Messung mit Hilfe von Annexin V als besonders geeignet. Mit dieser Methode lassen sich apoptotische von nicht apoptotischen Zellen innerhalb einer Zellpopulation differenzieren und quantifizieren, so dass man die Apoptose der Fibroblasten schon in einer frühen Phase messen kann (Vermes et al. 1995).

Die Bestimmung des Hitzeschockproteins wird in der Literatur oft als geeigneter Indikator für zellulären Stress verwendet und eignet sich besonders für die Durchflusszytometrie (He und Fox 1996). Einige Autoren merken aber an, dass das Hitzeschockprotein nicht spezifisch genug ist, um genaue Rückschlüsse auf eine mögliche Ursache der Erhöhung des Stressproteins ziehen zu können (Hang und Fox, 1996). Das Hitzeschockprotein sei an vielen verschiedenen Prozessen, wie z.B. Proteintranslokation, Proteinfaltung und DNA-Replikation innerhalb einer Zelle verantwortlich (Chirico et al., 1988; Beckmann et al., 1990) und eine Erhöhung könnte durch viele unterschiedliche Ursachen (z.B. Hyperthermie, mechanischer Stress, Entzündungen und UV-Strahlung) bedingt sein (Welch 1992; Suzuki und Watanabe 1992).

Aber dennoch wird die Bestimmung des Hitzeschockprotein 70 in vielen Studien zur Messung des induzierten Zellstresses verwendet (Klosterhagen et al., 2002). Das war auch für mich der Anlass, diesen Parameter in den Fibroblasten zu bestimmen, um meine Ergebnisse mit der *in-vivo* Studie von Klosterhagen vergleichen zu können, der die Apoptose, die Zellproliferation und die Expression von HSP 70 an Geweben explantierter Netze untersuchte (Klosterhagen et al., 2000).

Im Gegensatz zu der Annexin V Messung (Apoptose) besteht bei der Aufbereitung der Fibroblasten für die durchflusszytometrische Messung der Zellproliferation (Ki-67) und der HSP 70 Expression die Notwendigkeit, eine geeignete Methode zur Fixierung und

Permeabilisierung der Zellen zu ermitteln, da die Antikörper in das Zellinnere gelangen müssen, um an die entsprechenden Antigene binden zu können.

In der Literatur existieren viele verschiedene Methoden (z.B. Fixierung mit Aceton oder Methanol u.s.w.), die sich aber leider nicht bei jeder beliebigen Zelllinie anwenden lassen. Am häufigsten wird die Fixierung und Permeabilisierung mit einer 1%igen Paraformaldehydlösung empfohlen, da diese keinen negativen Einfluss auf die Zellen hat (Endl et al. 2001).

Die geeignetste Methode zur Fixierung der Fibroblasten scheint ebenfalls die Methode mit 1%igem Paraformaldehyd zu sein, da diese im Vergleich zu der Methanolfixierung die besten Ergebnisse ergab.

4.2.1. Einfluss der Polypropylen-Netze auf die Fibroblasten

4.2.1.1. Apoptoserate

Wie die Ergebnisse zeigen, kommt es bei den nicht resterilisierten Netzen über den gesamten Zeitraum zu einem kontinuierlichen Anstieg der Apoptoserate. Hier scheinen die Netze einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu haben. Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Kontrollgruppe ohne Netze, so sieht man zwar auch hier einen leichten Anstieg der Apoptoserate nach 48 Std, aber nicht so deutlich wie in der Gruppe mit den nicht resterilisierten Netzen. Diese nur leicht erhöhte Apoptoserate lässt sich wahrscheinlich durch die speziellen Bedingungen, denen die Fibroblasten in einer Zellkultur ausgesetzt sind (u.a. Anreicherung von Stoffwechselmetaboliten, Rückgang der Nährstoffe, Zellalterung, u.s.w.) erklären.

Noch deutlicher wird der Unterschied zu der Gruppe mit den resterilisierten Netzen. In diesem Ansatz kommt es im Laufe von 48 Std zu einem massiven Anstieg der Apoptoserate der Fibroblasten. Der Vorgang des Resterilisierens scheint die schädigende Wirkung der Netze deutlich zu verstärken.

Vergleicht man nun unsere Ergebnisse mit denen einer Studie, in welcher die Apoptoserate immunhistochemisch mittels der TUNEL-Technik in Geweben nach Langzeitimplantation von Netzen bestimmt wurde, so konnte dort ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate der Zellen im Implantatlager nachgewiesen werden. Sie betrug bei nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen 26% und kommt damit der in unserer Arbeit

ermittelten Apoptoserate von 20% sehr nahe (Klosterhafen et al., 2000). In einer weiteren Studie betrug die Apoptoserate sogar knapp 32% (Schumpelick et al., 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei den *in-vivo* Untersuchungen als auch in unserem *in-vitro* Modell die Fibroblasten nach Kontakt mit einem Polypropylen-Netz eine erhöhte Apoptoserate aufweisen. Als Ursache für die deutlich erhöhte Apoptoserate der Fibroblasten nach Kontakt mit den resterilisierten Netzen vermuten wir die Freisetzung von möglicherweise toxischen Substanzen aus den Netzen im Rahmen der Resterilisation.

4.2.1.2. Proliferationsindex

Bei der Untersuchung des Proliferationsindex der Fibroblasten kam es über 48 Std zu einem leichten und nahezu identischen Rückgang der proliferativen Aktivität der Zellen in der Kontrollgruppe sowie in der Gruppe mit den nicht resterilisierten Netzen. Dies dürfte wahrscheinlich wieder auf die wie schon unter 4.2.1.1. beschriebenen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Zudem spielt hier sicher auch das bekannte Phänomen der Kontaktinhibition eine Rolle, was sich in einem Rückgang der Zellteilung äußert.

Anders verhielt sich dagegen der Ansatz mit den resterilisierten Netzen. Hier zeigt sich ein über 48 Std kontinuierlicher und gravierender Rückgang der proliferativen Aktivität der Zellen.

Nun ist davon auszugehen, dass versuchsbedingt die Netze nicht über den gesamten Zeitraum mit den Fibroblasten in Kontakt standen. Deshalb kann nicht eindeutig beantwortet werden, ob die schädliche Wirkung der Netze durch deren direkten Kontakt mit den Zellen verursacht wurde oder ob durch Diffusion oder den thermischen Vorgang des Resterilisierens eine Substanz aus den Netzen gelöst wurde, die wiederum einen toxischen und wachstumshemmenden Einfluss auf die Zellen ausübt.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten die unter 4.2.1.1. beschriebenen Studien von Klosterhafen und Schumpelick keinen Rückgang der Proliferationsrate sondern eine Erhöhung der proliferativen Aktivität der die Netzfaser umgebenden Zellen (Schumpelick et al., 1999; Klosterhafen et al., 2000). Diese Differenzen in den Ergebnissen könnten sich zum Teil dadurch erklären, dass meine Versuche in einem eher artifiziellen *in-vitro* Modell durchgeführt wurden, in dem das Wachstumsverhalten der Zellen anders zu sein scheint als bei den Zellen im Gewebeverband. Zudem wurde in den erwähnten Studien die

proliferative Aktivität aller Zellen des explantierten Gewebes bestimmt (Fibroblasten, Entzündungszellen u.s.w.), während in meinem Modell diese ausschließlich nur an Fibroblasten gemessen wurde.

Interessant erscheint eine Langzeitstudie, die Klosterhafen 2002 anhand explantierter Netze durchführte. In dieser Studie zeigte sich nach 5 Jahren Implantationsdauer der Netze, dass die in den ersten Jahren nach der Implantation nachgewiesene erhöhte Apoptose- und Proliferationsrate der Zellen in der Umgebung der Netze allmählich wieder fallende Tendenz aufwies. Ein Grund könnte die in den histologischen Untersuchungen initial gefundene deutliche Bildung von Narbengewebe sein, da die Netze als Fremdkörper erkannt und in eine straffe Bindegewebskapsel eingebaut werden (Klosterhafen et al., 2002).

4.2.1.3. Hitzeschockprotein 70

Zusätzlich zu der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose- und der Proliferationsrate sollte mit der Bestimmung der Expression des Hitzeschockproteins 70 eine Aussage über die Stressreaktion der Zellen nach Kontakt mit nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen getroffen werden. Erstaunlicherweise zeigten die Fibroblasten in diesem *in-vitro* Modell nach 48stündiger Inkubation keinen Unterschied in der Hitzeschockprotein 70 Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Um einen Messfehler ausschließen zu können, fertigte ich von den Fibroblasten zusätzlich noch immunhistochemische Untersuchungen an, die lichtmikroskopisch ausgewertet wurden. Aber auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Hitzeschockprotein 70 Expression zwischen der Kontrollgruppe ohne Netz und der Gruppe mit Netz. Die Inkubation der Zellen mit den Netzen schien demnach keinen erhöhten zellulären Stress auszulösen.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse mehrerer Studien eine erhöhte Hitzeschockprotein 70 Expressionen der Zellen, die sich in direkter Umgebung explantierter Netze befanden und dauerhaft den mechanischen Auswirkungen der Netze ausgesetzt waren (Klosterhafen et al., 2000; Klosterhafen et al., 2002). Ein Grund dafür könnte die viel längere Kontaktdauer der Netze mit den Zellen sein, die teilweise mehrere Jahre implantiert waren und somit einem stärkeren chronischen Dauerreiz auf das umgebende Gewebe ausübten als in unserem *in-vitro* Versuch für eine Dauer von nur 48 Std.

4.3. Rasterelektronenmikroskopie der Netze

Die Untersuchung der Polypropylen-Netze im Rasterelektronenmikroskop sollte zeigen, ob die Inkubation mit der Fibroblastenkultur bzw. die Resterilisierung einen Einfluss auf die Struktur der Netzfilamente hat und ob die mit zunehmender Inkubationszeit steigende Apoptoserate und abnehmende Proliferationsrate durch eine Veränderung der Netzstruktur und dadurch möglicherweise bedingte Freisetzung toxischer Substanzen verursacht sein könnte. Verglichen wurden resterilisierte und nicht resterilisierte Netzproben, die in verschiedenen Ansätzen aufbereitet wurden (siehe 2.7.2.).

Betrachtet man die nativen, der Verpackung entnommenen Netze der Kontrollgruppe, so zeigte sich in allen Vergrößerungen eine homogene und intakte Struktur der Filamentoberfläche. Ganz anders das Bild bei dem Ansatz mit den resterilisierten Netzen. Hier fanden sich deutliche Risse und Spalten unterschiedlicher Tiefe und Ausdehnung innerhalb der Netzfilamente. Somit scheint durch den thermischen Vorgang des Resterilisierens die oberflächliche Struktur der Polypropylen-Netze deutlich geschädigt zu werden.

Erstaunlicherweise zeigten auch die Proben der nicht resterilisierten Netze nach 48stündiger Inkubation ausschließlich im Kulturmedium und ebenso die Netze nach 48stündiger Inkubation mit der Fibroblastenkultur ebenfalls deutliche Veränderungen der oberflächlichen Struktur. Auffällig waren in beiden Gruppen neben Rissen und Spalten zahlreiche über die Filamente verteilte schwarze Punkte von variabler Größe, die am ehesten als beginnende oberflächliche Strukturveränderung zu werten sind. Zusammenfassend wird deutlich, dass sich sowohl bei den nicht resterilisierten als auch bei den resterilisierten Netzen nach Inkubation im Medium oder mit der Zellkultur deutliche Veränderungen der oberflächlichen Strukturen der Filamente finden. Die Defekte sind allerdings bei den resterilisierten Netzen deutlicher ausgeprägt.

In den letzten Jahren wurden mehrere Artikel veröffentlicht, die über strukturelle Veränderungen der Netze nach der Implantation berichteten. Netze, die nach Jahren wieder explantiert wurden, zeigten eine deutliche Verhärtung und Schrumpfung um ca. 20-30% im Vergleich zu der Ursprungsgröße (Bellon et al., 1995; Klosterhafen et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse konnten auch im Tierversuch an Hunden gezeigt werden (Klinge et al., 1998).

In einer aktuellen Arbeit aus dem Jahre 2003, in der explantierte Polypropylen-Netze untersucht wurden, konnte bei einigen Netzen neben einer Tendenz zur Schrumpfung auch eine Größenzunahme, jeweils bedingt durch eine Verkleinerung bzw. Vergrößerung des Porendurchmessers festgestellt werden (Coda et al., 2003). Erstaunlicherweise zeigten die Netze auch nach ausschließlicher Inkubation in *Aqua dest.* oder Blut deutliche Veränderungen der äußeren Form. Die explantierten Netze wurden ebenfalls mit einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Auffällig war, dass auch hier oberflächliche Strukturveränderungen in Form von Rissen, Spalten und Aufwerfungen der Filamentstruktur der Polypropylen-Netze zu sehen waren. Die Netze zeigten nach Jahren eine deutliche Strukturveränderung, die den Veränderungen in meinen Versuchen interessanterweise sehr ähnlich sind.

Es wird somit deutlich, dass nicht nur in meinem *in-vitro* Modell Strukturveränderungen an den Netzen auftreten, sondern dass diese auch in ähnlicher Form bei explantierten Netzen von Menschen oder Tieren auftraten. Die von Bellon 1995 und Klosterhafen 1997 beschriebene inflammatorische Reaktion und die Bildung eines straffen Narbengewebes scheint einen so starken Einfluss auf das Material auszuüben, dass die Struktur der Netze aufgebrochen und verändert wird.

In meinem *in-vitro* Modell reicht allein der Kontakt der Polypropylen-Netze mit dem Kulturmedium oder den Fibroblastenkulturen aus, um oberflächliche Strukturveränderung zu verursachen, die durch den Vorgang des Resterilisierens noch deutlich verstärkt werden. Dieser Aufbruch der oberflächlichen Struktur ist vielleicht die Ursache für den wachstumshemmenden Einfluss auf die Fibroblasten. Ob dieser Einfluss von den veränderten Netzen direkt ausgeht, oder ob möglicherweise durch den thermischen Vorgang des Resterilisierens niedermolekulare Substanzen aus den Netzen gelöst werden, die dann einen toxischen Effekt auf die Fibroblasten ausüben und somit die Apoptoserate insbesondere bei den resterilisierten Netzen drastisch erhöhen, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.4. Mögliche Ursachen des wachstumshemmenden Einflusses der resterilisierten Polypropylen-Netze

Die erhöhte Apoptoserate bei den nicht resterilisierten und resterilisierten Netzen auf der einen Seite und die sinkende Proliferationsrate der Fibroblasten bei den resterilisierten Netzen auf der anderen Seite führte zu der Überlegung, ob der wachstumshemmende Einfluss auf die Fibroblasten möglicherweise durch den direkten Kontakt der Netze zustande kommt oder ob nicht durch die Resterilisierung eine toxische Substanz aus den Netzen gelöst wird.

Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, inkubierte ich die nicht resterilisierten und resterilisierten Netzproben für 48 Std in 1ml *Aqua dest.* bei 37 °C im Brutschrank. Wenn tatsächlich eine toxische Substanz aus den Netzen gelöst wird, dann müsste sie sich im *Aqua dest.* befinden und ebenfalls auf die Zellen toxisch wirken, was sich in einer erhöhten Apoptoserate der Fibroblasten ausdrückt. Damit nicht 1 ml der Lösung zu den Zellkulturen gegeben werden musste, wurde diese mit Hilfe der Lyophilisation konzentriert. Diese Extrakte der gelösten Bestandteile der Netze (ca. 50 µl) wurden in die Zellkultur pipettiert und für 48 Std inkubiert. Anschließend wurden die Fibroblasten geerntet und die Apoptoserate der Fibroblasten im Durchflusszytometer gemessen.

Die Ergebnisse zeigten bei den resterilisierten Netzen eine gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöhte Apoptoserate und erstaunlicherweise auch bei nicht resterilisierten Netzen eine leicht erhöhte Apoptoserate. Zwar war die Apoptoserate nicht so hoch wie bei dem direktem Kontakt mit den resterilisierten Netzen, es wurde mit diesem Versuch aber deutlich, dass insbesondere von den resterilisierten Polypropylen-Netzen offensichtlich eine unbekannte Substanz freigesetzt wird, die ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate auslöst.

Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, die konzentrierten Lyophilisate mit Hilfe der Massenspektrometrie weiter zu untersuchen, um die Substanz näher beschreiben und möglicherweise identifizieren zu können. Mit der freundlichen Unterstützung von PD Dr. rer. nat. Buko Lindner aus der Abteilung für Biophysik des Forschungszentrums Borstel wurden die einzelnen Proben der Extrakte im Massenspektrometer untersucht.

Die Analysen ergaben, dass die *Aqua dest.* Kontrolle und die löslichen Bestandteile der nicht resterilisierten Netze nahezu identischen Massenspektren mit Massenpeaks lieferten,

die im wesentlichen einer Kontamination der Elektrospraylösung zuzuordnen waren. Im Rahmen der Messempfindlichkeit lässt sich somit bei der Gruppe der nicht resterilisierten Netze keine Substanz nachweisen, die die leicht erhöhte Apoptoserate der Zellen nach Inkubation mit diesem Lyophilisat erklären könnte.

Ein deutlich verändertes Massenspektrum wurde von dem Überstand der resterilisierten Netze gemessen, obwohl die gleiche Probenaufbereitung und die gleiche instrumentelle Bedingungen wie für die beiden anderen Proben gewählt wurden. In dem Lyophilisat lässt sich in dem Molekulargewichtsbereich von ca. 500-800 g/mol eindeutig ein Polymer mit einer sich wiederholenden Massendifferenz von 44 amu nachweisen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Vorgang des Resterilisierens tatsächlich Polymere aus den Polypropylen-Netzen herauslöst, die vermutlich auch für die erhöhte Apoptoserate der Fibroblasten verantwortlich sind. Über die chemische Identität dieser biologisch aktiven Polymere kann momentan keine definitive Aussage getroffen werden. Massendifferenzen von 44 amu sind typisch für Polymere die Ethylenglycol enthalten wie z.B. in Triton-X-100. Betrachtet man aber die Summenformel des Propylen ($[-C_3H_6]_n-$), würde man ein repetierende Einheit von nur 42 amu erwarten. Bei den im Massenspektrum gefundenen Polymeren handelt es sich demnach um kein reines Polypropylen. Entweder wurden Teile des Polypropylen-Netzes durch die thermische Belastung in ihrer chemischen Struktur verändert und dann herausgelöst oder es handelt sich möglicherweise um Additive, die während der Herstellung zugesetzt und dann nach der Temperaturerhöhung leichter freigesetzt wurden. Vertauscht man spekulativ eine CH_3 -Gruppe des Propylens mit einer OH-Gruppe, so erhält man ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 44. Dieses Molekül könnte für die erhöhte Apoptoserate und die sinkende Proliferationsrate bei den resterilisierten Netzen verantwortlich sein. Von unserer Arbeitsgruppe werden in nächster Zeit noch weitere eingehende chemische Untersuchungen vorgenommen, um dieses Molekül noch genauer identifizieren zu können.

Natürlich könnte auch von den Netzen direkt ein schädlicher Einfluss auf die Zellen ausgeübt werden, da die Zellen mit den nicht resterilisierten Netze ebenfalls eine leicht erhöhte Apoptoserate zeigen, obwohl wir im Gegensatz zu den resterilisierten Netzen im Massenspektrometer keine Substanzen nachweisen konnten, die dafür verantwortlich ist.

Die Resterilisierung der Netze scheint den mechanischen Einfluss auf die Zellen durch eine zusätzliche strukturelle Veränderung der Netzoberfläche und dadurch bedingte Herauslösung eines Polymers deutlich zu verstärken, so dass diese Netze eine viel stärkere

Apoptose und Proliferationshemmung bei den Fibroblasten induzieren als nicht resterilisierten Netze.

4.5. Schlussfolgerung

Betrachtet man die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung, so wird der wachstumshemmende Einfluss besonders der resterilisierten aber auch der nicht resterilisierten Polypropylen-Netze deutlich. Die nicht resterilisierten Netze scheinen durch direkten Kontakt einen schädigenden Einfluss auf die Fibroblasten auszuüben. Die Apoptoserate der Fibroblasten lag im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich höher. Die Oberfläche der nicht resterilisierten Netze zeigen zwar Veränderungen in Form von Rissen und Spalten, es konnte aber im Massenspektrogramm keine Substanz isoliert werden, die eine ansteigende Apoptose erklären würde. Dennoch scheint der direkte Kontakt der Netze einen negativen Effekt auf das Wachstum der Fibroblasten zu haben.

Trotz Verwendung eines artifiziellen *in-vitro* Modells können diese Veränderungen an den Netzen und die entsprechenden zellulären Reaktionen grundsätzlich auch im Gewebe stattfinden, was durch Coda, Klosterhafen und Schumpelick an explantierten Netzen und im Implantatlager gezeigt werden konnte (Schumpelick et al., 1999; Klosterhafen et al., 2000; Coda et al., 2003). Zusätzlich scheint die Netzümplantation einen starken Fremdkörperreiz darzustellen, was zu einer starken inflammatorischen Reaktion führt, die hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen besteht (Bosch et al., 2003). In einem Zellkulturmodell konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF α und Interleukin 10 nach Kontakt mit den Netzen erhöht war (Schachtrupp et al., 2003).

Die Resterilisierung der Polypropylen-Netze scheint die Strukturveränderung der Filamente noch weiter zu verstärken. Offensichtlich wird durch diesen thermischen Vorgang eine Substanz aus den Netzen gelöst, die eine verstärkte Apoptose auslöst und die Proliferation der Zellen massiv hemmt. Zudem findet sich in den Lyophilisaten der resterilisierten Netze ein Polymer mit einer sich wiederholenden Massendifferenz von 44 amu. Hier scheint also der wachstumshemmende Einfluss nicht nur direkt von den Netzen auszugehen, sondern zusätzlich durch eine aus den Netzen herausgelösten Substanz verstärkt zu werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Polypropylen-Netze nicht 100% chemisch inert und damit nicht optimal biokompatibel sind. Obwohl die Netze nach Angaben des Herstellers in Ausnahmefällen in einem Autoklaven bei 121 °C resterilisiert werden können (Ethicon, Norderstedt) und der Erweichungspunkt von Polypropylen bei 160 °C liegt (Schumpelick et al., 1999), zeigen sie schon nach der Autoklavierung bei 121 °C eine deutliche Strukturveränderung der Netzfilamente. Aber auch die nicht resterilisierten Netze zeigen nach 48stündiger Inkubation im Medium eine deutliche Veränderung und teilweise Zerstörung der Filamentoberfläche.

Der Hersteller empfiehlt zwar nicht das Resterilisieren, betont aber, dass das einmalige Resterilisieren der Netze in einem Dampfautoklaven keinen negativen Einfluss auf die Netze habe. Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen mit den resterilisierten Netzen, so sollte auf eine Resterilisation der Polypropylen-Netze durch einen gewöhnlichen Dampfautoklaven verzichtet werden.

Der abnehmende Proliferationsindex der Fibroblasten in unserem *in-vitro* Modell, verbunden mit einer steigenden Apoptoserate, könnte auch als Hinweis auf eine durch das Biomaterial verursachte beginnende Schädigung der DNA gelten. Die thermische Behandlung der Netze im Rahmen der Resterilisation führt offenbar zu einer erheblichen Steigerung dieses Effektes. Auch wenn eine Schädigung der DNA nicht unmittelbar aus diesem Experiment geschlossen werden kann, so erscheint aber eine mögliche maligne Transformation des die Kunststofffasern umgebenden Gewebes im Laufe von Jahrzehnten möglich, besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, dass genetische Veränderungen auch durch chemische und physikalische Noxen verursacht werden können.

Zusätzlich sind in einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien an Nagetieren Weichgewebssarkome nach Implantation verschiedenster Materialien aus Metall und Kunststoff beschrieben worden (Nakamura et al., 1994; Kirkpatrick et al., 2000; Nakamura et al., 2001). Die Induktionszeit der Tumoren betrug in allen Studien etwa die Hälfte bis zu 2/3 der Lebenszeit der Nagetiere. Übertragen auf den Menschen würden diese Intervalle zwischen 30 und 50 Jahren liegen (Ghadimi et al., 2002). Bedenkt man die zunehmende Zahl der Netzimplantationen auch bei jüngeren Patienten, so kann die *in situ* Verweildauer bis zu 50 Jahre betragen.

Zusätzlich existieren in der Literatur einige Fallbeschreibungen von Patienten, bei denen nach der Implantation eines Biomaterials ein maligner Tumor entstanden war. In

mindestens drei Publikationen wird ein kausaler Zusammenhang zwischen der Implantation von Dacronprothesen aus Polyester im Rahmen gefäßchirurgischer Rekonstruktionen und dem Auftreten von Malignomen gesehen (O'Connell et al., 1976; Weinberg et al., 1980; Weiss et al., 1991). Die Autoren berichten von Patienten, bei denen es nach der Implantation einer Dacron-Aortenprothese wegen eines Aortenaneurysmas im Bereich der Implantationsstelle zur Ausbildung eines Sarkoms kam. Des Weiteren berichten Adams et al 2003 von einem Patienten, bei dem sich nach der Implantation eines Biomaterials aus Metall ein Osteosarkom bildete.

Derzeit wird sehr intensiv in verschiedenen Arbeitsgruppen über eine mögliche kanzerogene Gefahr durch implantierbare Kunststoffnetze diskutiert. Fakt aber ist, dass bis heute kein einziger Fallbericht den schlüssigen Beweis über eine mögliche Entstehung eines bösartigen Tumors durch eine Implantation eines Kunststoffnetzes liefert. Auch bei einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 20 Jahren an einer Vielzahl von Patienten konnte bisher nicht über die Induktion eines Sarkoms durch die Netze berichtet werden. Somit sollte der Einsatz von implantierbaren Kunststoffnetzen ohne reelles Risiko sein (Shulman et al., 1990; Ghadimi et al., 2002). Schumpelick kritisiert aber zu Recht, dass bis heute zu wenige molekularbiologische Untersuchungen existieren, um eine wissenschaftliche abgesicherte Aussage machen zu können (Schumpelick, 2002).

Betrachtet man die Ergebnisse, so wird deutlich, dass die Netze einen hemmenden Effekt auf das Wachstumsverhalten der Fibroblasten ausüben. Dennoch scheint es nicht sinnvoll, anhand dieser Versuche die generelle Verwendung der Netze zu verurteilen, da sie in der Hernienchirurgie einen bedeutenden Fortschritt im Bezug auf die Rezidiventwicklung darstellen. Unabdingbar ist aber, dass die Indikation einer Netzimplantation vor allem bei jungen Patienten sorgfältig geprüft und kritisch mit dem Gebrauch der Netze umgegangen wird. Es besteht die Notwendigkeit, bei der Implantation der Netze nur so viel Material wie nötig und so wenig wie möglich zu benutzen, um ein vielleicht doch bestehendes karzinogenes Risiko zu reduzieren. Des Weiteren zeigen die Versuche, dass die existierenden Netzmaterialien optimiert werden müssen, um nach der Definition von Pizzoferrato (siehe 1.1.) eine noch bessere Biokompatibilität zu erreichen.

Um letztendlich zukünftig den genauen Einfluss der Netze auf das Gewebe verstehen zu können, sind aber noch weitere eingehende Untersuchung auf zell- und molekularbiologischer Ebene nötig (Kierckpatrick, 2002). Deshalb ist das nächste Ziel

unserer Arbeitsgruppe die Reaktion von humanen Monozyten und Makrophagen auf das Prolene[®]-Netz ebenfalls in einem Zellkulturmodell zu untersuchen und somit weitere Aussagen über die zelluläre Reaktionen nach Kontakt mit Kunststoffnetzen zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines *in-vitro* Modells das Wachstumsverhalten von humanen Fibroblasten nach Inkubation mit resterilisierten und nicht resterilisierten Polypropylen-Netzen (Prolene®) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Zugabe eines Netzes zu untersuchen. Eingesetzt wird dieses Netz im Bereich der Narben- und Leistenhernienchirurgie.

Untersucht wurden dazu mit Hilfe der Durchflusszytometrie die proliferative Aktivität, die Apoptoserate (programmierter Zelltod) der Fibroblasten nach Inkubation mit resterilisierten und nicht resterilisierten Netzen und zusätzlich die Expression des Hitzeschockproteins 70 als Ausdruck für den durch die nicht resterilisierten Netze induzierten Zellstress. Die Proliferation wurde mit Hilfe des Proliferationsantigens Ki-67 gemessen, die Apoptoserate nach Färbung der Fibroblasten mit Annexin V bestimmt.

Um zu untersuchen, ob aus den Netzen irgendeine Substanz gelöst wird, die möglicherweise einen wachstumshemmenden Einfluss auf die Zellen ausübt, wurden die Netze mit *Aqua dest.* inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Massenspektrometer analysiert. Zusätzlich wurden noch rasterelektronenmikroskopische Bilder der resterilisierten und nicht resterilisierten Polypropylen-Netze angefertigt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Die Apoptoserate stieg nach 48 Std bei dem Ansatz mit den nicht resterilisierten Netzen signifikant um das 10fache von initial 2% auf 19%. Anders verhielt sich der Ansatz mit den resterilisierten Netzen. Hier kam es zu einem signifikanten Anstieg um das über 20fache von initial 2% auf 48% nach 48 Std. Allerdings wurde auch ein Anstieg der Apoptoserate bei der Gruppe ohne Netzkubation von initial 2% auf 10% nach 48 Std beobachtet, was wahrscheinlich als Folge der speziellen Zellkulturbedingungen anzusehen ist.

Die Proliferationsindizes der Kontrollgruppe (ohne Netz) und der Gruppe nach Inkubation mit nicht resterilisierten Netzen zeigten im Verlauf der 48 Std nur geringe Unterschiede und fielen gegen Ende des Versuches, wahrscheinlich ebenfalls als Folge der speziellen Zellkulturbedingungen, leicht ab. Anders verhielt sich wiederum der Proliferationsindex der Fibroblasten nach Zugabe eines resterilisierten Netzes. Hier kam es zu einem über den gesamten Zeitraum zu beobachtenden und nach 48 Std signifikanten Rückgang der Proliferation von initial 86% auf 42%.

Die durchflusszytometrischen und zusätzlich immunzytochemischen Untersuchungen des Hitzeschockproteins 70 zeigten im Verlauf von 48 Std in der Gruppe mit den nicht resterilisierten Netzen und in der Kontrollgruppe nur geringe Unterschiede, so dass durch die Netze keine Veränderung der HSP 70 Expression nachweisbar war.

Betrachtet man die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen, so wird deutlich, dass bei den resterilisierten Netzen, aber erstaunlicherweise auch bei den nicht resterilisierten Netzen oberflächliche Strukturveränderungen zu sehen waren. Jedoch sind diese Veränderungen an resterilisierten Netzen deutlich stärker ausgeprägt. Der Kontakt der Netze mit dem Zellkulturmedium und der Zellkultur scheint deren oberflächliche Struktur zu verändern, was durch das Resterilisieren noch deutlich verstärkt wurde.

Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass aus den resterilisierten Netzen eine noch nicht weiter definierte Substanz gelöst wird. Inkubiert man diese mit Fibroblasten, so kommt es zu einem dramatischen Anstieg der Apoptoserate der Zellen. Erstaunlicherweise handelte es sich bei der isolierten Substanz nicht um Polypropylen mit einer sich wiederholenden Massendifferenz von 42 amu, sondern um ein Polymer mit der sich wiederholenden Massendifferenz von 44 amu. Das Polypropylen scheint durch den Vorgang des Resterilisierens chemisch verändert zu werden, so dass sich Moleküle daraus lösen können, die wiederum einen toxischen Einfluss auf die Fibroblasten haben.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so kann man folgende Aussagen treffen:

- Die Versuche zeigen, dass die Polypropylen-Netze einen wachstumshemmenden Einfluss auf die Fibroblasten ausüben und die Struktur der Netze deutlich verändert wird. Die Netze scheinen nicht 100% biokompatibel zu sein. Neben einer weiteren Materialoptimierung sind eine kritischere Verwendung der Netze und eine genaue Indikationsprüfung vor allem bei jungen Patienten zu empfehlen.
- Die Resterilisation der Polypropylen-Netze verursacht eine noch stärkere Strukturveränderung der Netzfilamente und löst eine Substanz aus den Netzen, die einen deutlichen wachstumshemmenden Einfluss auf die Fibroblasten ausübt. Somit muss von einer Resterilisation der Netze in einem Dampfautoklaven abgeraten werden.

6. Literaturverzeichnis

Adams JE, Jaffe KA, Lemons JE, Siegal GP (2003) Prosthetic implant associated sarcomas: a case report emphasizing surface evaluation and spectroscopic trace metal analysis.

Ann Diag Pathol 7:35-46

Amid PK, Shulman AG, Lichtenstein IL (1992) Surgical repair of primary or recurrent inguinal hernia by prosthesis and polypropylene plug.

Chirurgie 118:551-8

Amid PK, Shulman AG, Lichtenstein IL, Hakakha M (1994) Biomaterials for abdominal wall hernia surgery and principles of their applications.

Langenbecks Arch Chir 379:168-71

Amid PK, Shulman AG, Lichtenstein IL (1996) Open „tension-free“ repair of inguinal hernias: the Lichtenstein technique.

Eur J Surg 162:447

Amid PK (2003) The Lichtenstein repair in 2002: an overview of causes of recurrence after Lichtenstein tension-free hernioplasty.

Hernia 7: 13-16

Baisch H, Gerdes J (1990) Identification of Proliferating Cells by Ki-67 Antibody.

Meth Cell Biol 33: 217-226

Barrat C, Surlin V, Bordea A, Champault G (2003) Management of recurrent inguinal hernias: A prospective study of 163 cases.

Hernia 7:125-129

Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ (1990) Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly.

Science 248:850-854

Bellon JM, Bujan J, Contreras LA, Hernando A (1995) Integration of biomaterials implanted into abdominal wall: process of scar formation and macrophage response. *Biomaterials* 16:381-7

Bellon JM, Contreras LA, Bujan J, Palomares D, Carrera-San Martin A (1998) Tissue response to polypropylene meshes used in the repair of abdominal wall defects. *Biomaterials* 19: 669-675

Chiririco WJ, Walters MG, Blobel G (1988) 70kD heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332:805-810

Coda A, Bendavid R, Botta-Micca F, Bossotti M, Bona A (2003) Structural alterations of prosthetic meshes in humans. *Hernia* 7: 29-34

Darzynkiewicz Z, Juan G, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F (1997) Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis Of Apoptosis and Accidental Cell Death *Cytometry* 27: 1-20

DeBord JR (1998) The historical developments of prosthetics in hernia surgery. *Clin North Am* 78: 973-1006

DeGuzman LJ, Nyhus LM, Yared G, Schlesinger PK (1995) Colocutaneous Fistula Formation Following Polypropylene Mesh Placement for Repair of a Ventral Hernia. Diagnosis by Colonoscopy. *Endoscopy* 27:459-461

Deligiannidis N, Papavasiliou I, Sapalidis K, Kesisoglou I, Papavramidis S, Gamvros O (2002) The use of three different mesh materials in the treatment of abdominal wall defects. *Hernia* 6: 51-55

Duchrow M, Windhövel U, Bethge T, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Broll (2002) Kunststoffnetze aus Polypropylen beeinflussen das Wachstum humaner Zellen in vitro – Eine experimentelle Studie.

Chirurg 73: 154-160.

Endl E, Hollmann C, Gerdes J (2001) Antibodies against the Ki-67 Protein: Assessment of the Growth Fraction and Tools for Cell cycle Analysis.

Meth Cell Biol 63: 399-418

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

Cytometry 31:1-9

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle Analysis of a cell Proliferation-associated human nuclear Antigen defined by the monoclonal Antibody Ki-67.

J Immunology 133: 1710-15

Ghadimi MB, Langer C, Becker H (2002) Zum kanzerogenen Potential von Biomaterialien in der Hernienchirurgie.

Chirurg 73:833-837

Gray MR, Curtis JM Elkington JS (1994) Colovesical fistula after laparoscopic inguinal hernia repair.

Br J Surgery 81:1213-1214

Hang H, Fox M (1996) Levels of 70-kDa Heat shock protein through the cell cycle in several Mammalian cell lines.

Cytometry 25:367-373

He L, Fox M (1996) Comparison of Flow Cytometry and western Blotting to measure Hsp 70.

Cytometry 25:280-286

Hume RH, Bour J (1996) Mesh migration following laparoscopic inguinal hernia repair.
J Laparaendosc Surg 6:333

Jenkins SD, Klamer TW, Parteka JJ, Condon RE (1983) A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects.
Surg 94: 392-398

Kirkpatrick CJ, Alves A, Kohler H, Kriegsmann J, Bittinger F, Otto M, Williams DF, Eloy R (2000) Biomaterial-induced sarcoma: a novel model to study preneoplastic change.
Am J Pathol 156:1455-1467

Kierckpatrick CJ (2002) Kunststoffnetze aus Polypropylen beeinflussen das Wachstum humaner Zellen in vitro (Kommentar auf Anforderung der Schriftleitung)
Chirurg 73:158-160

Klein P, Konzen G, Schmidt O, Hohenberger W (1996) – Die Rekonstruktion von Narbenhernien- Intraoperative Tensiometrie zur Objektivierung der Verfahrenswahl.
Chirurg 67:1020

Klinge U, Conze J, Klosterhafen B, Limberg W, Obolenski B, Öttinger AP, Schumpelick V (1996) Veränderung der Bauchwandmechanik nach Mesh-Implantation.
Langenbeck Arch Chir 381: 323-332

Klinge U, Klosterhafen B, Conze J, Limberg W, Obolenski B, Öttinger AP, Schumpelick V (1998) Modified mesh for hernia repair that is adapted to the physiology of the abdominal wall.
Eur J Surg 164:951-960

Klinge U, Klosterhafen B, Müller M, Öttinger AP, Schumpelick V (1998) Shrinking of Polypropylene Mesh in vivo: An experimental Study in Dogs.
Eur J Surg 164: 965-969

Klinge U, Klosterhafen B, Müller M, Anurov M, Öttinger AP, Schumpelick V (1999)

Influence of polyglactin-coating on functional and morphological parameters of polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair.

Biomaterials 20:613-623

Klosterhafen B, Klinge U, Henze U, Bhardwaj R, Conze J, Schumpelick V (1997)

Morphologische Korrelation der funktionellen Bauchwandmechanik nach Mesh-Implantation.

Langenbecks Arch Chir 382:87-94

Klosterhafen B, Klinge U, Schumpelick V (1998) Functional and morphological

evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair.

Biomaterials 19: 2235-2246.

Klosterhafen B, Klinge U, Hermanns B, Schumpelick V (2000) Pathologie traditioneller

chirurgischer Netze zur Hernienreparation nach Langzeitimplantation im Menschen

Chirurg 71: 43-51

Klosterhafen B, Junge K, Hermanns B, Klinge U (2002) Influence of implantation

interval on the long-term biocompatibility of surgical mesh.

Br J Surg 89: 1043-1048

Korenkov M, Sauerland S, Paul A, Neugebauer E (2002) Die deutsche

Narbenhernienchirurgie im Umbruch. Ein Vergleich zweier Kliniksumfragen 1995 und 2001.

Zentralbl Chir 127: 700-705

Langer S, Christiansen J (1985) Long term results after incisional hernia repair.

Acta Chir Scand 151: 217-219

Langer I, Herzog U, Shupissier JP, Ackermann C, Tondelli P (1996) Die

präperitoneale Netzeinlage zur operativen Versorgung der Rezidivleistenhernie

Chirurg 67:994-402

Langer C, Liersch T, Kley C, Flosman M, Süss M, Siemer A Becker H (2003) 25 Jahre Erfahrung in der Narbenhernienchirurgie: Eine vergleichende, retrospektive Studie an 432 Narbenbruchoperationen.

Chirurg 74: 638-645

Lau WY (2002) History Treatment of Groin Hernia.

World J Surg 26:748-759

Liakakos T, Karanikas I, Panagotidis H, Dendrinios S (1994) Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia.

Br J Surg 81: 248-249

Lichtenstein IL, Schulman AG, Amid PK, Montlor MM (1989) The tension-free hernioplasty.

Am J Surg 157:188

Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK (1993) The prevention and treatment of recurrent groin hernia.

Surg Clin North Am 73:529

Losanoff JE, Richman BW, Jones JW (2002) Entero-colostomies fistula: a late consequence of polypropylene mesh abdominal wall repair: case report and review of the literature.

Hernia 6: 144-147

Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP et al. (2000) A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia.

N Engl J Med 343: 392-98

Matthews BD, Pratt BL, Pollinger HS, Backus CL, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT (2003) Assessment of adhesion formation to intra-abdominal polypropylene mesh and polytetrafluoroethylene mesh.

J Surg Res 114:126-132

Mayo WJ (1901) An operation for the radical cure of umbilical hernia.

Ann Surg 34: 276-280

Milarski K, Welch W, Morimoto R (1989) Cell Cycle-dependent Association of HSP70 with Specific Cellular Proteins.

J of Cell Biology 108: 413-423

Nakamura T, Shimizu Y, Okumura N, Matsui T, Hyon SH Shimamoto T (1994) Tumorigenicity of poly-L-lactide (PLLA) plates compared with medical grade polyethylene.

J Biomed Mater Res 28:17-25

Nakamura T, Ueda H, Tsuda T et al. (2001) Long-term implantation test and tumorigenicity of polyvinyl alcohol hydrogel plates.

J Biomed Mater Res 56:289-296

O'Connell TX, Fee HJ, Golding AJ (1976) Sarcoma associated with dacron prosthetic material: case report and review of the literature.

Thorac Cardiovasc Surg

Osterberg B, Blomstedt B (1979) Effect of suture materials on bacterial survival in infected wounds. An experimental study.

Acta Chir Scand 145:431-434

Paul A, Lefering R, Köhler L, Eypasch E (1997) Gegenwärtige Praxis der Narbenhernienrekonstruktion in der Bundesrepublik Deutschland.

Zentralbl Chir 122: 859- 861

Peiper C, Klinge U, Junge K, Schumpelick V (2002) Netze in der Leistenhernienchirurgie.

Zentralbl Chir 127: 573-577

Pizzoferrato A, Vespucci A, Ciapetti G, Stea S (1985) Biocompatibility testing of prosthetic implant materials by cell cultures.

Biomaterials 6 : 346-351

Rosch R, Junge K, Schachtrupp A, Klinge U, Klosterhafen B, Schumpelick V (2003)

Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model.

Eur Surg Res 2003 35:161 -6

Sächtling H (2001) Das Kunststoff-Taschenbuch 28. Ausgabe von Karl Oberbach

422-425 *Carl Hanser Verlag*

Schachtrupp A, Klinge U, Junge K, Rosch R (2003) Individual inflammatory response of human blood monocytes to mesh biomaterial.

Br J Surg 90:114-120

Schumpelick V, Arlt G (1996) Transinguinale präperitoneale Netzplastik (TIPP) beim Leistenbruch in Lokalanästhesie

Chirurg 67:419-424

Schumpelick V, Conze I, Klinge U (1996) Die präperitoneale Netzplastik in der RepARATION der Narbenhernie.

Chirurg 67 : 1028

Schumpelick V, Arlt G, Schlachetzki A, Klosterhafen B (1997) Chronischer Leistenschmerz nach transperitonealer Netzimplantation (TAPP) – Kasuistik einer Netzschrumpfung.

Chirurg 68: 1297-1300

Schumpelick V, Klosterhafen B, M. Müller, Klinge U (1999) Minimierte Polypropylen-Netze zur präperitonealen Netzplastik (PNP) der Narbenhernie – eine prospektive randomisierte klinische Studie

Chirurg 70: 422-430.

Schumpelick V (1999) Biotop Mensch.

Chirurg 70: 845-846

Schumpelick V, Klinge U, Welty G, Klosterhafen B (1999) Meshes in der Bauchwand.

Chirurg 70: 876-887

Schumpelick V, Klinge U (2002) Zum kanzerogenen Potential von Biomaterialien in der Hernienchirurgie (Kommentar auf Anforderung der Schriftleitung).

Chirurg 73:838

Schwarting R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke L, Stein H (1986) Determination of growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67.

J Immunol Meth 90: 65-70

Shearburn EW, Myers RN (1969) Shouldice repair for inguinal hernia.

Surgery 66:450

Shulman AG, Amid PK, Lichtenstein IL (1996) The „plug“ repair of 1402 recurrent inguinal hernias. 20 year experience.

Arch Surg 125:529

Suzuki K, Watanabe M (1992) Augmented expression of HSP 72 Protein in normal human fibroblasts irradiated with ultraviolet light.

Biochem Biophys Res Commun 186:1257-64

Taylor SG, O'Dwyer PJ (1999) Chronic groin sepsis following tension-free inguinal hernioplasty.

Br J Surg 86:562-565

Trupka AW, Schweiberer L, Hallfeldt K, Waldner H (1997) Versorgung großer Bauchwandbrüche durch Fremdmaterial (Gore-Tex-Patch).

Zentralbl. Chir 122: 879-884

Usher FC, Cannon JP (1959) A new plastic mesh for replacing tissue defects, experimental study

Arch Surg 78: 131

Vermes I, Clemens H, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger CP (1994) A novel Assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.

J Immunol Meth 184: 39-51

Vestweber KH, Lepique F, Haaf F, Horatz M, Rink A (1997) Netzplastiken bei Bauchwand-Rezidivhernien – Ergebnisse.

Zentralbl. Chir 122: 885-888

Vrijland WW, Bonthuis F, Steyerberg EW, Marquet RL, Jeekel J, Bonjer HJ (2000) Peritoneal adhesion to prosthetic materials – Choice of mesh for incisional hernia repair.

Surg Endosc 14: 960-963

Weinberg DS, Maini BS (1980) Primary sarcoma of the aorta associated with a vascular prosthesis: a case report

Cancer 46:398-402

Weiss WM, Riles TS, Gouge TH, Mizrachi HH (1991) Angiosarcoma at the site of a dacron vascular prosthesis: a case report and literature review.

J Vasc Surg 14:87-91

Welch W Suhan J (1986) Cellular and Biochemical Events in mammalian Cells during and after Recovery from Physiological stress.

J of Cell Biology 103:2035-2052

Welch WJ (1992) Mammalian stress responses Cell physiology, structure/ function of stress proteins, and implications for medicine and disease.

Physiol Rev 72:1063-81

Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert KL (1999) Biomaterialien- humane Toleranz und Integration.

Chirurg 70:847-857

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amu	Atomic mass unit = $1,660538 \times 10^{-27}$ kg
APPAP	Alkaline Phosphatase and mouse monoklonal anti-alkaline Phosphatase
b.z.w.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
°C	Grad Celsius
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleidacid
ESI	Elektrospray-Ionenquelle
EU/ml	Energieumsatz pro Milliliter
FACS	Fluoreszens-aktiviertes-Laser-Durchflusszytometer
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
FT-ICR	Fourier-transform-ion-cyclotron-resonance
g/mol	Gramm pro Mol
g/m ²	Gramm pro Quadratmeter
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxymethyl)-1Piperazineethansulfonsäure
HFIB	humane Fibroblasten
HSP 70	Hitzeschockprotein 70
kV	Kilovolt
LAL	Lymulus Amöbozyten Lysat
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
m/z	Masse pro Ionenladung
MS	Massenspektrometer

μl/min	Mikroliter pro Minute
μm	Mikrometer
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NRS	nicht resterilisiert
PBS	Phosphate buffered saline
pg/ml	Pikogramm pro ml
PI	Propidiumiodid
pNA	Para-Nitro-Anilin
PTFE	Polytetrafluorethylene
RS	Resterilisiert
RT	Raumtemperatur
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
SD	Standardabweichung
Std	Stunde
Tab.	Tabelle
TAPP	Transabdominelle präperitoneale Prothese
TIPP	Transinguinale präperitoneale Prothese
TEP	Total extraperitoneale Prothese
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
U/min	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

8.1. Nährmedien, Kulturmedien und Lösungen

8.1.1. Nähr- und Kulturmedien

Einfriermedium

Komplett-Medium; 10 % FKS (Gibco BRL, Berlin) und 12 % DMSO (Sigma, USA)

FKS (Fötales Kälberserum)

FKS (Gibco BRL, Berlin), 50 min bei 56 °C hitzeinaktiviert

Komplettes Kulturmedium

450 ml RPMI-1640 (Gibco BRL, Berlin), 50 ml FKS (Gibco BRL, Berlin), 10 ml Glutamin (Gibco BRL, Berlin), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL, Berlin), 3 ml Hepes Buffer Solution (Gibco BRL, Berlin)

8.1.2. Lösungen

Die Herstellung der Lösungen erfolgte mit autoklaviertem (121 °C, 20 min) *Aqua bidest.*

Phosphate buffered saline (PBS, Gibco BRL, Berlin)

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O; 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,4

0,25% (v/v) Triton-x 100 Lösung

50 ml *Aqua bidest.*, 125 µl Triton-x 100 (Gibco BRL, Berlin)

Paraformaldehyd-Lösung

PBS (Gibco BRL, Berlin), 2 % (w/v) Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)

Staining Medium

PBS (Gibco BRL, Berlin), 1 % (v/v) FKS (Gibco BRL, Berlin)

Annexin V Binding Buffer (Apoptosis detection Kit I, Pharmingen Heidelberg)

0,1 M Hepes, pH 7,4 1,4 mM NaCl; 25 mM CaCl₂

Propidiumiodid-Lösung (Apoptosis detection Kit I, Pharmingen Heidelberg)

50 µg PI/ml PBS

8.2. Antikörper und Färbemethoden**Annexin V-FITC**

Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen Heidelberg)

APAAP Mouse Monoklonal

(Nr.: D0651, Dako Dänemark)

8.2.1. Primärantikörper**Anti-Hsp70, Human (Mouse)**

(Nr.: 386032, Calbiochem, USA)

Monoclonal Mouse Anti Human KI-67 Antigen

(Nr.: F0788, Dako, Dänemark)

8.2.2. Sekundärantikörper**FITC-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins**

(Nr.: F0313, Dako Dänemark)

8.3. Geräte

Brutschränke

Fa. Heraeus, Osterode

Durchflusszytometer

FACScan, Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Mikroskop

ZEISS Axioplan, Fa. Carl Zeiss,
Oberkochen

Rasterelektronenmikroskop

SEM 505, Fa. Philips, Eindhoven

Sterile Werkbank

Class II Typ A/B3, Fa. Naire,
Plymouth

BSB 4 A, Fa. GELAIRE Flow
Laboratories GmbH, Meckenheim

Zentrifugen

Biofuge 22R, Fa. Heraeus, Hanau
Rotanta/TR Hettich, Fa. Andreas
Hettich, Tuttlingen

Zytozentrifuge

Cytospin 2, Fa. Shandon, Pittsburgh

Massenspektrometer

Apex II, Bruker-Daltonic, Billerica,
USA

Sterilisator

Vernichtungs-Sterilisator,
Modell CS-V, Webeco, Bad Schwartau

8.4. Tabellen aller Einzelmesswerte der Durchflusszytometrie

Std	ohne Netz	NRS Netze	RS Netze		Std	ohne Netz	NRS Netze	RS Netze	
0	2,57				30	7,36	4,80	19,16	
0	2,92				30	3,85	3,76	40,89	
0	1,36				30	4,84	3,55	27,61	
0	1,80				30	2,31	5,69	24,22	
0	2,16			MW	30	7,17	7,84	21,49	
0	0,71			SD	30	3,65	13,04	20,87	
6	3,48	3,30	4,32		30	4,86	6,45	25,71	MW
6	3,96	2,91	7,16		30	2,03	3,59	8,00	SD
6	2,54	8,3	4,17		36	2,66	3,51	35,78	
6	4,08	10,04	8,76		36	2,75	3,13	39,98	
6	3,52	6,14	6,1	MW	36	2,34	10,02	40,5	
6	0,70	3,58	2,24	SD	36	4,62	16,5	43,93	
12	2,20	6,69	5,19		36	3,69	8,29	40,04	MW
12	2,16	4,63	3,93		36	1,60	6,32	3,34	SD
12	2,53	4,07	6,03		42	8,56	8,17	28,76	
12	4,68	6,15	9,97		42	7,03	8,85	28,66	
12	5,25	7,92	8,79		42	5,90	8,23	63,45	
12	3,38	5,49	6,6	MW	42	5,83	12,22	46,04	
12	1,33	1,70	2,3	SD	42		16,26		
18	8,80	7,39	19,27		42	6,83	10,75	42,50	MW
18	2,65	8,88	18,35		42	1,28	3,50	24,82	SD
18	4,26	9,68	26,48		48	16,24	25,28	38,64	
18	4,34	4,71	12,69		48	16,81	33,25	48,05	
18	5,30	7,10	18,38	MW	48	4,70	12,13	75,12	
18	2,38	2,28	5,23	SD	48	3,30	6,37	30,00	
24	5,70	10,85	23,09		48	10,26	19,26	47,95	MW
24	4,66	6,25	26,71		48	7,28	12,33	19,55	SD
24	5,66	5,86	10,94						
24	8,09	11,39	15,24						
24	7,49	5,58	15,16						
24	5,45	5,57							
24	6,18	7,58	18,23	MW					
24	1,32	2,76	6,46	SD					

Tab. 5: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Annexin V Messung

Std	ohne Netz	NRS Netz	RS Netz		Std	ohne Netz	NRS Netz	RS Netz	
0	84,50				24	89,29	77,57	82,69	
0	88,1				24	88,26	85,68	84,39	
0	85,71				24	82,68	78,4	56,26	
0	84,53				24	75,16	82,33	54,19	
0	85,71			MW	24	75,98	82,03		
0	1,69			SD	24		84,55		
					24	82,27	81,76	69,38	MW
6	85,69	85,00	94,05		24	6,62	3,24	16,38	SD
6	90,17	89,44	95,05						
6	95,82	95,46	94,04		30	87,17	70,14	71,45	
6	96,43	96,52	86,29		30	91,82	81,16	73,35	
6	92,03	91,61	92,36	MW	30	87,83	78,24	67,97	
6	5,079	5,40	4,07	SD	30	91,2	86,82	51,6	
					30	89,51	79,09	66,09	MW
12	78,58	80,60	53,9		30	2,34	6,95	9,92	SD
12	84,41	65,16	45,86						
12	88,12	83,08	58,94		36	89,56	72,95	75,3	
12	84,01	86,97	79,10		36	90,85	69,94	42,34	
12	93,45	90,03	90,70		36	72,27	87,38	62,18	
12	85,71	87,69	84,02		36	70,08	88,39	56,64	
12	86,15	91,29	87,98		36	80,69	79,67	59,12	MW
12	84,43	89,26	89,27		36	11,04	9,58	13,65	SD
12	85,61	84,26	73,72	MW					
12	4,19	8,51	17,95	SD	42	87,65	90,09	47,61	
					42	88,68	87,86	57,42	
					42	89,8	88,59	50,39	
18	81,70	75,78	55,45		42	93,75	82,74		
18	90,44	91,87	60,17		42	89,97	87,32	51,81	MW
18	79,01	85,92	71,55		42	2,67	3,19	5,06	SD
18	92,73	90,73	66,07						
18	91,26	89,28	82,94		48	87,75	81,13	51,97	
18	93,77	87,85	80,07		48	87,74	86,67	45,78	
18	89,96	86,05	79,48		48	73,28	68,67	34,33	
18	90,70		77,09		48	71,75	62,36	35,00	
18	87,70				48	80,13	74,71	41,77	MW
18	88,59	86,78	71,60	MW	48	8,82	11,15	8,59	SD
18	5,01	5,34	10,10	SD					

Tab. 6: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Ki-67 Messung

Std	ohne Netz	mit Netz		Std	ohne Netz	mit Netz	
0	97,64			30	96,74	96,26	
0	99,32			30	97,26	96,85	
0	98,4			30	96,92	96,85	
0	99,66			30	97,2	97,11	
0	99,92			30	97,16	97,76	
0	98,40			30	98,21	95,67	
0	98,89		MW	30	97,25	96,75	MW
0	0,88		SD	30	0,51	0,72	SD
6	97,36	99,10		36	97,31	95,14	
6	97,66	97,02		36	98,06	95,37	
6	98,04	98,23		36	99,09	97,33	
6	97,14	98,654		36	99,34	97,77	
6	99,16	96,89		36	97,03	98,72	
6	97,5	97,41		36	98,57	99,49	
6	97,81	97,88	MW	36	90,76	90,17	MW
6	0,66	0,91	SD	36	0,98	1,8	SD
12	97,52	98,61		42	98,32	97,84	
12	97,58	99,03		42	98,41	97,35	
12	95,43	95,60		42	97,77	97,54	
12	98,6	98,65		42	98,39	98,03	
12	99,14	99,20		42	98,76	97,28	
12	98,32	99,48		42	98,65	97,93	
12	97,77	98,43	MW	42	98,38	97,66	MW
12	1,3	1,42	SD	42	0,34	0,32	SD
18	97,45	98,10		48	98,70	99,21	
18	98,73	97,32		48	98,94	98,98	
18	96,98	97,56		48	99,85	99,65	
18	98,62	98,12		48	99,80	99,92	
18	98,91	99,1		48	98,45	98,52	
18		96,78		48	98,61	98,75	
18	97,77	98,43	MW	48	99,06	99,17	MW
18	0,87	0,80	SD	48	0,61	0,53	SD
24	99,80	99,84					
24	99,90	99,75					
24	99,80	99,81					
24	99,90	99,81					
24	99,70	99,96					
24	99,84	99,39					
24	99,82	99,76	MW				
24	0,10	0,20	SD				

Tab.7: Ergebnisse der durchflusszytometrischen HSP 70 Messungen

Std	Kontrolle	NRS	RS
48	0,49	1,86	8,75
48	0,89	1,38	9,40
48	0,75	1,99	13,75
48	1,25	1,35	8,13
MW	0,85	1,65	10,01
SD	0,32	0,33	2,55

Tab. 8: Ergebnisse der Apoptoserate der Fibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit den Lyophilisaten

9. Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. R. Broll bedanken.

Mein besonderer Dank gilt natürlich auch Herrn Prof. Dr. H.-P. Bruch, Direktor der Chirurgischen Klinik der Universität zu Lübeck, und Herrn Prof. Dr. J. Westermann, Direktor des Anatomischen Institutes der Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im chirurgischen Forschungslabor und die Benutzung des Rasterelektronenmikroskops im Anatomischen Institut.

Bei Herrn Dr. Duchrow bedanke ich mich für die geduldige, freundliche und hilfreiche Betreuung bei der Anfertigung des experimentellen Teils der Arbeit. Die interessanten Diskussionen und Ratschläge haben zu einem großen Teil zum Gelingen der Experimente beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch ausdrücklich bei PD Dr. B. Lindner aus dem Forschungszentrum Borstel für die freundliche Unterstützung und Bereitstellung des Massenspektrometers sowie bei PD Dr. T. Wedel aus dem Anatomischen Institut der Universität zu Lübeck für die tatkräftige Unterstützung, anregenden Diskussionen und die Hilfe bei der Anfertigungen der rasterelektronenmikroskopischen Bilder.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors bedanken, besonders bei Vera Grobleben, Elke Gheribi, Gisela Grosser-Pape, Regina Kaatz und Annemarie Aumüller. Ich danke Euch für die fürsorgliche Betreuung, die tatkräftige Unterstützung und das immer währende nette Arbeitsklima im chirurgischen Forschungslabor.

10. Lebenslauf

Name	Bethge
Vorname:	Tobias
Geburtsdatum:	27.12.1976
Geburtsort:	Hamm/ Westf.
Eltern:	Michael Bethge (Pfarrer) Annette Bethge geb. Flötotto (Lehrerin)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Wohnort:	Große Gröpelgrube 15-17 23552 Lübeck
Schul Ausbildung:	Von 1983 bis 1987 Wilhelm-Busch-Grundschule Hamm Von 1987 bis 1996 Märkisches Gymnasium Hamm Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	Von 1996 bis 1997 Zivildienst in der ambulanten Krankenpflege des Diakonischen Werkes Hamm
Studium der Medizin:	Von Oktober 1997 bis September 2000 Georg- August Universität Göttingen August 1999: Ärztliche Vorprüfung August 2000: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab Oktober 2000 bis voraussichtlich Juni 2004 Medizinische Universität zu Lübeck Januar 2001 Beginn der Dissertations-Arbeit im Chirurgischen Forschungslabor unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Broll März 2003: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr:	Vom 22.04.2003 bis 19.03.2004 Innere Medizin: Ostholstein-Kliniken Eutin HNO: Universität Lübeck Chirurgie: Ostholstein-Kliniken Eutin 03.05.2004: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung