

Aus der Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

---

**In-vitro Untersuchungen zum Einfluss von Kunststoffnetzen auf das  
Proliferations- und Apoptoseverhalten von humanen Monozyten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät –**

vorgelegt von  
Maren Gehrts  
aus Hamburg

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: **PD Dr. rer. nat. M. Duchrow**

2. Berichterstatterin: **PD Dr. med. E. M. Ehlers**

Tag der mündlichen Prüfung: **14.02.2006**

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.02.2006

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

*Für meine Eltern*

## **Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

- **Eingereichte Originalarbeit:**

**Gehrts M**, Schlenke P, Farke S, Bruch HP, Broll R, Duchrow M (2005): Influence of polypropylene meshes on human peripheral blood monocytes.  
*Biomaterials (submitted September 2005)*

- **Publizierte Abstracts und Vorträge:**

Broll R, **Gehrts M**, Farke S, Windhövel U, Bruch HP, Duchrow M (2004): Einfluss von Polypropylen-Netzen auf CD14-positive mononukleäre Zellen.  
*European Surgery, 36(198): 12*

Duchrow M, **Gehrts M**, Windhövel U, Farke S, Schlenke P, Bruch HP, Broll R (2004): Influence of polypropylene meshes on human peripheral blood monocytes.  
*8th Annual Meeting on Surgical Research, 27.-30. October 2004, Mannheim, Germany,*  
*Langenbecks Arch Chir 389 (5): 436-437*

- **Poster:**

Duchrow M, **Gehrts M**, Bethge T, Wedel T, Lindner B, Bruch HP, Farke S, Broll R (2004): Wirkung von Polypropylen-Netzen auf CD14 positive mononukleäre Blutzellen.  
*173. Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Greifswald, 03.-05.06.2004*

Duchrow M, **Gehrts M**, Windhövel U, Farke S, Schlenke P, Bruch HP, Broll R (2004): Wirkung von Polypropylen-Netzen auf CD14 positive mononukleäre Blutzellen.  
*81. Jahrestagung – Vereinigung der Bayrischen Chirurgen, München, 21.-23.07.2004*

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	Seite
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Biomaterialien</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Biomaterialien in der abdominalen Hernienchirurgie</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Operative Methoden in der Hernienchirurgie.....	2
1.2.2 Historische Entwicklung .....	3
1.2.3 Kunststoffnetze.....	4
<b>1.3 Fremdkörperreaktion</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 Fremdkörperreaktion und chronische Entzündung.....	7
1.3.2 Monozyten und Makrophagen.....	8
<b>1.4 Vitalitätsbestimmung mit Hilfe zellulärer Antigene</b> .....	<b>9</b>
1.4.1 CD14 – Monozyten- und Makrophagenmarker.....	9
1.4.2 Apoptose und Annexin-V.....	10
1.4.3 Ki-67 – nukleäres Protein als Marker der zellulären Proliferation .....	12
<b>1.5 Zielsetzung und Fragestellung</b> .....	<b>13</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Zellen</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Ausgangsmaterial .....	14
2.1.2 Zellseparation .....	14
2.1.3 Zellkultur.....	15
<b>2.2 Kunststoffnetze</b> .....	<b>16</b>
2.2.1 Prolene® .....	17
2.2.2 Vypro® II.....	17
<b>2.3 Versuchsaufbau</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Versuchsanordnung .....	18
2.3.2 Ernte der Zellen .....	19
<b>2.4 Zellbiologische Analyse</b> .....	<b>19</b>
2.4.1 Durchflusszytometrie .....	19
2.4.2 Zellbild .....	19
2.4.3 CD14-Doppelfärbung.....	20

---

2.4.4	Annexin-V-Färbung .....	20
2.4.5	Ki-67-Färbung.....	21
<b>2.5</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellmorphologie und Vitalitätsprüfung .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Prolene® .....</b>	<b>23</b>
3.2.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozytenzellzahl .....	23
3.2.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate.....	27
3.2.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate .....	30
<b>3.3</b>	<b>Vypro®II.....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozytenzellzahl .....	33
3.3.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate.....	35
3.3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate .....	38
<b>3.4</b>	<b>Vergleich Prolene® - Vypro®II.....</b>	<b>41</b>
3.4.1	Monozytenzellzahl .....	41
3.4.2	Apoptoserate.....	42
3.4.3	Proliferationsrate .....	43
<b>3.5</b>	<b>Autoklaviertes Prolene®-Netz.....</b>	<b>44</b>
3.5.1	Monozytenzellzahl .....	44
3.5.2	Apoptoserate.....	45
3.5.3	Proliferationsrate .....	46
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Fremdkörperreaktion und Monozyten .....</b>	<b>48</b>
4.1.1	Fremdkörperreaktion.....	48
4.1.2	Monozyten und Makrophagen.....	50
<b>4.2</b>	<b>Apoptose und Proliferation .....</b>	<b>51</b>
4.2.1	Apoptose .....	51
4.2.2	Proliferation.....	53
4.2.3	Zellhomöostase.....	55
<b>4.3</b>	<b>Vergleich verschiedener Netze .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>Autoklaviertes Prolene®-Netz.....</b>	<b>64</b>

---

<b>4.5</b>	<b>LPS</b> .....	<b>65</b>
<b>4.6</b>	<b>High-and Low-Responder</b> .....	<b>67</b>
<b>4.7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>90</b>
<b>8.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>90</b>
8.1.1	Nähr- und Kulturmedien .....	90
8.1.2	Lösungen .....	90
8.1.3	Antikörper und Färbemethoden.....	91
8.1.4	Materialien .....	92
8.1.5	Software .....	92
8.1.6	Geräte .....	92
<b>8.2</b>	<b>Färbeprotokolle</b> .....	<b>93</b>
8.2.1	Ficoll (Lymphozyten-Separation) .....	93
8.2.2	Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und CD14 .....	93
8.2.3	Ethanol-Doppelfärbung mit CD-14 und Ki-67 .....	94
<b>8.3</b>	<b>Buffy coat Identifikationsnummern</b> .....	<b>95</b>
<b>8.4</b>	<b>Datensätze</b> .....	<b>96</b>
8.4.1	Prolene® .....	96
8.4.2	Vypro®II.....	101
8.4.3	Autoklaviertes Prolene® .....	106
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>108</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Biomaterialien

Die Anwendung von implantierbaren Biomaterialien hat in den letzten Jahrzehnten in verschiedensten Bereichen der Medizin deutlich zugenommen. Es wurden immer mehr unterschiedliche „Ersatzteile“ für zerstörte oder funktionseingeschränkte Teile des menschlichen Körpers entwickelt. So helfen Biomaterialien in der Gefäß- und Herzchirurgie in Form von Herzschrittmachern, künstlichen Herzklappen, Gefäßprothesen oder Kathetern. Gelenkprothesen können zerstörte Gelenke ersetzen, Osteosynthesematerialien dienen der Ruhigstellung im Heilungsprozess und in der rekonstruktiven Chirurgie kommen z. B. implantierbare Kunststoffnetze zur Bauchwandrekonstruktion oder Kunststoff- bzw. Metall-Schädelplatten bei Kalottendefekten zum Einsatz. Abzuwägen sind dabei immer sowohl der Nutzen, als auch die Risiken der Biomaterialien. Besonders in der rekonstruktiven Chirurgie müssen die Implantate ein hohes Maß an Sicherheit erfüllen und eine lange Lebensdauer aufweisen [Pizzoferrato et al. 1985; Wintermantel et al. 1999]. Um die Eigenschaften der Biomaterialien zu klassifizieren wurden durch Pizzoferrato die Begriffe der Biofunktionalität und der Biokompatibilität geprägt, die sowohl in Tierversuchen, als auch in Zellkulturversuchen für jedes Biomaterial untersucht werden sollten [Pizzoferrato et al. 1985; Schumpelick 1999; Deligiannidis et al. 2002]. Dabei wird die Biofunktionalität durch die Funktion und Lebensdauer des Implantates bestimmt, während eine hohe Biokompatibilität durch einen möglichst geringen Effekt des Implantates auf das Gewebe sowie einen geringen Einfluss des Gewebes auf das Implantat gekennzeichnet ist. Von Pizzoferrato wurde 1985 zudem die These aufgestellt, dass der Grad der Toxizität eines Biomaterials *in vitro* oft umgekehrt proportional zur Biokompatibilität *in vivo* ist, mit der Einschränkung, dass die *in vitro* erzielten Ergebnisse nicht vollständig auf das komplexe Gewebesystem *in vivo* übertragbar sind. Vielmehr sind Vergleiche zwischen Zellkulturergebnissen mit Tierversuchen oder klinische Studien notwendig, um genaue Aussagen über die Eigenschaften der Biomaterialien zu treffen [Pizzoferrato et al 1985].

Die Methode der Zellkultur hat dabei den Vorteil einer hohen Sensitivität auf toxische Materialien und ermöglicht bei standardisierten Bedingungen, eine schnellere Untersuchung und Abstufung der zu erwartenden Toxizität. Aus diesen Gründen haben sich Versuche mit Zellkulturen als geeignete Methode erwiesen, um die Eigenschaften der Biomaterialien näher zu erforschen und zu beschreiben [Langer et al. 2005] (vgl. 4.6).

## **1.2 Biomaterialien in der abdominalen Hernienchirurgie**

### **1.2.1 Operative Methoden in der Hernienchirurgie**

Die Hernia inguinalis, der klassische Leistenbruch, ist eine v. a. bei Männern vorkommende Bruchform mit der Bruchpforte oberhalb des Leistenbandes. Für den Verschluss der Bruchlücke stehen verschiedene Operationsverfahren zur Verfügung, die alle eine Verstärkung der Hinterwand des Leistenkanals zum Ziel haben (erstes Verfahren von Bassini 1887). Das heutige Standardverfahren ist die Shouldice-Reparation, eine zweireihige Doppelung der Fascia transversalis mit zweireihiger Naht der Internusmuskulatur ans Leistenband. Als Modifikationen stehen die Operationsverfahren nach McVay/Lotheisen und bei kindlichen Leistenhernien nach Halsted-Ferguson zur Verfügung [Schumpelick et al. 1993]. Besonders in Bezug auf die Rezidivrate unterscheiden sich die verschiedenen Techniken.

Auch Narbenhernien, die meist als Folge einer Laparotomie durch Dehizens der Faszien entstehen, bedürfen der operativen Korrektur der Bauchwand. Bei den konventionellen Operationstechniken kommt nach der Stoß-auf-Stoß-Naht heute vor allem das Prinzip der Mayo-Operation, eine Doppelung der Faszie, zur Anwendung.

Bei beiden Hernienformen wird grundsätzlich zwischen diesen konventionellen Operationstechniken und der Anwendung von Fremdmaterialien zum Verschluss der Bruchlücke bzw. zur Stabilisierung der Bauchwand unterschieden.

Immer häufiger kommen heute in der Hernienchirurgie dafür Kunststoffnetze zum Einsatz. Durch den Einsatz dieser Mesh<sup>a</sup>-Plastiken konnte die Rezidivrate sowohl nach Leisten- als auch Narbenbruchoperationen von bis zu 50 % bei der Versorgung ausschließlichen durch Nähte auf weniger als 10 % gesenkt werden [Liakakos et al. 1994; Luijendijk et al. 2000;

---

<sup>a</sup> Mesh = (engl.) Netz

Langer et al. 2003]. Allerdings überwiegen bisher in Hinblick auf die Komplikationsrate die Methoden mit einer Netzimplantation (vgl. 1.2.3). Entscheidend sind zudem die Techniken, in denen die Netze angewendet werden: Bei der Narbenhernie unterscheiden sie sich hauptsächlich durch die Lage des Netzes im Verhältnis zu den Strukturen der Bauchwand: Bei der Onlay-Technik wird das Netz am Übergang zur Subkutis auf der äußeren Faszie fixiert und bildet nach dem Einwachsen eine echte integrierte Schicht. Bei der Inlay-Technik liegt das Netz zwischen den Muskelschichten und bei der Underlay- bzw. Sublay-Methode präperitoneal. Kombinationen der einzelnen Verfahren werden als „Sandwich“-Methoden bezeichnet [Vestweber et al. 1997]. Die Inlay-Technik führt zu den höchsten Rezidivquoten. In Bezug auf die Komplikationsrate lassen sich signifikante Vorteile für die Sublay-Methode im Vergleich zur Onlay-Methode nachweisen [Langer et al. 2003].

Bei Leistenhernien wird besonders bei Rezidivhernien die Versorgung nach Lichtenstein oder Stoppa durchgeführt. Dabei wird das Kunststoffnetz präperitoneal zur Verstärkung der Bauchwand spannungsfrei implantiert. Es liegt dabei entweder auf den Muskelfaszien (Operation nach Lichtenstein) oder zwischen den Muskelfaszien und dem Peritoneum (Operation nach Stoppa). Eine weitere Variante der Anwendung von Kunststoff-Netzen in der Leistenhernienreparation, die besonders in den USA Anwendung findet, ist die „Patch and Plug“-Methode nach Rutkow, bei der der Bruchsack nicht reseziert und die Bruchlücke nur durch einen vorgeformten Netzstöpsel ohne zusätzliche Fixierungsnähte verschlossen wird.

### 1.2.2 Historische Entwicklung

Der Gedanke, einen Bruchlückenverschluss mit einem künstlichen Material zu verstärken ist bereits über 150 Jahre alt. Belmas experimentierte bereits 1831 mit Schwimmblasen von Fischen um eine adhäsive Entzündung zu induzieren, Trendelenburg verwendete 1887 einen Periostlappen von der Symphyse und Rehn arbeitete mit einem Streifen der Fascia-lata. Desweiteren kamen Silberdrahtnetze, Gold, Gummischwämme sowie Stoff- und Drahtnetze zum Einsatz [Schumpelick et al. 1999a].

Im Jahre 1944 wurde zum ersten Mal die Anwendung von künstlichen Netzen in der operativen Hernienversorgung durch Aquaviva aus Marseilles in Frankreich berichtet. Er verwendete noch lange vor Newman und Lichtenstein in den USA Nylon-Netze zur spannungsfreien Reparatur. Diese ersten Versuche waren aber mit einer hohen Inzidenz von Infektionen und Fisteln behaftet und wurden aufgegeben.

Später erweckten dann zwei neue Materialien das Interesse der Hernienchirurgie: Das 1939 entwickelte und von der Firma Ethicon 1950 unter dem Handelsnamen Mersilene<sup>®</sup> eingeführte Polyesternetz und das von Francis Usher 1958 eingeführte Marlex<sup>®</sup>-Netz aus dem Butadien Polypropylen [Usher et al. 1958; Coda et al. 2003]. Im Jahre 1969 berichtete Bellis über die inguinale Meshimplantation in Lokalanästhesie. Die noch heute gängige Methode der Netzümplantation unter der Externusfaszie wurde 1986 durch Lichtenstein vorgestellt.

Zu Beginn der 90er Jahre kam für die Netze durch Ger und Bogojavalensky mit der Weiterentwicklung der laparoskopischen Operationstechniken ein neues Anwendungsgebiet hinzu und die Indikationen für die Netzümplantation stiegen, denn beim laparoskopischen Hernienverschluss ist eine Netzümplantation obligat. Außerdem entsteht durch eine Reduktion der Rezidivrate bei der Verwendung von Netzen insgesamt ein volkswirtschaftlicher Benefit [Becker et al. 2001].

Im Jahre 1999 wurden weltweit jährlich ca. 1 Million Meshes implantiert und in einigen Ländern werden bereits mehr als 60 % aller Hernien mit alloplastischem Material versorgt [Schumpelick et al. 1999a].

### 1.2.3 Kunststoffnetze

Die Anwendung von Kunststoffnetzen spielt in der modernen Hernienchirurgie eine entscheidende Rolle und ist nicht nur bei Rezidiv-Operationen aus dem klinischen Alltag heute nicht mehr wegzudenken. Die Netze dienen primär mechanisch der Verstärkung der Bauchwand. Zusätzlich induzieren die implantierten Kunststoffe die Ausbildung einer Narbenplatte („Netznarbe“), die dann zusätzlich die Stabilität der Bauchwand erhöht. Ihre Anwendung dient in mehr als 95 % der Verstärkung der Bauchwand bei Narben- und Leistenhernien oder Bindegewebserkrankungen und nur in weniger als 5 % dem Bauchwandersatz bei Defekten im Rahmen von Traumen oder radikalen Tumoroperationen [Schumpelick et al. 1999a]. Es steht heute eine große Zahl unterschiedlicher Netzmaterialien, die vorwiegend aus chirurgischen Nahtmaterialien bestehen, zur Verfügung. Dabei spielen v. a. das Polyester, das Polytetrafluorethylen (PTFE) und das Polypropylen (PP) eine Rolle. Modifikationen der Materialien beruhen dann im Wesentlichen auf der Art der verwendeten Fäden (monofil oder multifil) sowie der textilen Struktur [Peiper et al. 2002].

Viele der Komplikationen, die mit der Anwendung der Netze assoziiert sind, entstehen durch die chirurgische Präparation vor der Implantation der Netze in Sublay-Technik (vgl. 1.2.1), denn die Überlappungszone mit mindestens 5 cm bedingt große Wundareale. Häufig beschrieben werden Wundinfektionen, Serome und Hämatome, aber in seltenen Fällen auch schwerwiegendere Komplikationen. Dazu zählen postoperative Nachblutungen, Migration der Netze, Schädigungen des Ductus deferens sowie Erosionen und Perforationen der Harnblase oder des Darms mit Fistelbildung und Darmobstruktionen [DeGuzman et al. 1995; Langer et al. 2001; Welty et al. 2001]. Abhängig von den Materialien sind auch Netzschrumpfungen auf bis zu 40 % der ursprünglichen Größe beschrieben worden, wobei es sich meist nicht um eine Materialschrumpfung durch Eigenkontraktion handelt, sondern um die unvermeidliche physiologische Wundkontraktion [Schumpelick et al. 2001]. Die harte Narbenplatte führt bei fast 50 % der Patienten zu Einschränkungen der Beweglichkeit und einem Fremdkörpergefühl, einhergehend mit einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität. Viele der gebräuchlichen Netze sind überdimensioniert und führen dadurch zu den häufigen klinischen Nebenwirkungen nach der Netzimplantation in die Bauchwand. Durch optimale Materialien hingegen kann sowohl die Entzündungsaktivität, als auch die Fibrose, die intraabdominelle Adhäsionsbildung und die Zellproliferation um die Prothese herum vermindert und somit die Rate der Nebenwirkungen insgesamt deutlich reduziert werden [Schumpelick et al. 2001]. Bei der Betrachtung der ersten postoperativen Wochen konnte Bringman im Vergleich von Patienten mit implantierten leicht- und schwergewichtigen Netzen zwar keine Unterschiede in Bezug auf die Schmerzen oder die Lebensqualität nachweisen, aber in seiner Untersuchung zeigt sich eine bessere Verträglichkeit des leichtgewichtigen Netzes durch eine schneller mögliche postoperative Alltagsbelastung [Bringman et al. 2005]. In neuesten klinischen Studien konnte durch O'Dwyer außerdem eine eindeutige Abhängigkeit der Entstehung von chronischen Schmerzen vom implantierten Material dargestellt werden. Patienten, denen ein teilweise resorbierbares leichtgewichtiges Netz bei einer Hernienoperation implantiert wurde, litten nach einem Jahr signifikant um 12 % weniger an Schmerzen als Patienten, die ein nicht-resorbierbares, schwergewichtiges Netz erhalten hatten [Post et al. 2004; O'Dwyer et al. 2005]. Und auch die Art der Fixierung der Meshes hat einen Einfluss auf die Entstehung postoperativer Schmerzen. Hidalgo konnten signifikant weniger Schmerzen bei Patienten nachweisen, bei denen das Netz nicht mit einer Naht, sondern mit Fibrinkleber fixiert worden war [Hidalgo et al. 2005]. Die klinischen Vorteile der Netze liegen darin, dass besonders die Rezidivrate

von Hernien deutlich geringer, die Bauchwand schneller wieder belastbar und insgesamt die Anzahl von Komplikationen vergleichbar mit dem direkten Verschluss der Bauchwand ohne Fremdmaterialien ist [EU Hernia Trialists Collaboration 2000].

Die Komplikationen zeigen, dass die Biokompatibilität der Netze offensichtlich noch nicht optimal ist und dass über die Interaktionen der Netze mit dem umliegenden Gewebe auch im Vergleich der verschiedenen Materialien bisher nur sehr wenig bekannt ist. Es sollte daher das Ziel weiterer Forschung sein, diese Netze und ihre Eigenschaften besser zu verstehen, um möglichst biokompatible Implantate und Anwendungsmethoden entwickeln zu können (vgl. 1.1).

### **1.2.3.1 Polypropylen-Netze**

Das Polypropylen stellt das zur Zeit bevorzugte Material für die Hernienreparation dar. Die daraus hergestellten Netze bestehen überwiegend aus monofilen oder multifilen Fäden mit erheblichen Variationen der Materialmenge, der Porengröße, der Festigkeit und der Elastizität. Die monofilen Strukturen sind dabei im Vergleich zu den multifilen Geweben starrer und weniger flexibel. Die Meshes sind als sog. Gewirke konstruiert, um ein Aufribbeln beim intraoperativen Zurechtschneiden zu vermeiden.

Die Anforderungen an die synthetischen Netze sind hoch: Sie sollen physikalisch nicht durch das Gewebe verändert werden oder im Gewebe eine starke Fremdkörperreaktion auslösen, sie sollen chemisch inert, nicht karzinogen und nicht allergen sein und den mechanischen Anforderungen am Implantationsort und dem Prozess der Sterilisation gewachsen sein, ohne dass sich ihre Eigenschaften verändern [Pizzoferrato et al. 1985; Greca et al. 2001]. Unter allen verfügbaren Netzen erfüllen die Polypropylen-Netze die meisten dieser Anforderungen: Das Polypropylen erlaubt ein Wachstum von Fibroblasten, fördert die Kollagenbildung und die Angiogenese und ermöglicht einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Und auch die geringen Kosten sprechen für das Polypropylen [Hengirmen et al. 1998; Deligiannidis et al. 2002]. Heute stehen viele Variationen hinsichtlich der Faserdurchmesser, der Knot- und Webarten und der Porengröße, sowie auch Kombinationen mit anderen Materialien zur Verfügung. Am häufigsten wurden in Deutschland im Jahr 2001 das Prolene<sup>®</sup>-Netz (34 %) und das kombinierte Vypro<sup>®</sup>II-Netz (25 %) implantiert [Korenkov et al. 2002].

Das Prolene<sup>®</sup>-Netz ist ein reines Polypropylen-Netz aus dem Prolene<sup>®</sup>-Nahtmaterial und gehört zu den schwergewichtigen und feinporigen Kunststoffnetzen (vgl. 2.2.1 und Abbildung 2.3). Es galt lange Zeit als das Standardnetz in der Hernienchirurgie, bei dem aber auch gehäuft netzspezifische Nebenwirkungen wie ein Fremdkörpergefühl, Schmerzen und Serome auftreten (vgl. 4.3). Die Anforderungen für eine Optimierung der Materialeigenschaften sind eine Materialreduktion mit dennoch guter Handhabung, vergrößerte Poren und eine Minimierung der gesamten Oberfläche mit verbesserten Oberflächeneigenschaften [Scheidbach et al. 2004].

Um die Biokompatibilität in diese Richtung zu verbessern ist seit einiger Zeit ein neues Netz, das Vypro<sup>®</sup> II-Netz, auf dem Markt. Es besteht aus einem Gewirk aus Vicryl und Prolene<sup>®</sup>, wobei der Vicryl-Anteil nach 56-70 Tagen resorbiert wird. Dadurch verbleibt insgesamt 65 % weniger Fremdmaterial am Implantationsort im Vergleich zum reinen Prolene<sup>®</sup>-Netz (vgl. 2.2.2 und Abbildung 2.4).

In dieser Arbeit sollen nun diese beiden Netze mit ihren Eigenschaften und Auswirkungen auf die Monozyten näher untersucht und verglichen werden.

## **1.3 Fremdkörperreaktion**

### **1.3.1 Fremdkörperreaktion und chronische Entzündung**

Die physiologische Reaktion des Körpers auf ein unphysiologisches Material ist die Fremdkörperreaktion. Dabei handelt es sich um eine subakute und chronische entzündliche Reaktion mit einem erhöhten Zellumsatz im Bereich des Fremdmaterials. Der Fremdkörper induziert eine Entzündungsreaktion mit dem Einstrom von Makrophagen. Ihre frustrane Phagozytose der Fremdkörper führt dann zur Ausbildung von Granulationsgewebe, Fremdkörperriesenzellen und der Entstehung einer Kollagenkapsel [Klinge et al. 1999]. Im Wundexsudat persistiert dieser chronische Reiz unabhängig vom Implantationszeitraum über Jahre hinweg wobei die Monozyten und Makrophagen die dominante Zellgruppe im Implantatlager darstellen (vgl. 1.3.2). Ihre Zahl nimmt zwar im Verlauf ab, aber die Reaktion bleibt u. a. durch ihre Fusion zu Fremdkörperriesenzellen erhalten (vgl. 4.1.1).

Insgesamt ist die Qualität und Quantität der lokalen Entzündungsreaktion abhängig vom Material und insbesondere seinen physikalischen Eigenschaften. Je geringer die Gesamt-Oberfläche des Implantatmaterials, desto besser die Biokompatibilität und desto geringer

die Fremdkörperreaktion (die Zahl der Entzündungszellen), die für die klinischen Komplikationen vorwiegend verantwortlich ist (vgl. 4.1.1). Es sollte also möglichst wenig Fremdmaterial implantiert werden, um die Abwehrreaktionen des Körpers so gering wie möglich zu halten (vgl. 4.3).

Ob und in wieweit die Monozyten als zentrale Zellen dieser Reaktionen dadurch beeinflusst werden, soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

### 1.3.2 Monozyten und Makrophagen

Monozyten gehören zu einer Population von mononukleären Leukozyten, die im Knochenmark durch die Teilung von Monoblasten entstehen. Sie werden über die dichothonen Teilungsstadien der Monoblasten und Promonozyten als Monozyten in den Blutstrom ausgeschwemmt, zirkulieren intravasal mit einer Halbwertszeit von 1 - 3 Tagen und wandern von dort aus in die Zielgewebe ein. In den Zielgeweben differenzieren sich die Zellen in Makrophagen, die dann die jeweiligen gewebespezifischen Funktionen erfüllen können. Somit stellen sie ein großes systemisches Reservoir von myeloischen Vorläuferzellen dar, denn die monozytären Makrophagen haben im Vergleich zu den residenten Gewebemakrophagen kein proliferatives Potential und nur eine kurze Überlebenszeit im normalen Gleichgewicht. Ohne Stimulation verlassen sie die Gewebe wieder oder sterben vor Ort ab [Takahashi et al. 1996]. Die Entzündungsreize hingegen induzieren eine proliferative Aktivität und steigern die Viabilität der Entzündungszellen (vgl. 4.1.2). Ein starker Überlebensstimulus für die Monozyten, der schon in geringen Dosen wirksam ist, ist das LPS. Es handelt sich dabei um charakteristische Zellwandbestandteile von gram-negativen Bakterien die in den Monozyten intrazelluläre antiapoptotische Signale und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzieren. Durch Zugabe von LPS in Zellkulturansätzen kann eine bakterielle Entzündung vorgetäuscht und damit das Überleben der Monozyten *in vitro* stimuliert werden.

Die Migration der Monozyten in die Gewebe erfolgt als Antwort auf Entzündungsreize, so dass in Entzündungsregionen eine Monozytose entsteht. Die Entzündung steigert die Produktion im Knochenmark, die Monozytenfreisetzung in die Blutbahn und die gezielte Migration zum Ort der Entzündung. Die Infiltration von Exsudatmakrophagen in die Zielgewebe wird durch MCP-1 und andere Zytokine induziert, die von den Entzündungszellen produziert werden.

*In vitro* Studien haben belegt, dass diese Zellen sich auch unter Kulturbedingungen in Makrophagen und ihre gewebespezifischen Vertreter, sowie in dendritische Zellen differenzieren können. Demnach sind die Monozyten eine heterogene Gruppe von Zellen mit ähnlicher Morphologie, aber unterschiedlichen Zielaufgaben. Ihnen allen gemeinsam ist die Expression von CD11b, CD11c, CD14 und das Fehlen von Oberflächenmerkmalen anderer Leukozyten, wie den B-, T- und NK-Zellen [Geissmann et al. 2003]. Die gezielte Definition der Monozyten erfolgt in flow-zytometrischen Untersuchungen durch die fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper gegen die Oberflächenmerkmale CD14 und CD16. Wichtig bei allen Untersuchungen mit Monozyten ist, dass die Zellen möglichst wenig manipuliert werden, um einen Zell- oder Antigenverlust oder eventuelle Induktionen der Zellen zu vermeiden [Ziegler-Heitbrock 2000].

## **1.4 Vitalitätsbestimmung mit Hilfe zellulärer Antigene**

Aus einem Gemisch von in Flüssigkeit suspendierten Zellen kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Differenzierung der Zellen erfolgen. Rein physikalische Eigenschaften der Zellen wie die Zellgröße und die innere Struktur der Zellen, also ihre Granularität, können direkt bestimmt werden (vgl. Abbildung 3.1). Durch die zusätzliche Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen können sehr spezifische Aussagen über das Zellgemisch getroffen werden und mit modernen Geräten können simultan bis zu 11 unterschiedliche Parameter pro einzeln gemessener Zelle aufgezeichnet werden.

### **1.4.1 CD14 – Monozyten- und Makrophagenmarker**

Das CD14-Protein ist ein 55 kDa Glykoprotein, das an der Zellmembran mit einem Phosphatidylinositol-Glykan verankert ist. Dieser mobile Rezeptor der Zelloberfläche und Differenzierungsmarker wird häufig in der Flow-Cytometrie als Monozyten- und Makrophagenmarker verwendet. Früheste myelomonocytaire Stammzellen sind noch CD14-negativ, aber die primären reifen Blutmonozyten und die aus den Monozyten entstandenen Makrophagen haben eine hohe CD14-Expression. Verschiedene humane und murine monoklonale Antikörper erkennen das membranständige CD14-Molekül, wobei die murinen Anti-CD14 Antikörper an drei bis vier Epitope des Moleküls binden.

Das CD14-Protein der Monozyten dient als Bindungsprotein für LBP-LPS-Komplexe und vermittelt somit zwei wichtige Funktionen der zellulären Abwehr. Zum einen wirkt es als Opsonin<sup>b</sup> und sorgt so für die Beseitigung gram-negativer Pathogene. Zum anderen wirkt es als Promoter der sekretorischen Antwort auf das LPS und bewirkt somit eine Steigerung der Sensitivität des Immunsystems gegenüber Infektionen [Ziegler-Heitbrock und Ulevitch 1993; Wright et al. 1990].

### 1.4.2 Apoptose und Annexin-V

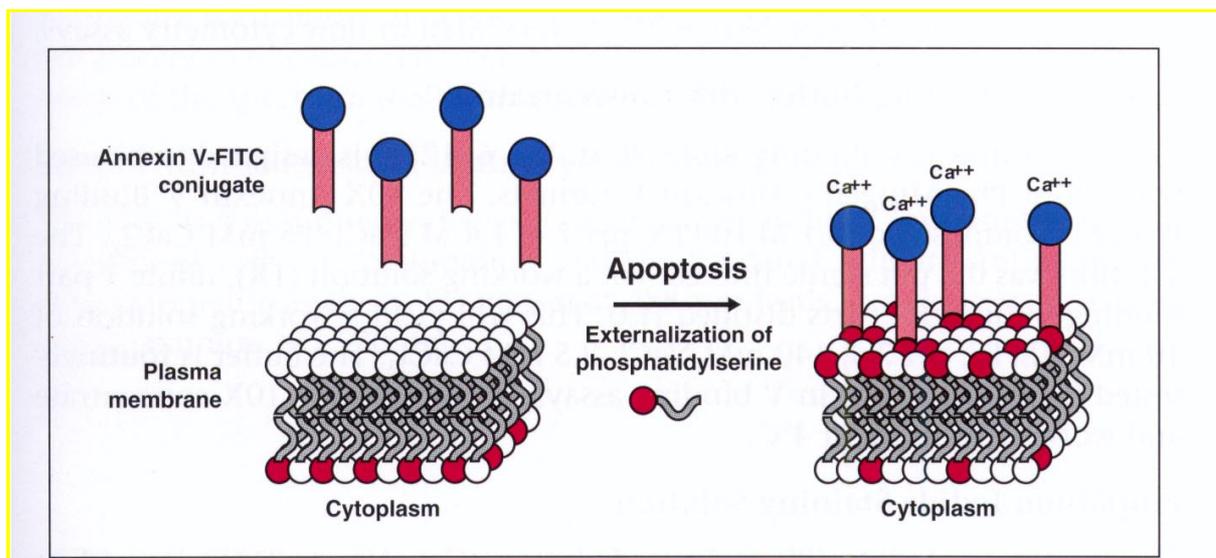
Bei der Apoptose, dem sogenannten programmierten Zelltod, handelt es sich um einen physiologischen Zelluntergang, der durch genetische Informationen der betroffenen Zellen selbst reguliert wird. Sie ist die Grundlage einer geregelten Embryogenese, der Gewebemöostase und der Funktionen des Immunsystems [Pschyrembel 1998]. Morphologisch bedeutet die Apoptose, dass nur ausgewählte individuelle Zellen in einem ansonsten gesunden Organ absterben. Zunächst kommt es zu einer Schrumpfung des Zellkerns, kurz danach zum Zerfall der Plasmamembran und schließlich zur Auflösung der Zelle. Die DNA der Zellen wird rasch abgebaut und ihre Bruchstücke entsprechen den Nucleosomen-assoziierten DNA-Teilen. Die Zellreste werden von Makrophagen der Umgebung aufgenommen und es kommt im Gegensatz zur Zellnekrose, bei der meist mehrere Zellen eines Organs betroffen sind, nicht zu einer Entzündungsreaktion oder zur Antikörperbildung. Biochemisch ist die Apoptose ein induzierbarer, energieabhängiger Vorgang mit gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese.

Verschiedenste Mechanismen sind bekannt, die eine Apoptose auslösen können. Allen gemeinsam ist die Aktivierung einer spezifischen Endonuclease über ein jeweils zellspezifisches Signal. Diese führt zur Chromatin-Fragmentierung der DNA und löst somit den Zelltod aus [Löffler und Petrides 1998]. Sehr früh wird in den apoptotischen Zellen das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Schicht der Plasmamembran transloziert, so dass PS auf der äußeren Zelloberfläche exprimiert wird. Dieses kann man sich laborchemisch zur Identifizierung von in Apoptose befindlichen Zellen zu Nutze machen (vgl. Abbildung 1.1):

---

<sup>b</sup> Opsonin: Bezeichnung für Plasmabestandteile, die durch Anlagerung an körperfremde antigene Substanzen und Mikroorganismen (Opsonisierung) deren Elimination durch Phagozytose begünstigen. [Pschyrembel 1998]

Das Annexin-V ist ein 35-36 kDa großes,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Bindungsprotein, das an negativ geladene Phospholipide ( $K_d$  von  $\sim 5 \times 10^{-2}$ ) bindet, wobei eine besonders hohe Affinität zum PS im Vergleich zu anderen Phospholipiden besteht. Dadurch erfolgt eine Bindung bevorzugt an Zellen mit exprimiertem PS. Das Annexin-V kann mit fluorochromen Farbstoffen, wie z. B. dem Propidium Iodid (PI) kombiniert werden, um lebende von toten Zellen zu differenzieren. Dadurch wird die hohe Affinität des Annexins für das PS nicht beeinträchtigt und es ergibt sich dadurch eine sensitive flow-cytometrische Untersuchungsmethode für Zellen in einem sehr frühen Stadium der Apoptose. Die Annexin-V-Färbung kann quantitativ den Anteil apoptotischer Zellen in einem wesentlich früheren Stadium identifizieren, als Färbemethoden, die einen Verlust der Membranintegrität der Zellen voraussetzen. Dieser tritt erst in einem sehr viel späteren Stadium des Zelltodes und sowohl bei apoptotischen als auch nekrotischen Zellen auf (vgl. Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Annexin-V-Färbung**

Annexin-V kann nicht an gesunde Zellen binden, da die Phosphatidylserine auf der Innenseite der Membran lokalisiert sind. Erst in der frühen Apoptose kehren sich die Phosphatidylserine nach außen um und Annexin-V kann in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  an das Phospholipid binden.

(Quelle: BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)

Die Kombination mit Propidium Iodid ermöglicht eine Identifizierung der Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose: Lebende Zellen sind sowohl Annexin-V als auch PI negativ, Zellen in einem frühen Stadium des programmierten Zelltods sind Annexin-V positiv und PI negativ und Zellen in einem späten Apoptosestadium oder bereits tote Zellen sind sowohl Annexin-V als auch PI positiv. In vielen Fällen kann im zeitlichen Verlauf eine Veränderung der Färbereigenschaften der untersuchten Zellen beobachtet werden, was als deutlicher Hinweis für eine stattfindende Apoptose zu werten ist [BD Pharmingen, Heidelberg, Annexin V-FITC apoptosis detection kit I, Produkt-information, 2001].

### **1.4.3 Ki-67 – nukleäres Protein als Marker der zellulären Proliferation**

Die monoklonalen Antikörper Ki-67 und MIB-1 binden selektiv an das humane nukleäre Antigen pKi-67, das streng mit der Zellproliferation assoziiert ist. Es ist nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus, also in der G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase nachweisbar, nicht aber in ruhenden Zellen, also in der G<sub>0</sub>-Phase [Gerdes et al. 1984]. Mit Hilfe dieses indirekt mit Fluorescein-konjugierten Antikörpers können mitotisch aktive Zellen aller Zelllinien markiert werden, und er spielt somit nicht zuletzt auch in der Tumordifferenzierung und der individuellen Prognostik von Neoplasien eine wichtige Rolle [Schlüter et al. 1993]. Damit der FITC-konjugierte Antikörper an sein nukleäres Antigen binden kann, ist eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran der zu untersuchenden Zellen notwendig. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann dann der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtzellpopulation bestimmt werden. Um die Zielzellen noch spezifischer und genauer zu identifizieren, sind Doppelmarkierungen mit anderen Farbstoffen möglich [Schwartz et al. 1986]. Lediglich die Methode der Fixierung und Permeabilisierung muss dabei auf die jeweilige Zellkultur bzw. Markerkombination abgestimmt werden.

## 1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Kunststoffnetze aus Polypropylen werden seit Jahrzehnten in der Hernienchirurgie erfolgreich eingesetzt. Dadurch konnte vor allem die Rezidivrate deutlich gesenkt werden, aber es entstanden auch neue, netzspezifische Komplikationen, die in zahlreichen Studien untersucht wurden. Diese deuten darauf hin, dass die Biokompatibilität, also die Oberflächen- und Strukturkompatibilität der Netze, noch nicht optimal bzw. verbesserungswürdig ist [Wintermantel et al. 1999]. In vorangegangenen *in-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass das Polypropylen in Fibroblasten keinen wesentlichen Einfluss auf deren Proliferation hat, wohl aber auf die Apoptoserate, die im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant in der Netzgruppe angestiegen ist [Duchrow et al. 2002]. In neueren Studien häufen sich die Ergebnisse, dass nicht das Material an sich die Ursache der Probleme ist, sondern vielmehr die Struktur des Biomaterials [Hoppert et al. 1992; Kirkpatrick et al. 2000; Matthews et al. 2000].

Wie genau aber der Körper auf zellulärer und molekularer Ebene auf die implantierten Fremdstoffe reagiert, ist weiterhin weitgehend unklar. Besonders die Reaktionen des Immunsystems sind bisher nur sehr lückenhaft beschrieben. Ziel dieser Untersuchungen ist es nun, die Reaktionen der Monozyten auf den Kontakt mit zwei unterschiedlichen Kunststoffnetzen in einer *in-vitro*-Studie zu untersuchen und zu vergleichen. Monozyten und daraus hervorgegangene Makrophagen spielen als immunkompetente Zellen bei der Fremdkörperreaktion gegen Kunststoffnetze eine zentrale Rolle. Sie synthetisieren Zytokine, die für die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle einnehmen. Besonders die proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-10 sind dabei nach Inkubation mit den Kunststoffnetzen *in vitro* signifikant erhöht [Schachtrupp et al. 2003].

In wieweit die Kunststoffnetze einen Einfluss auf die relative Anzahl, die Apoptoserate und die Proliferation der Monozyten im Gemisch der inkubierten PBMNCs haben, war die Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellen

Die Untersuchungen wurden mit humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMNCs) von freiwilligen Blutspendern durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Protokolle sind im Anhang (vgl. 8.1 und 8.2) aufgelistet.

#### 2.1.1 Ausgangsmaterial

Ausgangsmaterial der Versuche waren *buffy coats* gesunder Blutspender, die wir dankenswerter Weise von der Blutspendezentrale der Universität zu Lübeck erhalten haben. Die *buffy coats* wären sonst routinemässig verworfen worden.

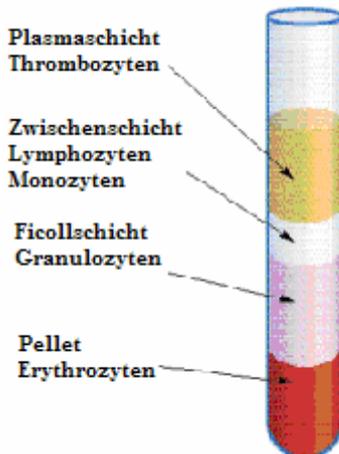
Als *buffy coat* bezeichnet man den festen grauroten Bestandteil des Blutes, der sich nach Zentrifugation zwischen den beiden Fraktionen Plasma und Erythrozytenkonzentrat befindet und überwiegend aus Leukozyten und Thrombozyten besteht.

In beiden Versuchsgruppen wurden jeweils die *buffy coats* von 10 gesunden Spendern für die Untersuchungen verwendet, deren Daten über das Alter und Geschlecht anonymisiert vorlagen (vgl. 8.3). In der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe (vgl. 2.2.1) lag der Altersrange zwischen 19 und 65 Jahren mit einem Median von 55 Jahren und einer Geschlechterverteilung von männlich : weiblich von 7 : 3. Bei den Probenansätzen der Vypro<sup>®</sup>II-Gruppe (vgl. 2.2.2) lag der Altersrange zwischen 25 und 64 Jahren mit einem Median von 43 Jahren und einem Geschlechterverhältnis von männlich : weiblich von 6 : 4.

#### 2.1.2 Zellseparation

Um dieses Zellgemisch des *buffy coats* weiter zu separieren, wurde das Prinzip der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Lymphozyten Separations Medium LSM 1007, Nr. J15-004, PAA Laboratories) angewendet (vgl. 8.2.1). Damit können Zellen unterschiedlicher Dichte und Größe durch Zentrifugation im Ficoll-Isopaque-Gradienten mit einem spezifischen Gewicht von 1,077 g/ml fraktioniert werden. Erythrozyten und Granulozyten passieren aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichtes den Gradienten und sedimentieren auf den Boden des Röhrchens, wobei die Erythrozyten das Pellet bilden

(vgl. Abbildung 2.1). Lymphozyten und Monozyten hingegen sammeln sich aufgrund ihres spezifischen Gewichtes  $< 1,077 \text{ g/ml}$  an der Plasma-Gradientenphase, wo sie mit Hilfe einer Pasteurpipette zur weiteren Verarbeitung gewonnen werden, während die Thrombozyten in der Plasmaphase verbleiben.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**  
(Quelle: PAA Laboratories, Produktinformation)

Das Ficoll ist ein hochpolymerer Zucker, der eine Agglutination der Erythrozyten bewirkt und damit noch zu einer Sedimentationsbeschleunigung führt. Für die Dichte des Trennmediums ist das Röntgenkontrastmittel Isopaque verantwortlich. Vor der weiteren Verarbeitung der gewonnenen Zellpopulation wurde diese zweimal gewaschen, um verbliebene Reste der Ficollösung zu entfernen [Produktinformation, Lymphozyten Separations Medium LSM 1077, PAA Laboratories; Wegener und Müller-Eckhardt 1998].

### 2.1.3 Zellkultur

Die isolierten Zellen wurden in RPMI 1640 „Kulturmedium without L-Glutamine“ (Fa. Gibco Invitrogen corporation, Nr. 31870-025, 500 ml) resuspendiert und in einer Konzentration von 1 Million Zellen pro Vertiefung in eine 12-Lochplatte (Cellstar<sup>®</sup>, TC-Plate, 12-well,  $\varnothing$  22 mm, sterile with lid, Nr. 665 180, Fa. Greiner bio-one, Solingen) eingesät, die entsprechend der Versuchsanordnung z. T. noch einen Netzzuschnitt oder LPS enthielt (vgl. 2.3.1). Die Kulturplatte wurde für bis zu 96 h bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer wassergesättigten und mit 5 %  $\text{CO}_2$  begasten Atmosphäre in einem Feucht-Brutschrank ( $\text{CO}_2$ -Auto-Zero, Fa. Heraeus, Osterode) inkubiert.

Mittels der Trypanblau-Färbung erfolgte vor dem Einsäen der Zellen eine Überprüfung der Vitalität und die Bestimmung der Zellzahl. Dafür wurden in einem Eppendorfgefäß 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (Trypan blue solution 0,4 %, Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA) vermischt und in einer Zählkammer (Typ Neubauer, Fa. Brand, Ludwigshafen) mikroskopisch ausgezählt und daraus dann die Zellkonzentration errechnet. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Es dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell.

Die ersten Färbungen und Messungen der Zellen wurden nach 24 h Inkubationszeit durchgeführt, als in allen Vertiefungen eine homogene Zellschicht sichtbar war. Die weiteren Versuche wurden dann 48 h, 72 h und 96 h nach der Aussaat der Zellen durchgeführt.

Zu jedem Zeitpunkt der Untersuchungen wurden die Zellkulturplatten mikroskopisch (Axiovert 10, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) auf Wachstum und Verunreinigungen kontrolliert.

## 2.2 Kunststoffnetze

Es wurden implantierbare Polypropylen-Netze der Firma Ethicon (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet.

Unter sterilen Bedingungen wurden die Netze auf die Größe der Kavitäten der 12-Lochplatten passend zugeschnitten (vgl. Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Versuchsaufbau**

**Eine 12-Lochplatte mit den Netzzuschnitten**

### 2.2.1 Prolene®

Die Prolene®-Netze bestehen aus nichtresorbierbaren Monofilamenten eines isotaktischen kristallinen Polypropylens mit der Formel  $(C_3H_6)_n$  und sind von der Zusammensetzung her identisch mit dem Prolene® Nahtmaterial. Die Dicke des ungefärbten Netzes beträgt ca. 0,55 mm mit einem Flächengewicht von 100 g/m<sup>2</sup>. Damit gehört das Prolene®-Netz zu den schwergewichtigen Kunststoffnetzen und mit einer Porengröße von 0,8 mm zu den feinporigen Netzen. Das Material ist sehr haltbar sowohl in Bezug auf seine Reißfestigkeit als auch auf seine Stabilität, mit einer Berstfestigkeit von ca. 14 kg/cm<sup>2</sup> (vgl. Abbildung 2.3).

Einige der Netzzuschnitte wurden nach dem Zuschnitt bei 121 °C im Dampfautoklaven resterilisiert (vgl. 3.5).

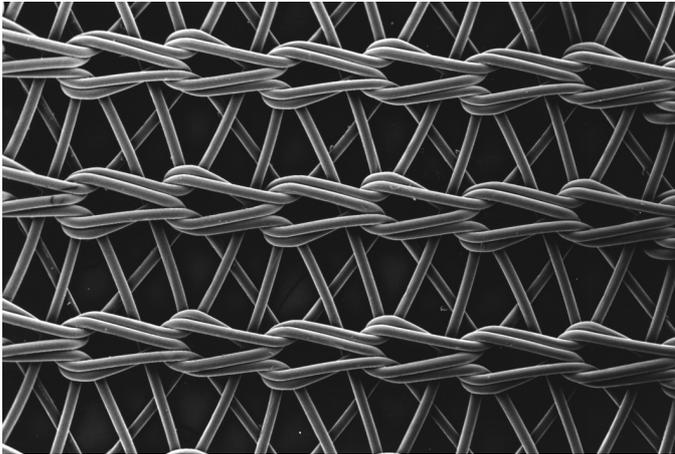


Abbildung 2.3: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Struktur des Prolene®-Netzes (aus: Bethge, 2004)

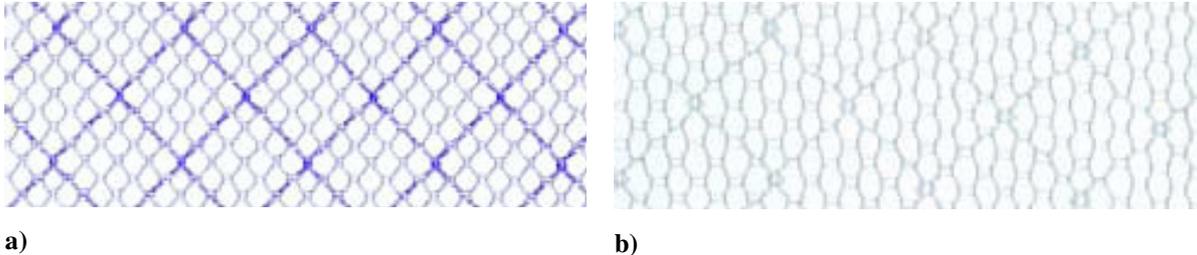
### 2.2.2 Vypro® II

Die Vypro® II-Netze bestehen zu annähernd gleichen Anteilen aus resorbierbarem Vicryl<sup>®c</sup> und aus nicht resorbierbarem Prolene®. Der Vicryl<sup>®</sup>-Anteil wird in 56-70 Tagen nach der Implantation hydrolytisch in Glycol- und Milchsäuren gespalten, diese werden vom Gewebe absorbiert und vom Organismus metabolisiert. Dabei kommt es zunächst zu einem Verlust der Reißfestigkeit und später zu einem Massenverlust [Produktinformation, Vicryl (Polyglactin 910) und Vypro® II-Netz, Ethicon, Inc. Somerville, New Jersey, USA]. Der Prolene®-Anteil bietet anschließend dauerhafte Stabilität, nach der frühen Phase der

---

<sup>c</sup> Vicryl<sup>®</sup> ist der Handelsname für Polyglactin 910, ein Copolymer aus 90 % Glycolid und 10 % L-Lactide und kommt als synthetisches absorbierbares chirurgisches Nahtmaterial zum Einsatz.

Wundheilung verbleibt aber im Vergleich zum Prolene<sup>®</sup>-Netz insgesamt 65 % weniger Fremdmaterial am Implantationsort (vgl. Abbildung 2.4). Im Vergleich zum Prolene<sup>®</sup>-Netz ist das Flächengewicht auf 35 g/m<sup>2</sup> reduziert, bei einer Faserdicke von 0,5 mm und einer Maschengröße von 5 mm.



**Abbildung 2.4: Netzstrukturen des Vypro<sup>®</sup> II –Netzes bei der Implantation und nach der Resorption des Vicryl<sup>®</sup>-Anteils**

a) Vypro<sup>®</sup> II-Netz

b) verbleibendes leichtgewichtiges Prolene<sup>®</sup>-Netz nach Resorption des Vicryl<sup>®</sup>-Anteils  
(aus: Ethicon, Inc., Produktinformation, 2000)

## 2.3 Versuchsaufbau

Alle verwendeten Geräte, Puffer, Reagenzien und Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

### 2.3.1 Versuchsanordnung

Die isolierten Zellen wurden, wie in 2.1.3 erwähnt, in 12-Lochplatten eingesetzt. Insgesamt wurden mit den Zellen eines Spenders 12 Kavitäten eingesät. Es wurden jeweils 4 identische Ansätze zum Ernten nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h angefertigt. In der ersten Kavität befand sich je ein Zuschnitt eines Prolene<sup>®</sup>- bzw. Vypro<sup>®</sup> II-Netzes. Die zweite Kavität enthielt 1 µg Lipopolysaccharid (LPS) als Stimulationsmedium und in einem dritten Ansatz wurden die Zellen ohne jeglichen Zusatz als Kontrolle untersucht (vgl. Abbildung 2.2).

### 2.3.2 Ernte der Zellen

Nach einer mikroskopischen Wachstumskontrolle wurden die Zellen aus den Kavitäten mit Hilfe einer Pipette abgeerntet, mit 1 ml PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Suspension war dann das Ausgangsmaterial der verschiedenen Untersuchungen und Färbungen (vgl. 2.4.2, 2.4.3 und 2.4.4).

## 2.4 Zellbiologische Analyse

### 2.4.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann spezifisch und sensitiv die Ausprägung zellulärer Eigenschaften einzelner Zellen bezüglich Granularität und Größe sowie ihr Färbeverhalten untersucht werden: Die inkubierten Zellen wurden dazu mit fluorochromen Farbstoffen wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und/oder Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP), markierten monoklonalen Antikörpern gegen die zu untersuchenden Zellmerkmale inkubiert. Im Durchflusszytometer (FACScan<sup>®</sup>; BD Biosciences, Heidelberg) konnte dann anhand des von den Farbstoffen jeweils ausgesendeten Fluoreszenzlichtimpulses der Anteil an Zellen ermittelt werden, welcher für die untersuchten Merkmale positiv ist. Durch Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe, deren Emissionsspektren weit auseinander liegen (FITC 525 nm, PerCP 680 nm), sind Mehrfachfärbungen möglich und es kommt nicht zu einer Überlappung der Frequenzen. Wir verwendeten den Annexin-V-FITC- sowie den CD14-PerCP-Antikörper als Marker für Bestandteile der Zelloberfläche und den FITC- Ki-67-Antikörper als Marker für ein intrazelluläres Protein, das streng mit der Zellproliferation assoziiert ist. Die Messung und Berechnung der Indizes erfolgte durch die Software CellQuest<sup>®</sup> (Version 3.2, Fa. BD Biosciences, Heidelberg).

### 2.4.2 Zellbild

Die geernteten Zellen (siehe 2.3.2) wurden in PBS gewaschen, dann in PBS gelöst und für die verschiedenen Messungen aufgeteilt. Zur Analyse des Zellbildes wurden die Zellen zusätzlich mit FACS-Diluid (Diluid, Azide Free, 201, Nr. N31032, Fa. JT Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) verdünnt und direkt am FACScan<sup>®</sup> ohne Zugabe von spezifischen Antikörpern gemessen. Das FACScan<sup>®</sup> wurde nach Angaben des Herstellers geeicht und entsprechend zur optischen Darstellung eingestellt. Die Daten wurden mit dem

Programm CellQuest<sup>®</sup> aufgezeichnet und ausgewertet. Die mononukleären Zellen wurden anhand ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) von den Granulozyten und Lymphozyten unterschieden (vgl. Abbildung 3.1).

### 2.4.3 CD14-Doppelfärbung

Um aus dem vorhandenen Zellgemisch spezifisch die Veränderungen in Bezug auf Proliferation und Apoptose der Monozyten zu erfassen, erfolgte in beiden Fällen eine Doppelfärbung einerseits mit dem CD14-PerCP-Antikörper (Nr. 345786, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) zur Markierung der Monozyten am LPS-Rezeptor sowie andererseits mit dem FITC-markiertem Annexin-V (siehe 2.4.4) bzw. dem FITC-markiertem Antikörper gegen Ki-67 (siehe 2.4.5).

### 2.4.4 Annexin-V-Färbung

Die isolierten Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, um den Anteil des löslichen CD14 zu entfernen und in einprozentigem Binding Buffer resuspendiert. 100 µl der Suspension (ca.  $1 \times 10^5$  Zellen) wurden dann für die Färbung verwendet.

Zur Identifizierung apoptotischer Zellen wurde das Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit (Nr. 556547, BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) verwendet. Zusätzlich dazu wurden alle Proben mit dem CD14-PerCP-Antikörper versetzt (vgl. 8.2.2). Nach einer Inkubationszeit von 15-30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Proben am FACScan<sup>®</sup> (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen (vgl. Abbildung 3.3 und Abbildung 3.8).

Die vom Hersteller empfohlene zusätzliche Anfärbung mit Propidium Iodid führte zu leichten Interferenzen mit der Fluoreszenz 1 (FL 1) und der Fluoreszenz 3 (FL 3). Da aber nur sehr wenige Zellen der Proben PI positiv waren, lassen sich diese bei der Messung vernachlässigen, so dass wir von einer weiteren Färbung mit Propidium Iodid absahen.

Der Apoptoseindex wurde in Prozent (%) als Anteil der gefärbten Zellen im Zellgemisch angegeben.

### 2.4.5 Ki-67-Färbung

Die Zellen (je  $5 \cdot 10^5$ ) wurden in PBS resuspendiert und die Suspension mit 0,1 % Natriumazid in PBS gewaschen, um auch hier lösliches CD14 zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls mit dem CD14-PerCP-Antikörper für 30 min im Dunkeln inkubiert. Mit staining buffer (2 % FKS in PBS mit 0,1 % Natriumazid) und 0,1 % Natriumazid in PBS wurde überschüssiger Antikörper ausgewaschen. Das Zellpellet wurde sodann in 50 % FKS in PBS mit 0,1 % Natriumazid gelöst und unter ständigem Schütteln wurde tropfenweise 70 % Ethanol in ddH<sub>2</sub>O hinzugefügt. Dann wurde die Zelllösung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der Alkohol wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,1 % Natriumazid in PBS ausgewaschen und die Zellen mit FITC-konjugiertem monoklonalen Mäuse anti-humanem Ki-67Antigen (= MIB1) (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark, Nr. F 0788) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde mit 0,1 % Natriumazid in PBS ausgewaschen (vgl. 8.2.3).

Die markierten Zellen wurden in FACS-Diluid resuspendiert, am FACScan<sup>®</sup> gemessen (vgl. Abbildung 3.5 und Abbildung 3.10) und der Proliferationsindex in Prozent (%) als Anteil der gefärbten an allen Zellkernen angegeben.

## 2.5 Statistik

Die erhobenen Datensätze, die die Grundlage für die statistischen Berechnungen darstellen, sind im Anhang (vgl. 8.4) aufgeführt.

Die Ergebnisse wurden als Mediane angegeben und die Daten als Boxplots<sup>d</sup> (vgl. z.B. Abbildung 3.2) mit Hilfe des Programms SPSS<sup>e</sup> für Windows Version 11.5.1 (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA) graphisch dargestellt.

Um die verschiedenen Gruppen zu unterscheiden, wurde für die verbundenen Proben (Vergleich zwischen verschiedenen Zeitpunkten eines Ansatzes) der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen und für die unabhängigen Stichproben zum Gruppenvergleich der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  galt dabei als statistisch signifikant.

Die Statistik wurde mit Hilfe des Programms SPSS für Windows Version 11.5.1 (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt.

---

<sup>d</sup> **Boxplot:** Ein auf John W. Tukey zurückgehendes Diagramm zur graphischen Charakterisierung einer Verteilung. Es ist eine Darstellung, die die Form der Verteilung, den Median und die Variabilität der Variablen darstellt. Es besteht aus einer „Box“, deren unterer bzw. oberer Rand durch den Wert des ersten (25. Perzentile) bzw. des dritten Quartils (75. Perzentile) beschrieben wird; innerhalb der Box wird die Lage des Medians durch eine Linie angegeben. Unter- und oberhalb der Box zeigen die „Whiskers“ (Barthaare) die Ausbreitung der übrigen Datenpunkte bis zu einem Abstand von maximal 1,5 Interquartilsabständen. Sofern es Datenpunkte gibt, die weiter weg von den Grenzen der Box liegen, werden diese als „Ausreißer“ eigens ausgewiesen (o); besonders weit entfernt liegende Datenpunkte werden als Extremwerte besonders gekennzeichnet (\*).

<sup>e</sup> **SPSS** = Statistical Package for the Social Sciences

## **3 Ergebnisse**

### ***3.1 Zellmorphologie und Vitalitätsprüfung***

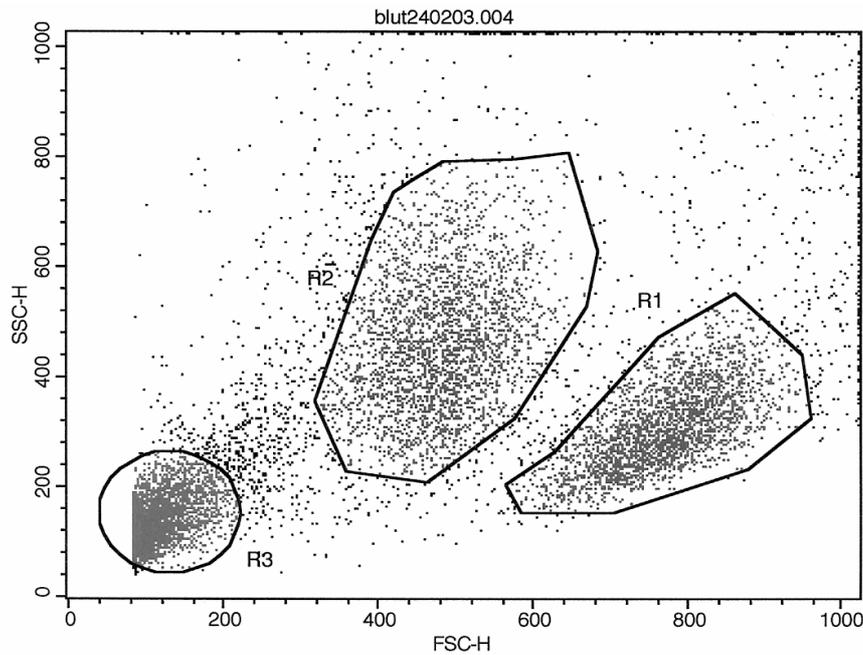
Zu Beginn jeder Untersuchungsreihe wurde mikroskopisch das Wachstum der PBMNCs kontrolliert. Dabei bot sich das Bild homogener, kugeliger Zellen, die im Medium frei beweglich waren. Lichtmikroskopisch ließen sich keine Adhäsionen der Zellen an die Fasern des Netzgewebes oder die Kulturplatten nachweisen. Über den Zeitraum von insgesamt 96 h änderte sich die Morphologie der PBMNCs hin zu abgerundeten, abgeflachten und länglich ausgezogenen Zellen, deren Größe und Granularität leicht zunahm.

Die regelmäßig überprüfte Vitalität der geernteten Zellen mit Hilfe der Trypanblau-Färbung (vgl. 2.1.3) ergab kontinuierlich Werte über 98 %.

### ***3.2 Prolene<sup>®</sup>***

#### **3.2.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozytenzellzahl**

Die Monozyten- und Makrophagenfraktion lässt sich am FACScan<sup>®</sup> bei einer Messung der ungefärbten Zellsuspension anhand von ihrer Größe und Granularität (vgl. 2.4.1) eindeutig darstellen (vgl. Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Beispiel der FACS-Analyse der Monozytenfraktion**  
**R1: Monozyten, R2: Granulozyten, R3: Lymphozyten**

Der Vergleich der Ansatzgruppen wurde mittels Boxplot (vgl. Abbildung 3.2) dargestellt, da eine starke Streuung der Messwerte aus den verschiedenen buffy coats vorliegt und so die Verteilung, der Median (vgl. Tabelle 3.1), der Interquartilenbereich und mögliche Ausreißer besser veranschaulicht werden können (vgl. 2.5, Legende Abbildung 3.2 und Anhang 8.4).

	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>Netz</b>	44,4	37,0	29,6	25,8
<b>LPS</b>	47,2	52,3	48,6	46,9
<b>Kontrolle</b>	45,2	41,9	39,1	40,1

**Tabelle 3.1: Mediane der Monozytenzellzahlen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten**

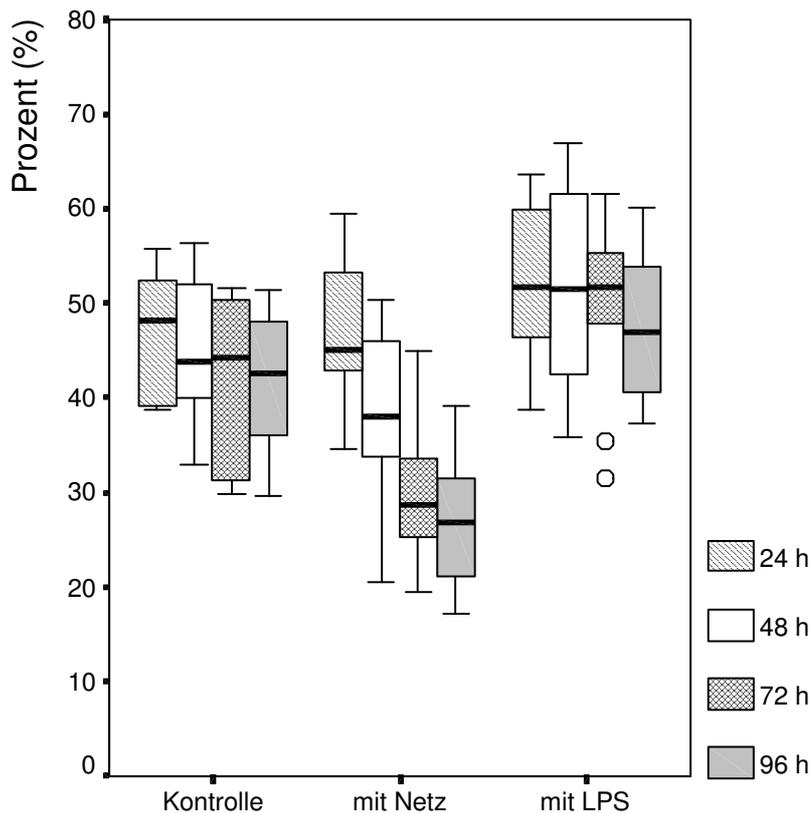


Abbildung 3.2: Graphische Darstellung als Box-plot zum Vergleich der Monozytenzellzahlen der Prolene®-Netzgruppe mit der Positivkontrolle (LPS-stimuliert) und der Negativkontrolle.

Mittlerer Balken = Median, Kasten (box) = 25er/75er-Perzentile (Quartile), Begrenzung = Datenbereich, o, \* = Ausreißer

signifikante Unterschiede:

- Kontrolle (24h) / Kontrolle (96h)  $P = 0,010$
- mit Netz (24h) / mit Netz (96h)  $P = 0,003$
- mit Netz (24h) / mit LPS (24h)  $P = 0,015$
- mit Netz (48h) / mit LPS (48h)  $P < 0,0005$
- mit Netz (72h) / mit LPS (72h)  $P < 0,0005$
- mit Netz (96h) / mit LPS (96h)  $P < 0,0005$
- mit Netz (48h) / Kontrolle (48h)  $P = 0,024$
- mit Netz (72h) / Kontrolle (72h)  $P < 0,0005$
- mit Netz (96h) / Kontrolle (96h)  $P < 0,0005$
- mit LPS (24h) / Kontrolle (24h)  $P = 0,028$
- mit LPS (48h) / Kontrolle (48h)  $P = 0,003$
- mit LPS (72h) / Kontrolle (72h)  $P < 0,0005$
- mit LPS (96h) / Kontrolle (96h)  $P < 0,0005$

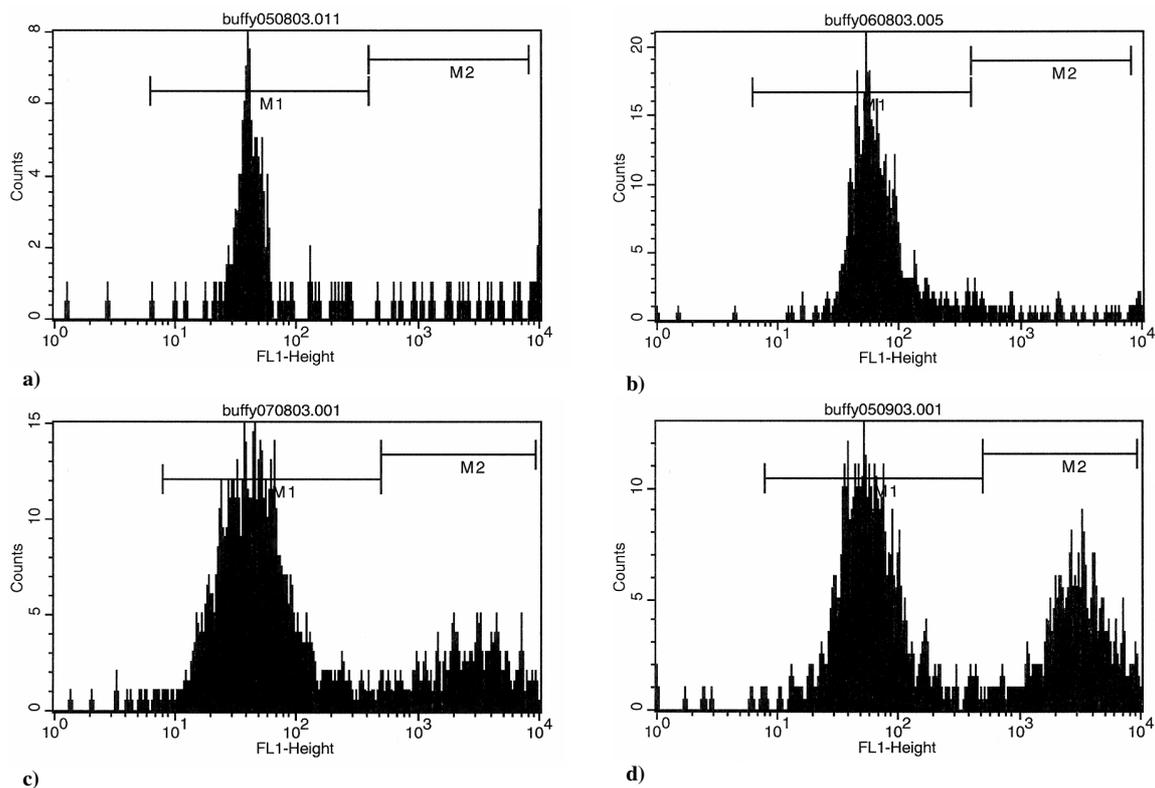
Beim Vergleich des relativen Anteils der CD14-positiven Monozyten in Bezug auf die Gesamtzellzahl fiel besonders auf, dass in allen Ansätzen die das Prolene®-Netz enthielten, die Zellzahl (Mediane) im zeitlichen Verlauf über insgesamt 96 h hoch signifikant um 19 % ( $P = 0,003$  Wilcoxon-Test) abgenommen hat. Im Ansatz mit der Stimulation von

LPS blieb der Anteil der Zellfraktion auf dem Ausgangslevel ( $P = 0,110$ ). Die Werte der Kontrollgruppe sanken über den Beobachtungszeitraum um 5 % signifikant ab ( $P = 0,010$ ). Die Darstellung zeigt im Vergleich der Netz-Gruppe zur Kontrollgruppe ohne Netz einen deutlichen Abfall der Monozyten über 96 h um insgesamt 14 % ( $P < 0,0005$  Mann-Whitney-U-Test), wobei schon nach 48 h ein signifikanter Unterschied ( $P = 0,024$ ) zwischen den Monozytenzahlen beider Gruppen besteht. Im Vergleich zur Positivkontrolle mit der Stimulation von LPS beträgt die Differenz zur Netzgruppe nach 96 h sogar 21 % ( $P < 0,0005$ ). Hier ist bereits nach dem ersten Inkubationsintervall eine signifikante Differenz von knapp 3 % ( $P = 0,015$ ) zwischen beiden Ansatzgruppen nachweisbar. Die Mediane der Messwerte sind in der Tabelle 3.1 dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen durch die deutliche Abnahme der Monozytenzahlen in allen Ansätzen mit Netz, dass die Prolene<sup>®</sup>-Netze zu einer starken Abnahme der Monozytenzahl führen und beweisen einen Einfluss der Polypropylen-Kunststoffnetze auf die Zellen der Umgebung.

### 3.2.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate

Die Bestimmung der Apoptoserate der CD14-positiven Monozyten und Makrophagen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenz-markierten Annexin-V-Antikörpers am FACS (vgl. 2.4.4 und Abbildung 3.3 a-d).



**Abbildung 3.3: Beispiele der FACS-Analyse der Apoptoserate der CD14-positiven Monozyten und Makrophagen nach Inkubation mit dem Prolene<sup>®</sup>-Netz mit Hilfe des Annexin-V Fluoreszenzfarbstoffes zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten**

a) nach 24h, b) nach 48h, c) nach 72h, d) nach 96h

M1: Annexin-V negative Zellen, M2: Annexin-V- und CD14-positive Zellen

Die Apoptoserate ergab eine signifikante Zunahme um 12 % ( $P = 0,010$  Wilcoxon-Test) nach 96 h der in Apoptose befindlichen Zellen in der Kontrollprobe. Diese Zunahme ist im ersten Beobachtungsintervall zwischen 24 h und 48 h noch nicht nachweisbar ( $P = 0,176$ ) und steigt dann mit 5 % ( $P = 0,063$ ), allerdings noch nicht signifikant, zwischen 48 h und 72 h an. Zwischen 48 h und 96 h ist dieser Anstieg mit 18 % signifikant ( $P = 0,018$ ) (vgl. Tabelle 3.2). In den Ansätzen mit Netz kam es während der ersten 72 h zu einer Abnahme bzw. Stagnation der Apoptoserate und nur während der letzten 24 h des Beobachtungszeitraumes (zwischen 72 h und 96 h) zu einem Anstieg um 12 % ( $P = 0,011$  Wilcoxon-Test). Insgesamt aber ist die Apoptoserate zwischen den Messzeitpunkten 24 h

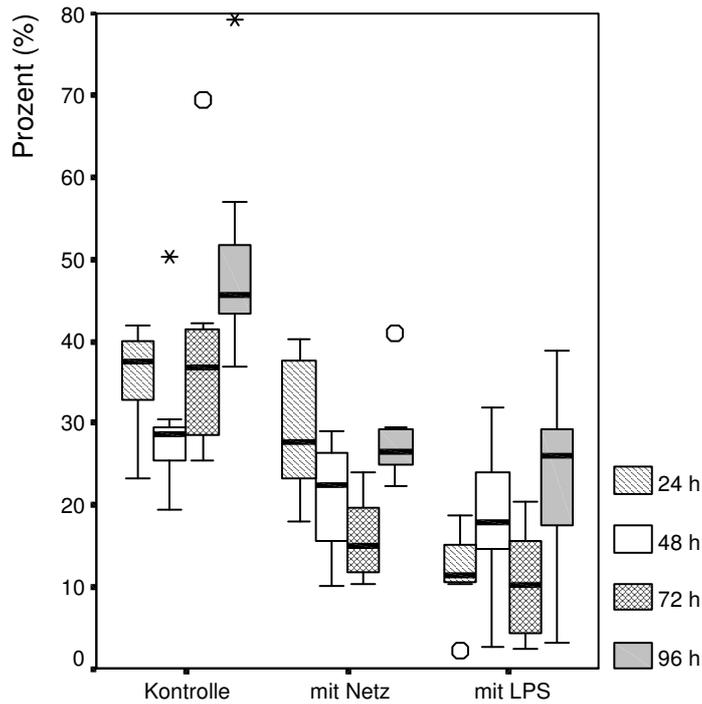
und 96 h mit einer Differenz von 2 % nicht signifikant ( $P = 0,515$  Wilcoxon-Test). Die Kurve der Ansätze mit Netz verläuft ohne einen signifikanten Anstieg über den Beobachtungszeitraum von 96 h. Die Positiv-Kontrolle mit Stimulation durch LPS steigt insgesamt über 96 h signifikant um 9 % an ( $P = 0,012$  Wilcoxon-Test) (vgl. Tabelle 3.2 und Abbildung 3.4).

Beim Vergleich der Apoptoserate der Netz-Gruppe mit der Kontrollgruppe lässt sich über 72 h eine signifikante Differenz von 17 % ( $P = 0,005$  Mann-Whitney-U-Test) und über 96 h von ebenfalls 17 % ( $P = 0,003$ ) nachweisen, die graphisch im Boxplot in Abbildung 3.4 dargestellt ist. Die Differenz zwischen der LPS-stimulierten Positivkontrolle und der Netzprobe ist bereits nach 24 h mit 14 % signifikant ( $P < 0,0005$  Mann-Whitney-U-Test). Zu allen Messzeitpunkten bleibt diese Signifikanz erhalten mit Differenzen zwischen 4 % nach 48 h ( $P = 0,003$ ) und 6 % nach 96 h Inkubationszeit ( $P < 0,0005$ ).

Der Kontakt mit dem Netzmaterial bewirkt bei den Monozyten und Makrophagen in unserem *in-vitro*-Modell eine Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle. Dieser Effekt ist ähnlich, aber weniger ausgeprägt, wie der Effekt der Positivkontrolle mit der Stimulation durch LPS.

	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>Netz</b>	26,7	22,4	16,8	29,2
<b>LPS</b>	12,7	17,9	10,5	22,0
<b>Kontrolle</b>	34,0	28,7	33,8	46,3

**Tabelle 3.2: Mediane der Apoptoserate der Monozyten in den verschiedenen Untersuchungsansätzen**



**Abbildung 3.4: Graphischer Vergleich der Apoptoserate der Prolene®-Netzgruppe mit der Positivkontrolle (LPS-stimuliert) und der Negativkontrolle**

**signifikante Unterschiede:**

**Kontrolle (24h) / Kontrolle (96h) P = 0,008**

**mit Netz (24h) / mit Netz (72h) P = 0,015**

**mit Netz (48h) / mit Netz (96h) P = 0,043**

**mit Netz (72h) / mit Netz (96h) P = 0,011**

**mit Netz (24h) / mit LPS (24h) P < 0,0005**

**mit Netz (48h) / mit LPS (48h) P = 0,003**

**mit Netz (72h) / mit LPS (72h) P < 0,0005**

**mit Netz (96h) / mit LPS (96h) P < 0,0005**

**mit Netz (72h) / Kontrolle (72h) P < 0,005**

**mit Netz (96h) / Kontrolle (96h) P < 0,003**

**mit LPS (24h) / Kontrolle (24h) P < 0,0005**

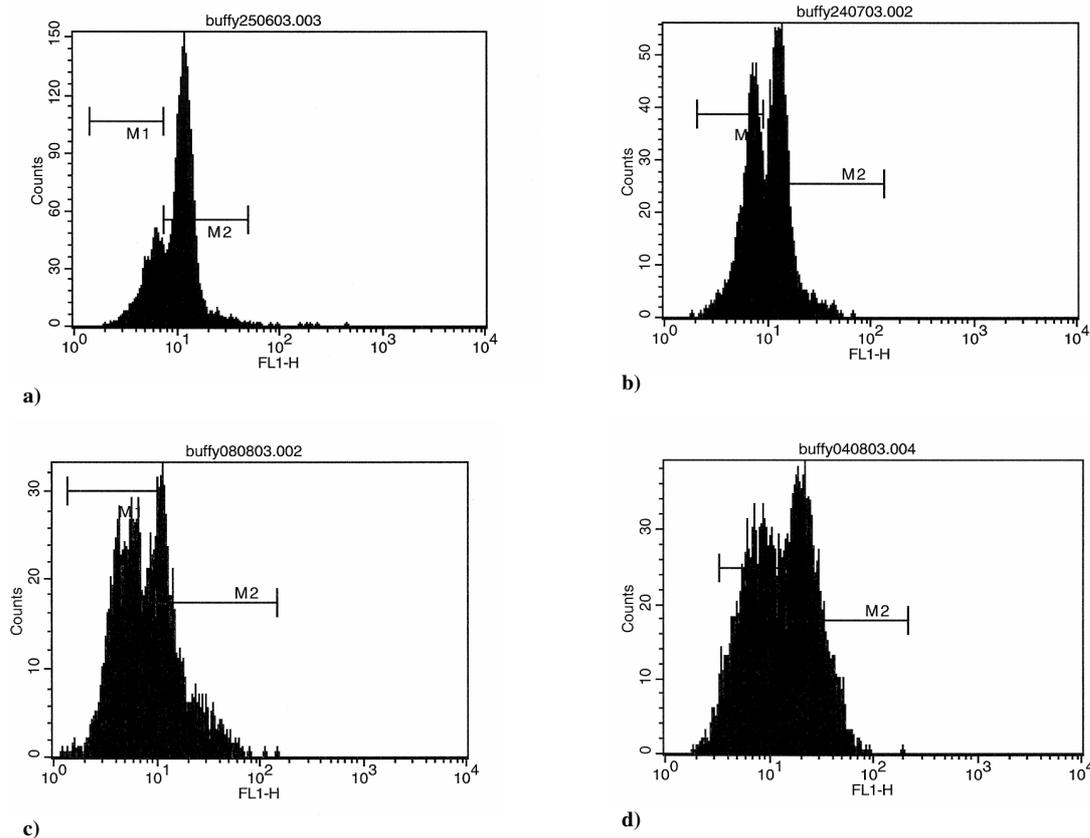
**mit LPS (48h) / Kontrolle (48h) P = 0,001**

**mit LPS (72h) / Kontrolle (72h) P < 0,0005**

**mit LPS (96h) / Kontrolle (96h) P < 0,0005**

### 3.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate

Die Proliferation der CD14-positiven Monozyten und Makrophagen bestimmten wir nach Färbung mit dem Ki-67-Antikörper mit Hilfe des FACScan (vgl. 2.4.5 und Abbildung 3.5 a-d).



**Abbildung 3.5: Beispiele der FACS-Analyse der Proliferationsrate der CD14-positiven Monozyten und Makrophagen nach Inkubation mit dem Prolene<sup>®</sup>-Netz durch Anfärbung mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff zu den verschiedenen Messzeitpunkten**

a) nach 24h, b) nach 48h, c) nach 72h, d) nach 96h

M1: Ki-67 negative Zellen, M2: Ki-67 positive und CD-14 positive Zellen

Das Proliferationsverhalten der CD14-positiven Monozyten und Makrophagen ist in der Tabelle 3.3 und der Abbildung 3.6 dargestellt. Es nimmt in der Kontrollgruppe stetig ab mit einer signifikanten Differenz über 96 h von 10 % ( $P = 0,007$  Wilcoxon-Test). Ebenfalls eine abnehmende Tendenz hat die LPS-stimulierte Gruppe, allerdings auf einem weitaus höheren Niveau, mit einem signifikanten Unterschied über 96 h von 18 % ( $P = 0,009$  Wilcoxon-Test). Die deutlichste Abnahme der Proliferationsrate zeigt die Ansatzgruppe mit Netz: Bereits innerhalb des ersten Beobachtungsraumes zwischen 24 h und 48 h sinkt

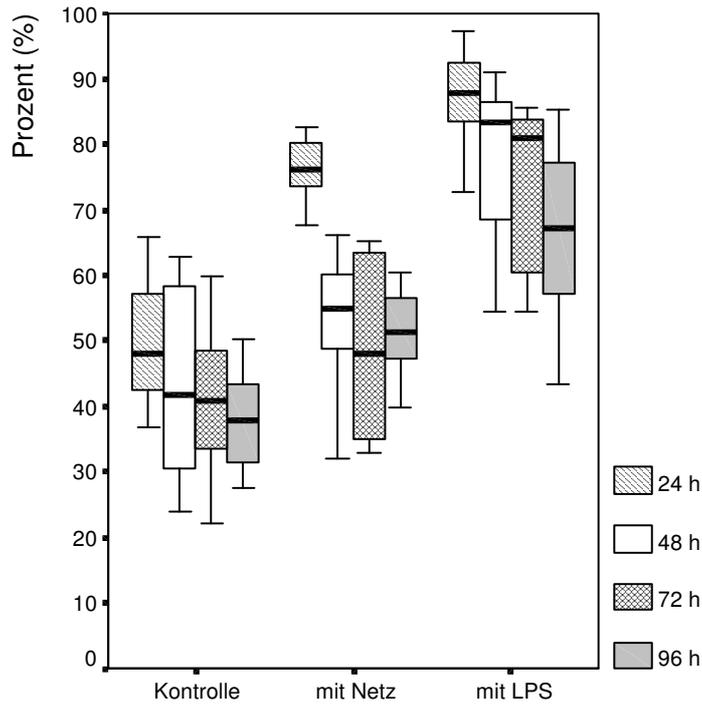
die Rate der Ki-67-positiven Zellen signifikant um 22 % ( $P = 0,008$  Wilcoxon-Test) und bleibt dann über die weitere Zeit konstant mit einer Abnahme insgesamt über 96 h um 21 % ( $P = 0,007$ ).

Der Vergleich der Netz-Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigt zwischen den Werten des ersten Untersuchungszeitpunktes (nach 24 h) eine signifikante Differenz von 25 % ( $P < 0,0005$  Mann-Whitney-U-Test). Die Werte zu den folgenden Messzeitpunkten nähern sich dann soweit an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ansatzgruppen mehr gibt ( $P = 0,531$  nach 48 h und  $P = 0,921$  nach 96 h). Entgegengesetzt verhält sich der Vergleich der Netz-Gruppe mit der LPS-stimulierten Positiv-Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 3.6): Hier bestehen zu allen Messzeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Ansatzgruppen mit Differenzen von 13 % nach 24 h Inkubationszeit, 32 % nach 48 h ( $P = 0,004$  Mann-Whitney-U-Test), 18 % nach 72 h ( $P < 0,0005$ ) und 17 % nach 96 h ( $P < 0,0005$ ) (vgl. Abbildung 3.6).

Die Proliferationsrate der Monozyten wird durch das Prolene<sup>®</sup>-Netz im Vergleich zur Rate der Kontrollgruppe, ähnlich der mit LPS-stimulierten Positivkontrollgruppe reduziert. Das Kunststoffnetz bewirkt in unserem *in-vitro*-Modell eine Verminderung der zentralen Zellen der Entzündungsreaktion, die sich in aktiven Phasen des Zellzyklus befinden. Dadurch kommt es zu einem Missverhältnis der vorhandenen Zellpopulationen.

	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>Netz</b>	74,4	52,5	56,9	53,1
<b>LPS</b>	87,7	84,3	74,8	70,0
<b>Kontrolle</b>	49,0	46,1	42,0	39,2

**Tabelle 3.3: Mediane der Proliferationsrate in den verschiedenen Versuchsansätzen**



**Abbildung 3.6: Vergleich der Mediane des Proliferationsverhaltens der Prolene®-Netzgruppe mit der Positivkontrolle (LPS-stimuliert) und der Negativkontrolle zu den verschiedenen Messzeitpunkten**

**signifikante Unterschiede:**

**Kontrolle (24h) / Kontrolle (96h) P = 0,007**

**mit Netz (24h) / mit Netz (48h) P = 0,008**

**mit Netz (24h) / mit Netz (72h) P = 0,005**

**mit Netz (24h) / mit Netz (96h) P = 0,007**

**mit LPS (24h) / mit LPS (96h) P = 0,009**

**mit Netz (24h) / mit LPS (24h) P < 0,004**

**mit Netz (48h) / mit LPS (48h) P < 0,0005**

**mit Netz (72h) / mit LPS (72h) P < 0,0005**

**mit Netz (96h) / mit LPS (96h) P < 0,0005**

**mit Netz (24h) / Kontrolle (24h) P < 0,0005**

**mit LPS (24h) / Kontrolle (24h) P < 0,0005**

**mit LPS (48h) / Kontrolle (48h) P < 0,0005**

**mit LPS (72h) / Kontrolle (72h) P < 0,0005**

**mit LPS (96h) / Kontrolle (96h) P < 0,0005**

### 3.3 Vypro® II

Um die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Prolene®-Netz mit einem moderneren Kunststoffnetz zu vergleichen, wurden mit dem gleichen Versuchsaufbau die Messungen zur Monozytenzellzahl, zum Apoptoseverhalten und zur Proliferationsrate auch mit dem Vypro® II-Netz durchgeführt (vgl. 2.2.2). Bei diesem Netz wird der verbleibende Prolene®-Materialanteil um 65 % reduziert. Damit die Stabilität bei der Implantation und in der frühen Postimplantationsphase dennoch erhalten bleibt, ist das Netzgewebe durch resorbierbares Vicryl® verstärkt. In wie weit diese Materialreduktion und das Einbringen eines anderen Fremdmaterials einen Einfluss auf die Zellvitalität hat, zeigt dieses *in-vitro*-Modell.

#### 3.3.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Monozytenzellzahl

Die Änderung der Zahl der Monozyten über den Messzeitraum von 96 h ist in Tabelle 3.4 und Abbildung 3.7 dargestellt. Eine starke Abnahme der Monozytenzahl über den Betrachtungszeitraum von insgesamt 96 h zeigt dabei die Netz-Gruppe mit einer signifikanten Differenz von 12 % ( $P = 0,005$  Wilcoxon-Test). Die Kontrollgruppe zeigt eine deutlich geringere, aber dennoch signifikante Abnahme über 96 h mit einer Differenz von 9 % ( $P = 0,005$  Wilcoxon-Test). In der Positiv-Kontrollgruppe nur mit LPS ist über den gesamten Messzeitraum in keinem Zeitintervall ein signifikanter Abfall der Monozytenzellzahl zu beobachten.

Der Vergleich der Netz-Gruppe mit den Ansätzen der Kontrollgruppe lässt in den ersten 48 h keinen signifikanten Unterschied der Zellzahlen erkennen. Nach 72 h, mit einer Differenz von 9 % ( $P = 0,034$  Mann-Whitney-U-Test) und nach 96 h mit einer Differenz von 4 % ( $P < 0,005$ ), lassen sich aber signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisen. In Bezug auf die Positiv-Kontrollgruppe mit der Stimulation durch LPS ist zur Netzgruppe bereits nach 48 h eine signifikante Abweichung von 15 % ( $P < 0,0005$  Mann-Whitney-U-Test) zu beobachten. Signifikante Veränderungen zeigen sich auch im weiteren Verlauf der Beobachtungen zu den Zeitpunkten 72 h mit 21 % ( $P = 0,001$ ) und 96 h mit 13 % ( $P < 0,0005$ ).

	24h	48h	72h	96h
<b>Netz</b>	52,2	38,3	31,7	40,7
<b>LPS</b>	58,1	53,5	52,5	53,9
<b>Kontrolle</b>	46,0	41,6	40,9	37,0

Tabelle 3.4: Mediane der Monozytenzellzahlen

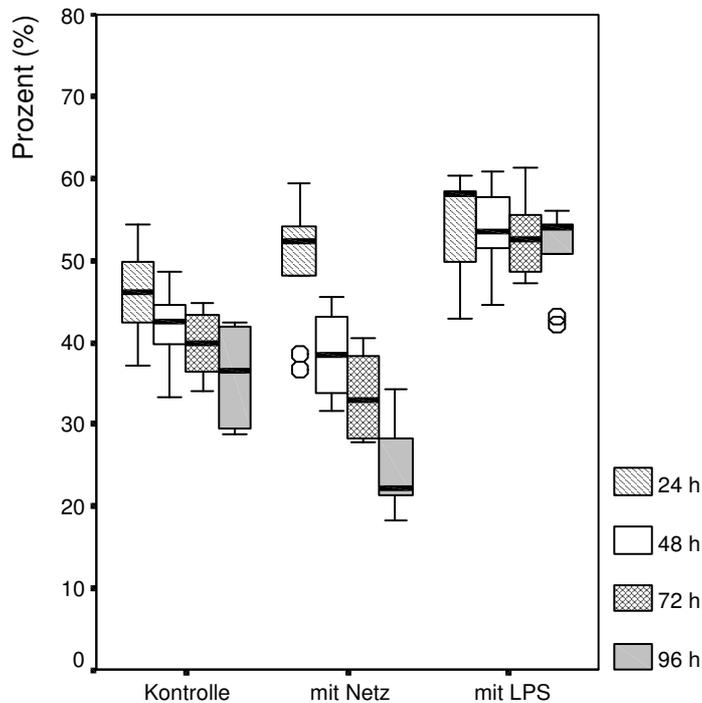


Abbildung 3.7: Vergleich der Monozytenzellzahlen der Vypro® II –Netzgruppe mit der Positivkontrolle (LPS-stimuliert) und der Negativkontrolle

signifikante Unterschiede:

Kontrolle (24h) / Kontrolle (96h) P = 0,005

mit Netz (24h) / mit Netz (48h) P = 0,009

mit Netz (24h) / mit Netz (72h) P = 0,007

mit Netz (24h) / mit Netz (96h) P = 0,005

mit Netz (48h) / mit LPS (48h) P &lt; 0,0005

mit Netz (72h) / mit LPS (72h) P = 0,001

mit Netz (96h) / mit LPS (96h) P &lt; 0,0005

mit Netz (72h) / Kontrolle (72h) P = 0,034

mit Netz (96h) / Kontrolle (96h) P = 0,005

mit LPS (24h) / Kontrolle (24h) P = 0,023

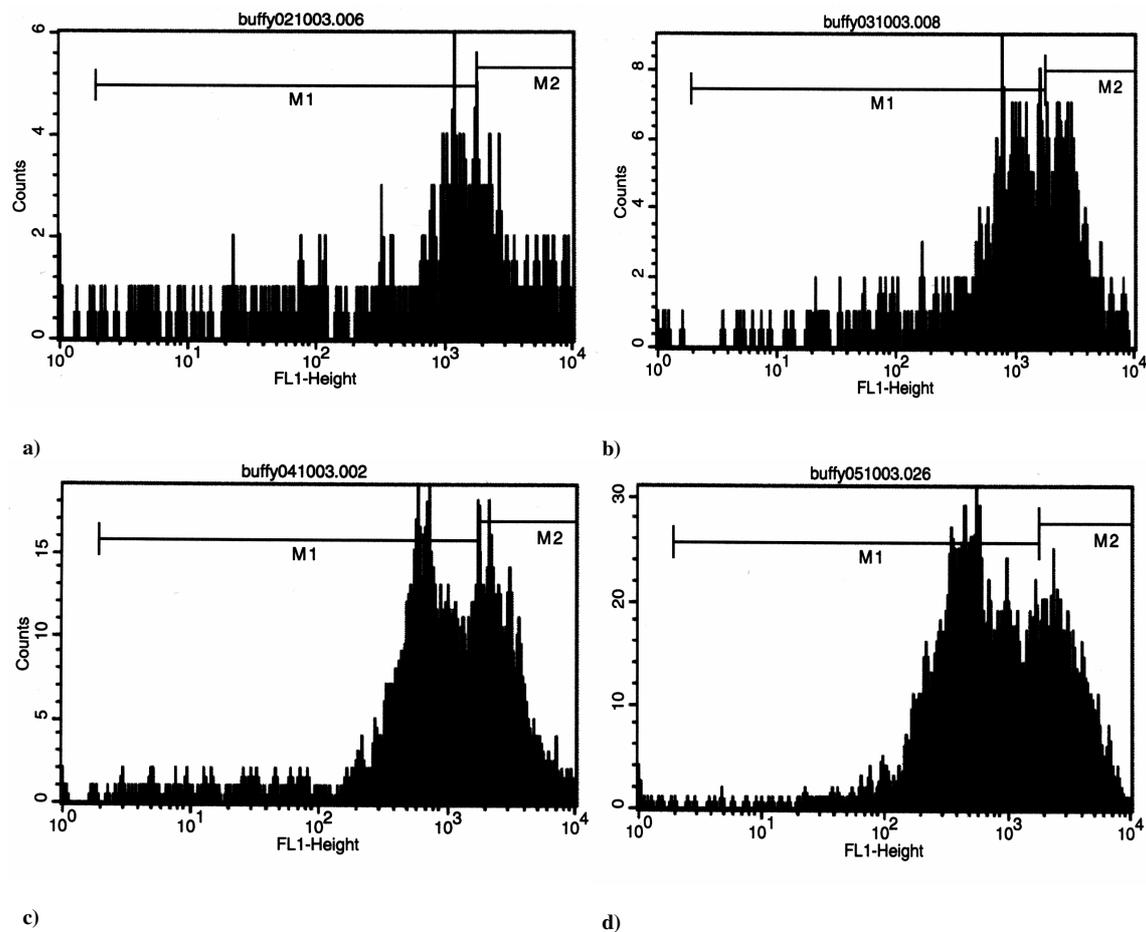
mit LPS (48h) / Kontrolle (48h) P = 0,003

mit LPS (72h) / Kontrolle (72h) P = 0,010

mit LPS (96h) / Kontrolle (96h) P &lt; 0,0005

### 3.3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate

Die Betrachtung der durchflusszytometrisch bestimmten Apoptoserate der CD14-positiven Monozyten und Makrophagen mit Hilfe des Annexin-V-Antikörpers ergab für die Ansätze mit Vypro® II-Netz (vgl. Abbildung 3.8 a-d) über den gesamten Versuchszeitraum von 96 h keine signifikante Steigerung ( $P > 0,05$  Wilcoxon-Test).



**Abbildung 3.8:** Beispielhafte Darstellung der am FACS bestimmten Apoptoserate der mit Vypro® II-Netz inkubierten CD14-positiven Monozyten und Makrophagen  
a) nach 24h, b) nach 48h, c) nach 72h, d) nach 96h

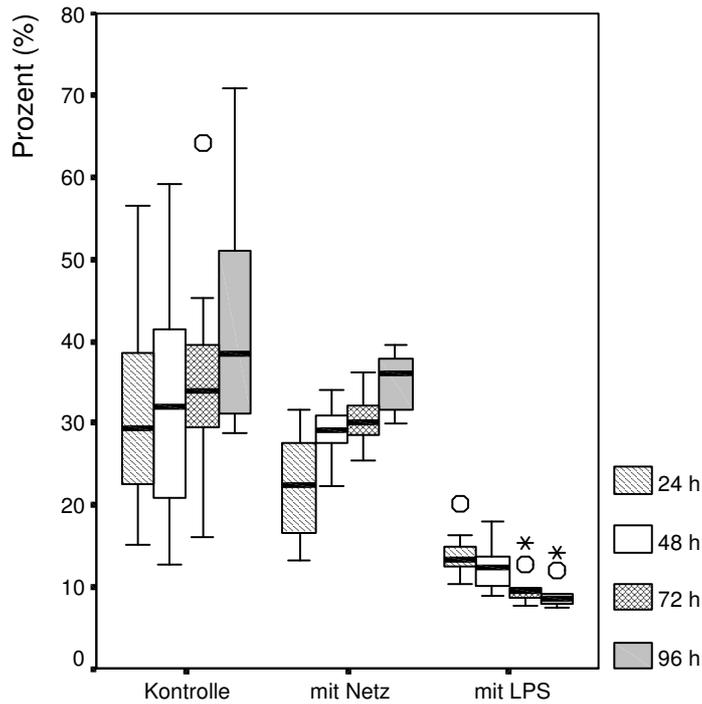
In der Kontrollgruppe ist für die Rate der apoptotischen Zellen über 96 h insgesamt ein signifikanter Unterschied zu beobachten bei einer Differenz von 9 % ( $P = 0,007$  Wilcoxon-Test), alle dazwischen liegenden Intervalle sind aber nicht signifikant ( $P > 0,05$ ). Bei der mit LPS stimulierten Positiv-Kontrollgruppe zeigen sich im zeitlichen Verlauf keine statistisch signifikanten Veränderungen der Apoptoserate ( $P > 0,05$  Wilcoxon-Test).

Ein signifikanter Unterschied lässt sich bereits nach 24 h im Vergleich der Netzgruppe mit der LPS-stimulierten Gruppe bei einer Differenz von 10 % nachweisen ( $P = 0,002$  Mann-Whitney-U-Test) (vgl. Abbildung 3.9 und Tabelle 3.5). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die Apoptoserate der mit Netz inkubierten Zellen insgesamt geringer, bei einem ungleichmäßigen Kurvenverlauf über 96 h. Lediglich nach 72 h lässt sich ein signifikanter Unterschied bei einer Differenz von 10 % ( $P = 0,041$  Mann-Whitney-U-Test) nachweisen. Diese Signifikanz ist nach 96 h allerdings mit einer Differenz von 7 % nicht mehr nachweisbar ( $P = 0,133$ ).

Die Inkubation mit dem Vypro<sup>®</sup>II-Netz hat demnach in diesem *in-vitro*-Modell keinen nachweisbaren Einfluss auf die Apoptoserate der Monozyten und Makrophagen.

	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>Netz</b>	22,5	29,7	24,2	31,5
<b>LPS</b>	12,7	13,2	9,4	8,6
<b>Kontrolle</b>	29,5	32,0	33,8	38,3

**Tabelle 3.5: Mediane der Apoptoserate in den Versuchsansätzen mit Vypro<sup>®</sup>II –Netz zu den verschiedenen Messzeitpunkten**



**Abbildung 3.9: Vergleich der Mediane der Apoptoserate der Vypro® II –Netzgruppe mit der Positivkontrolle (LPS-stimuliert) und der Negativkontrolle über den Messzeitraum von 96h**

**signifikante Unterschiede:**

**Kontrolle (24h) / Kontrolle (96h) P = 0,007**

**mit Netz (24h) / mit LPS (24h) P = 0,002**

**mit Netz (48h) / mit LPS (48h) P = 0,007**

**mit Netz (72h) / mit LPS (72h) P = 0,002**

**mit Netz (96h) / mit LPS (96h) P < 0,0005**

**mit Netz (72h) / Kontrolle (72h) P = 0,041**

**mit LPS (24h) / Kontrolle (24h) P < 0,0005**

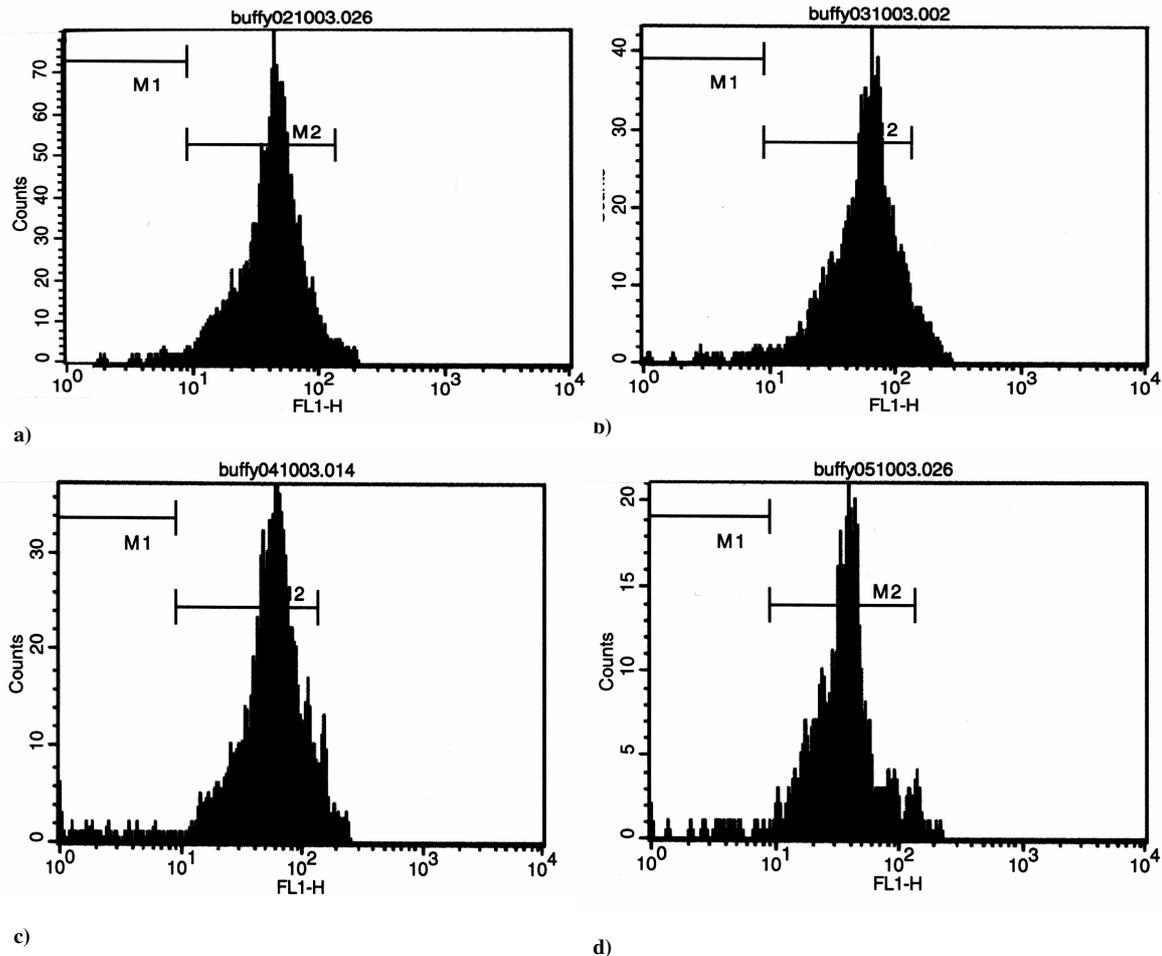
**mit LPS (48h) / Kontrolle (48h) P = 0,005**

**mit LPS (72h) / Kontrolle (72h) P < 0,0005**

**mit LPS (96h) / Kontrolle (96h) P < 0,0005**

### 3.3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate

Die Bestimmung der Proliferationsrate der CD14-positiven Monozyten und Makrophagen mit dem Ki-67-Antikörper nach Kontakt mit dem Vypro® II-Netz erfolgte ebenfalls durchflusszytometrisch (vgl. Abbildung 3.10 a-d) und zeigt eine signifikante Abnahme der proliferierenden Zellen über 96 h um 43 % ( $P = 0,005$  Wilcoxon-Test).



**Abbildung 3.10:** Beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrisch ermittelten Proliferationsrate der mit Vypro® II-Netz inkubierten CD14-positiven Monozyten und Makrophagen zu den Zeitpunkten a) nach 24 h Inkubationszeit b) nach 48 h Inkubationszeit c) nach 72 h Inkubationszeit d) nach 96 h Inkubationszeit

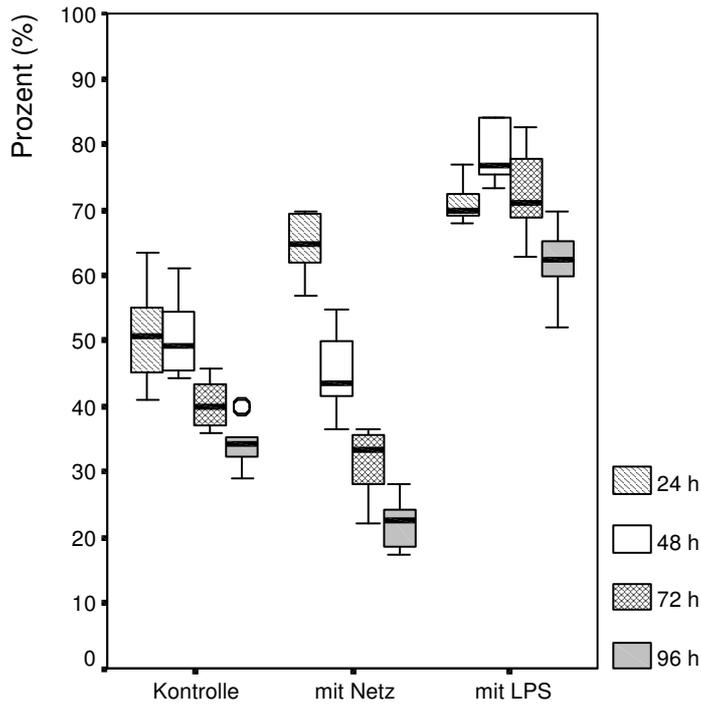
Die Kontrollgruppe bleibt im Beobachtungsintervall zwischen 24 h und 48 h zunächst konstant ( $P > 0,05$  Wilcoxon-Test), fällt dann aber zwischen 48 h und 96 h ebenfalls signifikant mit einer Differenz von 15 % ( $P = 0,008$ ) ab. Die Proliferationsrate der Zellen in der mit LPS stimulierten Positivkontrollgruppe ist während der ersten 72 h der Beobachtung auf konstantem Niveau ( $P > 0,05$  Wilcoxon-Test) bzw. nimmt sogar initial zwischen 24 h und 48 h Inkubationszeit signifikant um 7 % ( $P = 0,012$ ) zu. Erst zwischen

den Messzeitpunkten 72 h und 96 h fällt sie signifikant um 8 % ( $P = 0,007$ ) ab. Insgesamt ergibt sich dadurch aber für den gesamten Beobachtungszeitraum ein signifikanter Abfall der Proliferationsrate in der LPS-Gruppe mit einer Differenz von 7 % ( $P = 0,009$  Wilcoxon-Test) (vgl. Abbildung 3.11 und Tabelle 3.6).

Beim Vergleich der Werte der Vypro<sup>®</sup>II-Netzgruppe mit denen der Kontrollgruppe ist, abgesehen vom 48 h - Wert ( $P > 0,05$ ), zu allen Untersuchungszeitpunkten ein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils der CD14-positiven proliferierenden Zellen nachweisbar ( $P \leq 0,001$  Mann-Whitney-U-Test). Im Zeitfenster zwischen 48 h und 72 h überschneiden sich die beiden Kurven und die Proliferationsrate der Netzgruppe übersteigt die der Kontrollgruppe, nachdem sie nach 24 h Inkubationszeit mit 13 % ( $P = 0,001$  Mann-Whitney-U-Test) signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe lag, wie in Abbildung 3.11 dargestellt. Zur LPS-stimulierten Positivkontrollgruppe besteht zu jedem Messzeitpunkt eine signifikante Differenz von 5 % nach 24 h ( $P = 0,002$ ), 33 % nach 48 h ( $P = 0,001$ ), 36 % nach 72 h ( $P < 0,001$ ) und 20 % nach 96 h ( $P < 0,001$  Mann-Whitney-U-Test).

	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>Netz</b>	64,8	43,6	34,0	22,3
<b>LPS</b>	69,9	76,9	70,1	62,6
<b>Kontrolle</b>	51,9	49,1	40,0	34,2

Tabelle 3.6: Mediane der Proliferationsrate der Versuchsansätze mit Vypro<sup>®</sup>II-Netz



**Abbildung 3.11: Vergleich der Proliferationsrate der Vypro® II-Netzgruppe mit der Positivkontrolle (LPS-stimuliert) und der Negativkontrolle**

**signifikante Unterschiede:**

**Kontrolle (24h) / Kontrolle (96h) P = 0,005**

**mit Netz (24h) / mit Netz (48h) P = 0,012**

**mit Netz (24h) / mit Netz (72h) P = 0,005**

**mit Netz (24h) / mit Netz (96h) P = 0,005**

**mit LPS (24h) / mit LPS (96h) P = 0,009**

**mit Netz (24h) / mit LPS (24h) P = 0,002**

**mit Netz (48h) / mit LPS (48h) P = 0,001**

**mit Netz (72h) / mit LPS (72h) P < 0,0005**

**mit Netz (96h) / mit LPS (96h) P < 0,0005**

**mit Netz (24h) / Kontrolle (24h) P = 0,001**

**mit Netz (72h) / Kontrolle (72h) P = 0,001**

**mit Netz (96h) / Kontrolle (96h) P < 0,0005**

**mit LPS (24h) / Kontrolle (24h) P < 0,0005**

**mit LPS (48h) / Kontrolle (48h) P = 0,001**

**mit LPS (72h) / Kontrolle (72h) P < 0,0005**

**mit LPS (96h) / Kontrolle (96h) P < 0,0005**

### 3.4 Vergleich Prolene® - Vypro® II

Der direkte Vergleich der beiden unterschiedlichen Netze mit ihrem Einfluss auf die Monozyten und Makrophagen in Bezug auf Zellzahl, Apoptose und Proliferation soll eventuelle Vor- und Nachteile der einzelnen Materialien auf zellulärer Ebene hervorheben und dadurch die Materialeigenschaften näher beschreiben. Dadurch kann eine Entscheidungshilfe für die klinische Anwendung der Fremdmaterialien bzw. die Entwicklung neuer Materialien gegeben werden.

#### 3.4.1 Monozytenzellzahl

Bei der in Abbildung 3.12 dargestellten Gegenüberstellung der Monozytenzellzahl der Probenansätze mit Prolene®-Netz und Vypro® II-Netz zeigt sich im gesamten Beobachtungszeitraum kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $P > 0,05$  Mann-Whitney-U-Test).

Beide Netze bewirken im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikante Abnahmen der Monozyten und Makrophagen nach dem Kontakt mit dem Fremdmaterial.

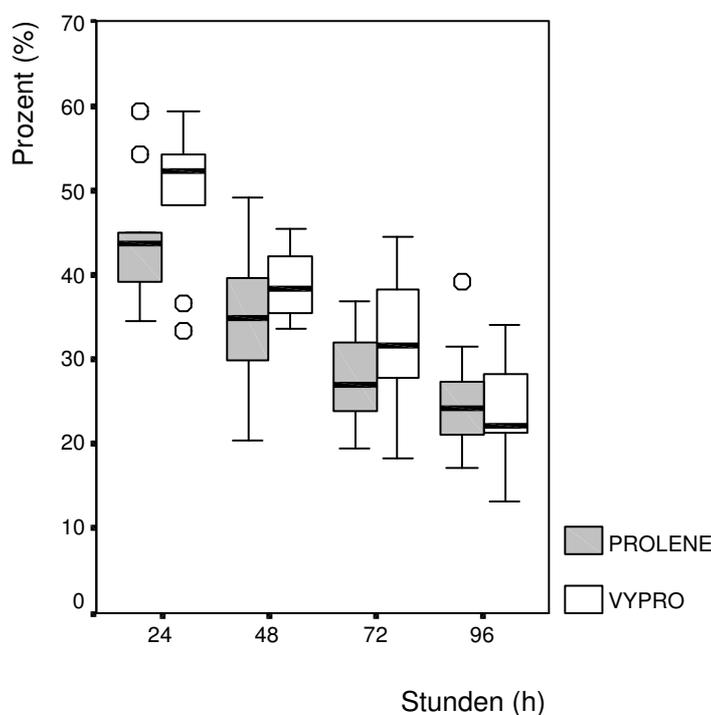
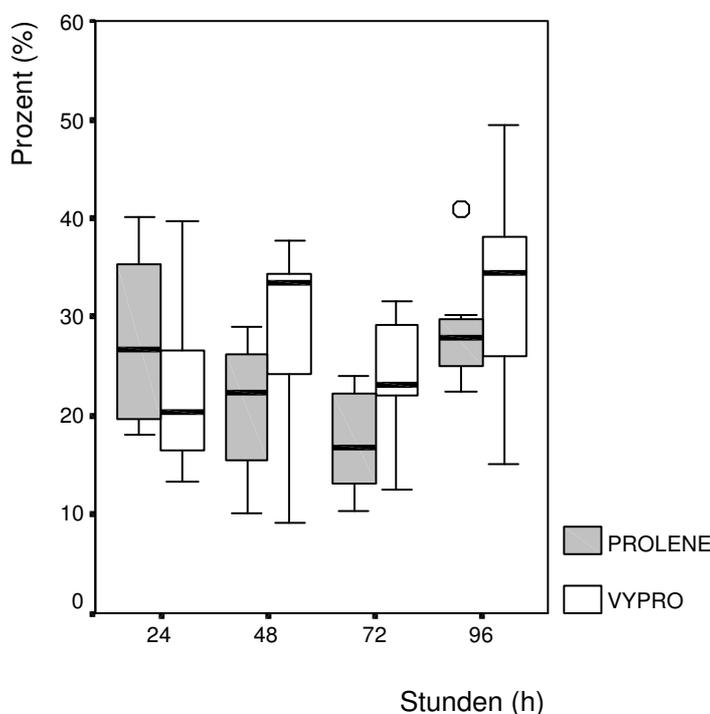


Abbildung 3.12: Vergleich der Mediane der Monozytenzellzahlen  
keine signifikanten Unterschiede

### 3.4.2 Apoptoserate

Bei der Betrachtung des Apoptoseverhaltens der beiden untersuchten Netzgruppen zeigt sich in dem Untersuchungszeitraum bis 72 h ein gegensätzlicher Verlauf der in Apoptose befindlichen Zellen, allerdings ohne signifikante Unterschiede ( $P > 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). In der Vypro<sup>®</sup> II-Gruppe ist ein kontinuierlicher Zuwachs zu beobachten, während die Kurve bei der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe bis zu diesem Zeitpunkt eine abnehmende Tendenz hat, mit einer signifikanten Differenz der Werte bei 72 h von 7 % ( $P = 0,022$  Mann-Whitney-U-Test). Im letzten Versuchsintervall steigt aber auch die Apoptoserate der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe um 12% an, so dass kein signifikanter Unterschied mehr zu den Vypro<sup>®</sup> II-Ansätzen besteht ( $P > 0,05$ ). Die Daten sind in Abbildung 3.13 veranschaulicht.

Zwischen dem Vypro<sup>®</sup> II- und dem Prolene<sup>®</sup>-Netz besteht besonders während der ersten 72 h ein deutlicher Unterschied im Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Monozyten. Reines Prolene<sup>®</sup> vermindert in den ersten 3 Tagen die Apoptoserate gegenüber den unstimulierten Kontrollen, während sie in der materialreduzierten Form Vypro<sup>®</sup> II keinen Unterschied zur Negativkontrollgruppe zeigt. Durch das Prolene<sup>®</sup> entsteht auf zellulärer Ebene eine stärkere Beeinflussung des programmierten Zelltodes.



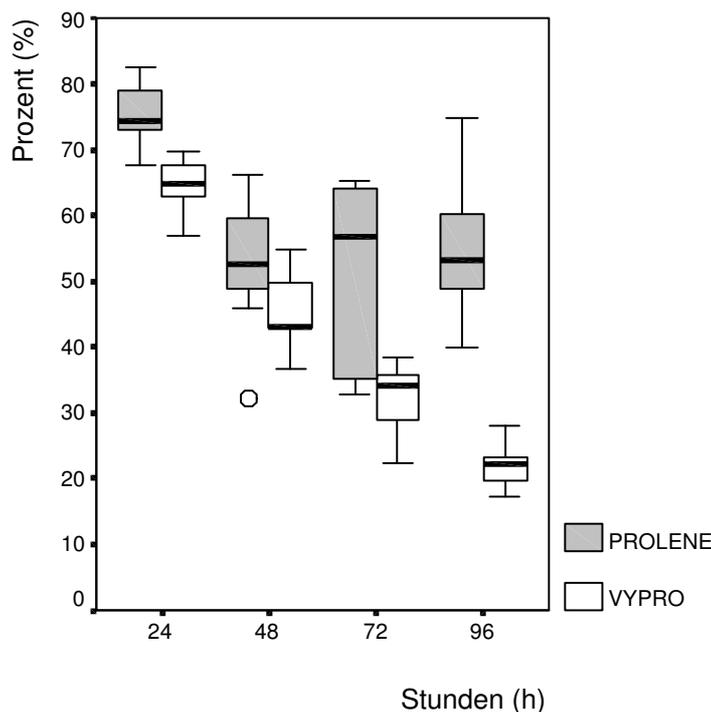
**Abbildung 3.13: Vergleich der Mediane der Apoptoseraten des Prolene<sup>®</sup>- und Vypro<sup>®</sup> II –Netzes zu den verschiedenen Messzeitpunkten**

**signifikante Unterschiede: Prolene<sup>®</sup> (72h) / Vypro<sup>®</sup> II (72h)  $P = 0,022$**

### 3.4.3 Proliferationsrate

In Bezug auf die Proliferationsrate zeigt sich, wie in Abbildung 3.14 dargestellt, im Vergleich der beiden Netze der größte Unterschied: Während der ersten beiden Tage beträgt die Differenz beider Kurven 10 % ( $P < 0,001$  Mann-Whitney-U-Test) bzw. 9 % ( $P = 0,054$ ) mit einer geringeren Proliferationsrate in der Vypro<sup>®</sup>II-Gruppe. Dabei ist lediglich zum Zeitpunkt von 48 h kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen, obwohl auch hier die Tendenz deutlich wird. Im weiteren Verlauf nimmt die Differenz der Proliferationsraten zwischen den beiden Netzgruppen auf 23 % nach 72 h ( $P = 0,007$  Mann-Whitney-U-Test) und auf 31 % ( $P < 0,001$ ) nach 96 h zu.

Dadurch ergibt sich ein eindeutig signifikanter Unterschied des Anteils der in Proliferation befindlichen CD14-positiven Monozyten und Makrophagen bei den beiden untersuchten Netzen.



**Abbildung 3.14: Vergleich der Mediane der Proliferationsraten des Vypro<sup>®</sup>II – und Prolene<sup>®</sup>-Netzes im zeitlichen Verlauf**

signifikante Unterschiede:      Prolene<sup>®</sup> (24h) / Vypro<sup>®</sup>II (24h)  $P < 0,0005$   
    Prolene<sup>®</sup> (72h) / Vypro<sup>®</sup>II (72h)  $P = 0,007$   
    Prolene<sup>®</sup> (96h) / Vypro<sup>®</sup>II (96h)  $P < 0,0005$

### 3.5 Autoklaviertes Prolene®-Netz

#### 3.5.1 Monozytenzellzahl

Die Zellzahl der Monozyten zeigt beim Vergleich der sterilen Prolene®-Netze mit den autoklavierten Prolene®-Netzen schon nach 24 h eine signifikante Abnahme mit einer Differenz von 28 % ( $P \leq 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). Über den Beobachtungszeitraum bleibt diese signifikante Reduktion des Anteils der Monozyten und Makrophagen des gesamten Zellgemisches nachweisbar. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 und Abbildung 3.15 veranschaulicht:

	24h	48h	72h	96h
<b>Prolene® autoklaviert</b>	16,1	3,8	0,5	6,1
<b>Prolene® steril</b>	44,4	37,0	29,6	25,8
<b>Kontrolle</b>	51,1	47,1	37,3	42,0

Tabelle 3.7: Vergleich der Mediane der Monozytenzellzahlen nach Inkubation mit autoklaviertem und sterilem Prolene®-Netz im zeitlichen Verlauf

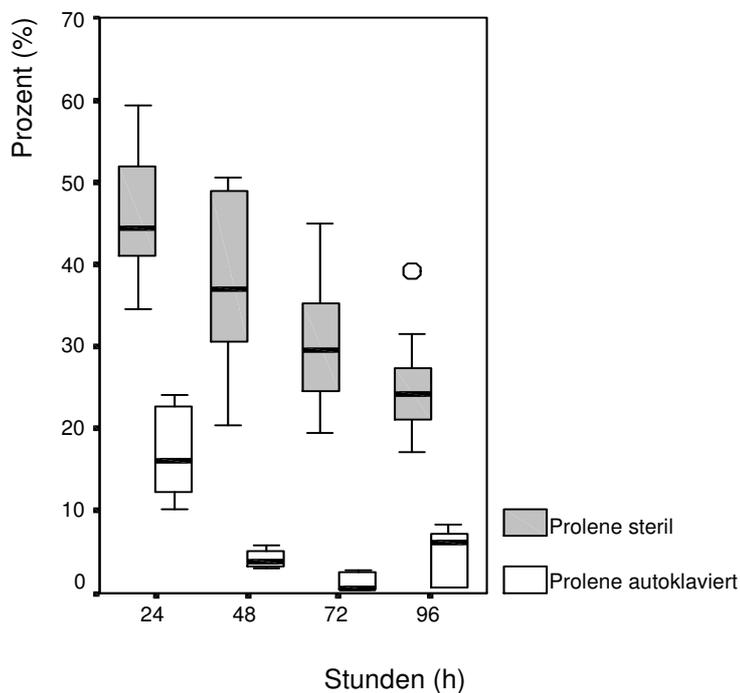


Abbildung 3.15: Graphische Darstellung der Mediane der Monozytenzellzahlen nach Inkubation mit autoklaviertem und sterilem Prolene®-Netz im zeitlichen Verlauf

signifikante Unterschiede: Prolene® steril (24h) / Prolene® autoklaviert (24h)  $P = 0,009$   
 Prolene® steril (48h) / Prolene® autoklaviert (48h)  $P = 0,011$   
 Prolene® steril (72h) / Prolene® autoklaviert (72h)  $P = 0,009$   
 Prolene® steril (96h) / Prolene® autoklaviert (96h)  $P = 0,010$

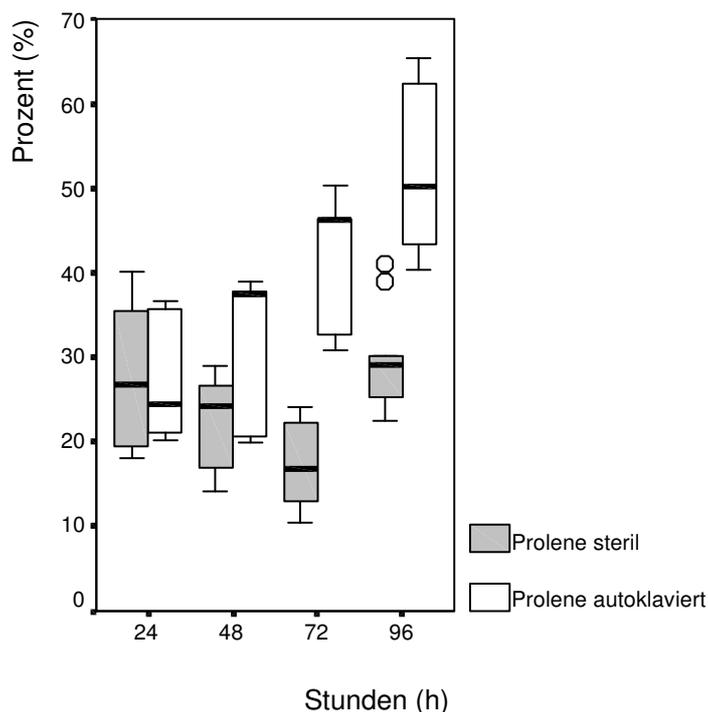
### 3.5.2 Apoptoserate

Die Apoptoserate der Monozytenfraktion, die mit autoklaviertem Prolene<sup>®</sup>-Netz inkubiert wurde, ist in Tabelle 3.8 und Abbildung 3.16 zu sehen und zeigt, im Vergleich zur Kontrolle mit sterilem Prolene<sup>®</sup>-Netzmaterial, erst nach 72 h signifikante Unterschiede. Nach 72 h liegt die Differenz zum sterilen Prolene<sup>®</sup>-Netz bei 29 % ( $P \leq 0,05$ ) und nach 96 h Inkubationszeit bei 21 % ( $P \leq 0,05$  Mann-Whitney-U-Test).

Durch das Autoklavieren wird die Apoptose in den Monozyten und Makrophagen nach dem Netzkontakt signifikant stärker ausgelöst, als nach Kontakt mit sterilem Netz.

	24h	48h	72h	96h
<b>Prolene<sup>®</sup> autoklaviert</b>	24,4	37,0	46,3	50,3
<b>Prolene<sup>®</sup> steril</b>	26,7	22,4	16,8	29,2
<b>Kontrolle</b>	23,4	17,8	23,0	32,9

**Tabelle 3.8: Vergleich der Mediane der Apoptoserate nach Inkubation der Monozyten mit autoklaviertem und sterilem Prolene<sup>®</sup>-Netz**



**Abbildung 3.16: Graphische Darstellung der Mediane der Apoptoserate der Monozyten nach Inkubation mit autoklaviertem und sterilem Prolene<sup>®</sup>-Netz**

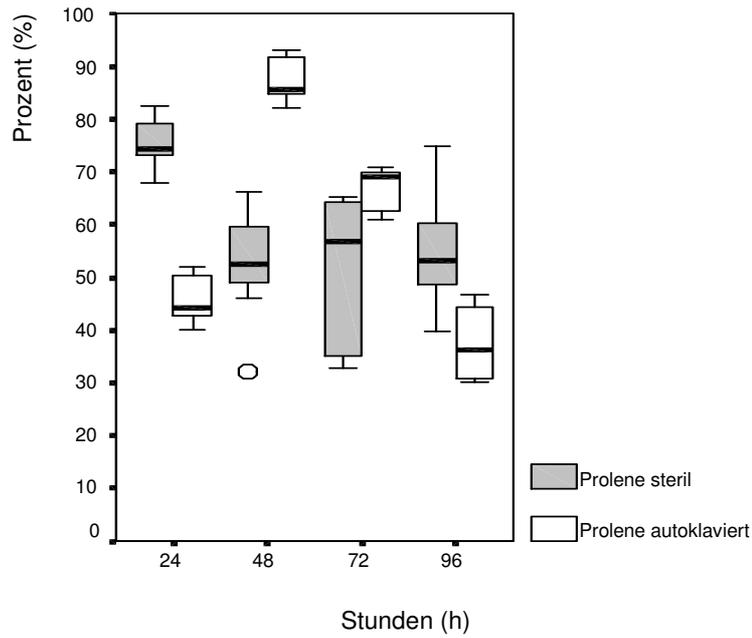
signifikante Unterschiede: Prolene<sup>®</sup> steril (72h) / Prolene<sup>®</sup> autoklaviert (72h)  $P = 0,013$   
 Prolene<sup>®</sup> steril (96h) / Prolene<sup>®</sup> autoklaviert (96h)  $P = 0,013$

### 3.5.3 Proliferationsrate

Die Proliferationsrate der CD14- und Ki-67-positiven Zellen, die mit autoklaviertem Prolene<sup>®</sup>-Netz inkubiert wurden, weist, wie in Tabelle 3.9 und Abbildung 3.17 dargestellt ist, einen Proliferationspeak beim Beobachtungszeitpunkt nach 48 h auf. Dabei ist zwischen 24 h und 48 h ein Anstieg der Proliferationsrate um 41 % zu beobachten. Im weiteren Verlauf fällt dann diese Rate rapide um 16 % (48 h – 72 h) bzw. 33 % (72 h - 96 h) ab und sinkt so noch unter die Proliferationsrate der Kontrollgruppe. Dieser Abnahme des Anteils der proliferierenden Zellen um insgesamt 8 % steht in der Gruppe mit sterilem Prolene<sup>®</sup>-Netz eine Proliferationsrate gegenüber, die nach den ersten 48 h weitgehend konstant bleibt. In Bezug auf die Proliferationsrate konnten aber trotz der starken Abweichung der Werte beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede errechnet werden ( $P > 0,05$  Mann-Whitney-U-Test), da die Anzahl der Proben zu gering war. Eine deutliche Tendenz ist aber zu erkennen.

	24h	48h	72h	96h
<b>Prolene<sup>®</sup> autoklaviert</b>	44,4	85,5	69,1	36,3
<b>Prolene<sup>®</sup> steril</b>	74,4	52,5	56,9	53,1
<b>Kontrolle</b>	50,7	61,1	43,7	29,8

**Tabelle 3.9: Vergleich der Mediane der Proliferationsrate nach Inkubation der Monozyten mit autoklaviertem und sterilem Prolene<sup>®</sup>-Netz**



**Abbildung 3.17: Graphische Darstellung der Mediane der Proliferationsrate der Monozyten nach Inkubation mit autoklaviertem und sterilem Prolene®-Netz**

signifikante Unterschiede:      Prolene® steril (24h) / Prolene® autoklaviert (24h)  $P = 0,010$   
   Prolene® steril (48h) / Prolene® autoklaviert (48h)  $P = 0,013$   
   Prolene® steril (96h) / Prolene® autoklaviert (96h)  $P = 0,018$

## 4 Diskussion

### 4.1 Fremdkörperreaktion und Monozyten

#### 4.1.1 Fremdkörperreaktion

Die heute verwendeten Biomaterialien sind zwar weitgehend physikalisch und chemisch stabil und inert, nicht-immunisierend und nicht toxisch [Hu et al. 2001]. Dennoch reagiert der Körper auf die Implantation von Fremdmaterialien mit einer lokalen Entzündungsreaktion: Die erste Phase dieser Reaktion ist die spontane bzw. Mastzell- und Komplement-abhängige Adsorption von lokalen Proteinen und Immunglobulinen und deren Interaktion mit dem Fremdmaterial, bevor die spezifischen Entzündungszellen einwandern [Tang et al. 1993, Tang et al. 1998a]. Die Art der adsorbierten Proteine, bei denen besonders das Fibrinogen eine Rolle spielt, beeinflusst dann die weitere Reaktion des Organismus, denn gebundenes Fibrinogen, im Gegensatz zum löslichen, wird von den Phagozyten als Fibrin erkannt und löst die weitere Kaskade der Entzündungsreaktion und Wundheilung aus [Hu et al. 2001; Tang et al. 1996]. Aber auch ohne adhärenente Immunglobuline oder die Aktivierung des Komplementsystems strömen Phagozyten in das Implantationsgebiet ein [Tang et al. 1993, Tang et al. 1998b]. Im Stadium der akuten Entzündung kommt es dann zu einer chemotaktisch induzierten Migration der neutrophilen Granulozyten in das Wundgebiet und der Ausbildung eines Wundexsudats. Die Aktivierung der spezifischen Entzündungszellen entsteht dann entweder durch non-adhäsive Mechanismen infolge von Zell-Zell- oder Zell-Mediator-Interaktionen oder aber als Folge der Adhäsion der Zellen an die Oberfläche eines Fremdkörpers [Anderson 1988]. Sie führt dazu, dass die adhärenenten PBMNCs ihre Morphologie verändern und die Exozytose von proinflammatorischen Zytokinen steigern. Bei *in-vivo*-Untersuchungen wurde deutlich, dass die Monozyten und Makrophagen vor der Adhäsion bereits im Exsudat in hoher Konzentration vorhanden sind [Anderson 1988]. Darauf baut der Versuchsansatz dieser Untersuchungen auf. Im *in-vitro*-Modell wurden die im Kulturmedium freien, nicht adhärenenten PBMNCs für die verschiedenen Untersuchungen und Färbungen verwendet (vgl. 2.3.2).

Im Verlauf der Entzündungsreaktion persistieren die Monozyten bzw. die aus ihnen entstandenen Makrophagen als dominante Zellgruppe im Exsudat. Der Übergang der akuten in die chronische Entzündungsreaktion bzw. Narbenbildungsphase ist ein kontinuierlicher Prozess bei dem die Zahl der Makrophagen kontinuierlich abnimmt, was aber nicht mit einem Rückgang der Fremdkörper-Reaktion einhergeht. Diese persistiert viel mehr über die gesamte Implantationszeit hinaus bis weit in die Postimplantationsphase hinein. Anderson beschreibt, dass allgemein die Konzentration der Entzündungszellen und Lysozyme im Wundexsudat, welches das Biomaterial umgibt, mit zunehmender Implantationszeit um den Faktor zwei am siebten Tag absinkt [Anderson 1988]. Bellón zeigte tierexperimentell ebenfalls die Abnahme der Makrophagen nach Implantation von Polypropylen-Netzen über den Beobachtungszeitraum von insgesamt 90 Tagen und konnte bereits nach 14 Tagen eine Zellreduktion nachweisen [Bellón et al. 1994].

In unseren Ergebnissen lässt sich diese Beobachtung ebenfalls bestätigen: Die Zahl der Monozyten sank in unserem *in-vitro*-Modell nach dem Kontakt mit den Kunststoffnetzen in beiden Netzgruppen im Zeitraum von 96 h mit 19 % in der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe (vgl. 3.2.1) und 12 % in der Vypro<sup>®</sup>II-Gruppe (vgl. 3.3.1) signifikant ab. Auch in Bezug auf die Kontrollgruppe ist der Unterschied in beiden Gruppen signifikant. Im Vergleich der beiden Netze zueinander hingegen, ist keine statistisch relevante Abweichung zu erkennen (vgl. 3.4.1).

Durch die durch das IL-4 induzierte Fusion und inhibierte Apoptose der Monozyten und Makrophagen entstehen die charakteristischen Fremdkörperriesenzellen, deren Größe und Anzahl der Kerne direkt proportional ist zu der Anzahl fusionierter Zellen. Dieser Mechanismus führt zum Überleben der Entzündungszellen an den Fremdkörpern [Brodbeck et al. 2002]. Umgeben werden diese Riesenzellen von Granulationsgewebe, dessen Zusammensetzung, abhängig vom Fremdmaterial, aus einer Mischung aus Makrophagen, Fibroblasten und Kapillaren besteht. Auch hier ist das Ausmaß der Fibroblastenaktivität und dadurch indirekt die Kollagenproduktion durch die Makrophagenaktivität gesteuert [Salthouse 1984]. Während der gesamten Implantationszeit persistiert diese Fremdkörperreaktion und ist somit die Ursache der klinischen Spätkomplikationen sowie der Möglichkeit chronischer granulomatöser Reaktionen [Klinge et al. 1999]. In wieweit das jeweilige Fremdmaterial an der Stärke der Fremdkörperreaktion beteiligt ist, ist auch von den Konzentrationen der Zytokine und von Stressproteinen und deren Einfluss auf die immunkompetenten Zellen abhängig. Bhardwaj untersuchte die Zytokin- und die HSP70i-Konzentrationen nach der Inkubation von

Monozyten mit verschiedenen Fremdmaterialien über 10 Tage und konnte eine deutliche, materialabhängige Korrelation zwischen den Zytokinen TNF- $\alpha$  und GM-CSF mit dem HSP70i nachweisen. Daraus ergibt sich, dass das HSP70i zur weiteren molekularen Untersuchung der biomaterial-induzierten Entzündungsreaktion als ein nützlicher Parameter verwendet werden kann [Bhardwaj et al. 2001].

#### 4.1.2 Monozyten und Makrophagen

Die Monozyten und Makrophagen spielen also eine zentrale Rolle in der Fremdkörperreaktion und somit auch in der Bestimmung der Biokompatibilität der implantierten Materialien. Sie sind nicht nur an der Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplement-Kaskade beteiligt, sondern produzieren zusätzlich Mediatoren für die Proliferation und Proteinsynthese von anderen Zellen der Entzündungsantwort und der Wundheilung [Anderson 1988]. Somit ist die Qualität und Quantität der Monozyten- und Makrophagenantwort an der Implantationsstelle nicht nur entscheidend für das Verstehen der materialabhängigen host-Antwort, sondern auch für das Verhalten bzw. die Verträglichkeit des Implantates [Bellón et al. 1995; Kao 1999]. Sie können also als „Reporterzellen“ für die Biokompatibilität verwendet werden [Bhardwaj et al. 1997]. Aus diesen Gründen lenkten wir unser Augenmerk besonders auf diese Zellpopulation und untersuchten spezifisch für die CD14-positiven Zellen deren Proliferations- und Apoptoseverhalten nach dem Fremdkörperkontakt. Das Oberflächenantigen CD14 ist dabei ein Marker, den die Monozyten stark exprimieren und auch während der Differenzierung in Makrophagen weiterhin präsentieren, wenngleich die Stärke der Expression negativ mit dem Aktivierungsprozess und der Ausbildung von zusätzlichen Funktionen assoziiert ist [Ruppert et al. 1991]. Die Aktivierung der Monozyten geht zudem mit einer Expression von Adhäsionsmolekülen, proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und von Überlebenssignalen einher. Die Aktivierung entspricht dabei einer selektiven Desensibilisierung für Apoptosesignale über spezifische Signale, wie z.B. die Caspase-8, aber sie hat keinen allgemein protektiven Einfluss auf den programmierten Zelltod [Perera und Waldmann 1998] (vgl. 4.2.1).

Es wird offensichtlich, dass wir mehr über die Details der Mechanismen des Zellverhaltens an der Kontaktfläche zum Fremdmaterial wissen müssen, um die Biokompatibilität der Biomaterialien, d.h. also die biologische Unbedenklichkeit der medizinischen Maßnahmen [Schumpelick 1999], zu verbessern. Neben prospektiven, randomisierten Langzeit-Multicenterstudien sollten auch weitere Tierversuche und Zellkulturen zur Validierung der biologischen Reaktionen, der Gewebetoleranz und der Biokompatibilität durchgeführt werden. Einen kleinen Schritt zum besseren Verständnis der zellulären Reaktionen auf die Meshes stellt diese Arbeit dar.

## **4.2 Apoptose und Proliferation**

Die Zahl der vorhandenen Zellen in einem multizellulären Gewebe wird durch viele verschiedene Regulationsmechanismen in der Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod gehalten.

### **4.2.1 Apoptose**

Der Zelltod wird durch den genetisch bestimmten Mechanismus der Apoptose gesteuert. Sie ist charakterisiert durch morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung und Karyohexis<sup>f</sup>, eine Zerstörung des Zytoskeletts durch endogene Proteasen sowie durch das „*Budding*“-Phänomen, einer Ausbildung von Pseudopodien vor dem Zerplatzen der Zelle [Thompson 1995]. Die apoptotischen Zellen setzen nur geringste Dosen von „Chemoattractants“ frei und locken so kaum Neutrophile oder Lymphozyten in die Region. Dadurch ist eine Elimination sterbender Zellen ohne eine Entzündungsreaktion im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod möglich. Außerdem werden die apoptotischen Körper oft durch benachbarte Makrophagen phagozytiert. Dadurch wird die Makrophagenfunktion wiederum moduliert ohne zusätzliche Serum- oder Überlebensfaktoren im Sinne einer Inhibition sowohl der Apoptose, als auch der Proliferation [Majno und Joris 1995; Reddy et al. 2002] (vgl. 4.2.3).

---

<sup>f</sup> Karyohexis = Aufbrechen des Zellkerns

Die genaue Ursache für den programmierten Zelltod ist immer noch unzureichend geklärt: Ein Grund ist der Zelltod durch fehlende Überlebenssignale. Dadurch werden überzählige, falsch entwickelte und genetisch geschädigte Zellen eliminiert und eine Selektion der fittesten Zellen wird begünstigt. Durch Signale anderer Zellen kann dann dieses Selbstmordprogramm sowohl aktiviert, als auch unterdrückt werden [Raff 1992; Mangan und Wahl 1991]. Bei Untersuchungen zum Apoptoseverhalten einer bestimmten Zellart ist es somit wichtig, möglichst reine Zelllinien zu untersuchen, um eine unkontrollierte Interaktion im Zellgemisch zu verhindern. Andererseits sind diesem reinen Kulturansatz aber auch Grenzen gesetzt, denn die Zellen befinden sich nicht mehr in ihrem natürlichen Umfeld und physiologische Interaktionen, die u. a. auch zum Zellüberleben in der Kultur notwendig sind, bleiben aus [Hodge et al. 2000]. Da das Anliegen dieser Studie gezielt das Verhalten der Monozyten selbst war, wurde weder Vollblut noch das Zellgemisch der buffy coats verwendet, sondern in den Ansätzen wurden nur die PBMNCs nach der Dichtezentrifugation kultiviert. Diese Zellgruppe ist in sich zwar auch heterogen, aber die Reaktionen der Untergruppen sind vergleichbar. Die fehlenden Überlebenssignale führten in allen Kontrollgruppen zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate der CD14-positiven Zellen (vgl. 3.2.2 und 3.3.2). Hingegen führt die Stimulation durch das bakterielle LPS zu keiner relevanten (vgl. 3.3.2) bzw. nur im letzten Beobachtungsintervall zu einer geringen (vgl. 3.2.2) Zunahme. In allen Fällen der LPS-Gruppe aber bestehen nur signifikant geringere prozentuale Werte in Bezug auf die Kontrollgruppe. Die Einflüsse sowohl des Prolene<sup>®</sup>-, als auch des Vypro<sup>®</sup>II-Netzes liegen prozentual zwischen der Positiv- und der Negativkontrollgruppe mit signifikanten Unterschieden. Im zeitlichen Verlauf innerhalb der beiden Netzgruppen ist aber jeweils keine signifikante Veränderung nachweisbar. Beide Fremdmaterialien bewirken also eine Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle, allerdings geringer ausgeprägt, als bei der Stimulation mit bakteriellem LPS.

Zur Identifizierung der apoptotischen Zellen verwendeten wir FITC<sup>§</sup>-konjugiertes Annexin-V (vgl. 2.4.4), ein negativ geladenes Calcium-abhängiges Phospholipid-Bindungsprotein mit hoher Affinität zum Phosphatidylserin (PS), welches in der Frühphase der Apoptose von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite transloziert wird (vgl. Abbildung 1.1). Dieses von Vermes beschriebene Testverfahren ist sehr sensitiv für kinetische Messungen von apoptotischen Zellen im zeitlichen Verlauf [Vermes et al. 1995]. Differentialdiagnostisch kann ein erhöhtes PS auch in nekrotischen Zellen

---

<sup>§</sup> FITC = Fluorescein Isothiocyanat

nachgewiesen werden, wenn ein Defekt der Zellmembran vorliegt. Um dies auszuschließen und eine Integrität der Zellmembran festzustellen wird der Annexin-V-Test mit der Zugabe von Propidium Iodid (PI) ergänzt. In unseren Probemessungen war dabei der Anteil der PI-positiven Zellen sehr gering und führte lediglich zu Interferenzen in den Fluoreszenzen 1 und 3, so dass wir von der zusätzlichen Anfärbung mit PI absahen. Die Ergebnisse stellen also den Anteil der CD14-positiven apoptotischen Zellen und die CD14-positiven Zellen mit Membrandefekten dar. Dieser zusätzliche Anteil ist aber insgesamt minimal und kann vernachlässigt werden.

### 4.2.2 Proliferation

Mit dem Zelltod verbunden ist aber auch die Proliferation der Zellen. Der Nachweis der in Proliferation befindlichen Monozyten erfolgte durch Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1, der ein großes, ubiquitäres nukleäres Protein (pKi-67) mit zahlreichen Repeats erkennt, das ausschließlich in den Wachstumsphasen des Zellzyklus vorhanden ist, nicht aber in ruhenden Zellen oder während der DNA-Reparatur und welches in der modernen Tumordiagnostik weit verbreitet angewendet wird [Gerdes et al. 1984; Schlüter et al. 1993]. Um die Fraktion der pKi-67-positiven PBMNCs noch genauer zu differenzieren ist eine Doppelfärbung mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff wie z. B. dem CD14-Antikörper zur Differenzierung der Monozyten in unserem Versuchsaufbau möglich [Schwartz et al. 1986]. Wichtig ist dabei die Auswahl der Methode zur Permeabilisation der Zellen. Durch Anwendung eines Ethanol-Fixationsverfahrens wird die Zelle permeabilisiert und die Oberflächenmarker bleiben erhalten [Telford et al. 1998]. Obwohl die PBMNCs unter physiologischen Bedingungen keine proliferative Aktivität besitzen, sondern lediglich eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen stattfindet, so lässt sich durch gezielte Stimulation eine kontinuierliche Zunahme der pKi-67-positiven Zellen verzeichnen. Welche Substanzen und Stoffe diese Stimulation bewirken können, ist immer wieder Ziel der Forschung. Hamilton zeigte, dass Fremdmaterialien, die von den Makrophagen nicht beseitigt werden können, und Adjuvantien<sup>h</sup> ein deutlich gesteigertes Überleben von Makrophagen und sogar deren Proliferation auslösen können, um die Zahl der für die Antigenpräsentation und Zytokinproduktion zur Verfügung stehenden Zellen zu steigern [Hamilton et al. 2000;

---

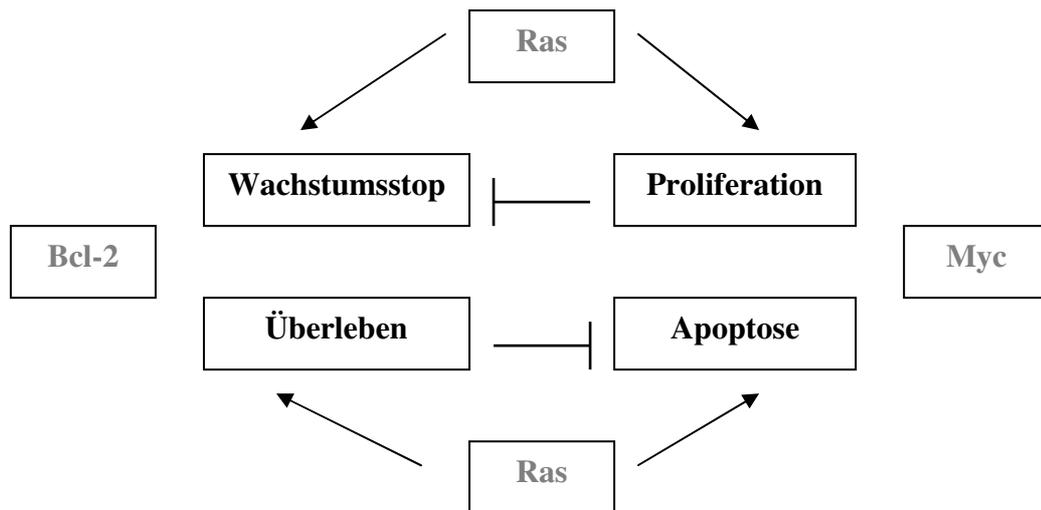
<sup>h</sup> Adjuvans = (lat. adiuvar: unterstützen, helfen), (immun.) Bezeichnung für eine Substanz, die bei gemeinsamer Applikation mit einem Antigen die Antwort des Immunsystems unspezifisch verstärkt bzw. die Art der Immunantwort verändert.

Hamilton 2003]. Auch in der Arterioskleroseforschung sind diesbezüglich Beobachtungen beschrieben worden, wonach in atherosklerotischen Plaques eine signifikante Proliferation von Monozyten und Makrophagen vor allem in der Intima und in schaumzellreichen Geweben ausgelöst wird. Im gesunden Gewebe hingegen lässt sich in der Arterienwand keine proliferative Aktivität nachweisen [Rekhter und Gordon 1995; Wang et al. 1994]. Da die Reaktionen in den atherosklerotischen Plaques ebenfalls auf molekularer Ebene eine chronische Entzündungsreaktion darstellen, lassen sich diese Ergebnisse auch auf die, durch implantierte Fremdkörper induzierte, chronische Entzündungsreaktion übertragen. Interessanterweise konnten wir dennoch, trotz ebenfalls persistierender Fremdkörperreaktion, keine Zunahme, sondern eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate in den Versuchsansätzen mit Netz über 96 h zeigen (Vypro<sup>®</sup> II 43 %, Prolene<sup>®</sup> 21 %; vgl. 3.2.3 und 3.3.3). Zu erklären ist dies durch den zusätzlich vorhandenen Fremdkörper, denn im Vergleich handelt es sich in den atherosklerotischen Plaques zwar um ein chronisch-entzündliches Geschehen, nicht aber um eine chronische Fremdkörperreaktion. Besonders im Intervall zwischen 24 h und 48 h sank der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen in beiden Netzgruppen signifikant, um 22 % in der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe und um 21 % in der Vypro<sup>®</sup> II-Gruppe. Nach diesem initialen Abfall der Proliferationsrate kam es in den weiteren Zeitintervallen beim Prolene<sup>®</sup> zu keinen weiteren signifikanten Änderungen und einer Angleichung an die Werte der Kontrollgruppe. In der Vypro<sup>®</sup> II-Gruppe hingegen ließen sich zwischen allen Untersuchungsintervallen signifikante Abnahmen der proliferierenden Zellen innerhalb der Netzgruppe nachweisen. Signifikante Differenzen zur Positivkontrollgruppe konnten von uns in beiden Netzgruppen zu allen Zeitpunkten gezeigt werden. Auch innerhalb der Kontrollgruppe und in der mit LPS stimulierten Positivkontrollgruppe nahm der Proliferationsindex ab, wobei aber das Ausgangsniveau bei der LPS-Gruppe fast doppelt so hoch ist wie bei der unstimulierten Kontrolle. In der Netzgruppe zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Materialien: Das Prolene<sup>®</sup>-Netz zeigt lediglich nach 24 h eine signifikant höhere Proliferationsrate als die Kontrollgruppe und nähert sich dann mit nicht-signifikanten Unterschieden der Kontrollgruppe an. Das Vypro<sup>®</sup> II-Netz hingegen zeigt nach 24 h initial eine signifikant geringere Proliferationsrate als die Kontrolle, steigt dann aber an, übersteigt die Kontrolle zwischen 48 h und 72 h und fällt zum Ende der Untersuchung hin (72 h - 96 h) sogar deutlich unter die Kontrolle ab.

### 4.2.3 Zellhomöostase

Beide dargestellten Wege der Zellhomöostase sind miteinander gekoppelt und sind von den gleichen Proteinen abhängig bzw. werden von diesen ausgelöst. Sie verhindern dadurch einen intrazellulären Wachstumskonflikt. Proliferierende Zellen lösen das Apoptoseprogramm aus und andersherum kann eine unterdrückte Apoptose auch die Proliferation verhindern. Die Zelle selbst hat somit keine proliferative Autonomie, sondern es herrscht ein Gleichgewicht zwischen proapoptotischem Wachstum und antiapoptotischem Überleben [Evan und Littlewood 1998]. Diese Ergebnisse von Evan und Littlewood konnten wir zumindest in der Prolene<sup>®</sup>-Netzgruppe bestätigen: Die Apoptoserate stagnierte während der ersten 72 h der Beobachtung. Auch die Proliferationsrate stagnierte auf einem Niveau, allerdings erst nach einem initialen Abfall zwischen 24 h und 48 h. Das Prolene<sup>®</sup>-Netz verhindert demnach die Apoptose der Monozyten, bewirkt aber über den Regulationsmechanismus des zellulären Gleichgewichts auch eine Proliferationshemmung, so dass sowohl die Apoptoserate als auch die Proliferationsrate (nach einem initialen Abfall) über den Beobachtungszeitraum von 96 h weitgehend konstant geblieben sind. Auch die geringen Schwankungen in den Kurven weisen Abhängigkeiten auf: Der initiale Abfall der Proliferation hat einen Einfluss auf die Apoptoserate und die späte Zunahme der Apoptose zeigt einen wenn auch nicht signifikanten so doch leichten Anstieg der Proliferationsrate.

Im Gegensatz dazu führte eine Zunahme der Apoptose in den Proben der Vypro<sup>®</sup>II-Netzgruppe besonders im Intervall zwischen 72 h und 96 h nicht zu einem Anstieg der Proliferation in diesem Zeitraum, sondern vielmehr zu einer starken Abnahme. Hier kommt das Verknüpfungsschema der Proto-Onkoproteine Ras, Myc und Bcl-2 als mögliche Erklärung zum Tragen (vgl. Abbildung 4.1): Unter normalen Umständen überwiegt die Inhibition des Wachstums und nur durch eine Kombination aller beteiligten Faktoren ist ein produktives Wachstum möglich. In gesunden Zellen ist das RAS-System aktiv und führt, wie in Abbildung 4.1 dargestellt, zum Wachstumsstopp und zur Apoptose. Dieser Mechanismus ist im Zellverband zusätzlich ein Schutz, um eine Proliferation nach onkogenen Mutationen zu verhindern. Denkbar wäre also, dass das Vypro<sup>®</sup>II-Netz in den Monozyten das Gleichgewicht der Onkoproteine verschiebt und durch die Steigerung der Apoptose eine starke Gewebereaktion verhindert.



**Abbildung 4.1: Zusammenspiel der Onkoproteine Ras, Myc und Bcl-2 bei der Regulation des Zellwachstums.**

Die angeborenen wachstumshemmenden Eigenschaften der einzelnen Onkoproteine bedeuten, dass nur eine Kombination zu einer produktiven Zellproliferation führen kann. Unter physiologischen Bedingungen führt eine Aktivierung der wachstumshemmenden Aktivitäten (Tod oder Wachstumsstillstand) durch spezifische Signale zu einer Gegenregulation durch die anderen Onkoproteine mit wachstumsfördernden Stimuli. Nach einer Mutation der Onkogene kann es aber zu einem Überwiegen der wachstumshemmenden Funktionen kommen und eine Gegenregulation bleibt aus. (modifiziert nach: Evan und Littlewood 1998)

Neben den dargestellten physiologischen Regulationsmechanismen haben auch die Fremdmaterialien der Implantate einen wichtigen Einfluss auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zellen, die in Kontakt mit ihnen stehen. Dabei wird zum einen durch die Oberfläche der Biomaterialien eine Apoptose induziert und eine starke Entzündungsreaktion im Implantationsgebiet vermieden. Andererseits ist der Apoptoselevel vom Einfluss des Fremdmaterials auf das Fusionsverhalten abhängig. Die vom Fremdkörper u. a. über das IL-4 ausgelöste Bildung von Fremdkörperriesenzellen ist ein Weg des Organismus, um eine Apoptose zu vermeiden. Ob diese Riesenzellen zur Verstärkung phagozytischer und degradierender Eigenschaften gebildet werden, oder aber nur eine ineffektive Antwort auf den Fremdkörper sind, steht weiterhin zur Diskussion. Verhindert die Materialoberfläche eine Adhäsion, Aktivierung und Fusion zu Fremdkörperriesenzellen und wird die Apoptose gesteigert, so wird somit auch ein strukturelles, mechanisches und funktionelles Versagen des Implantates verhindert [Brodbeck et al. 2001].

Die Induktion von Apoptose durch die Biomaterialien wäre demnach ein sehr effektiver Mechanismus, um die immunkompetenten Zellen zu reduzieren und um eine ausgeprägte Entzündungsreaktion zu vermeiden [Brodbeck et al. 2002b].

In diese Richtung zielen die Arbeiten von vielen Forschungsgruppen ab. In Bezug auf die Monozyten konnte hier gezeigt werden, dass in der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe zunächst sogar ein Abfall der Apoptoserate nachweisbar war. Lediglich nach 96 h war eine Zunahme zu beobachten, aber insgesamt gab es für den gesamten Studienzeitraum keine signifikanten Veränderungen. In der Vypro<sup>®</sup> II-Gruppe hingegen lässt sich über 96 h zwar auch ein Anstieg der Apoptoserate nachweisen, statistisch ist er aber ebenfalls nicht signifikant.

Während der Wundheilung spielen die Veränderungen der Zellzahlen durch Proliferation, Migration und Apoptose eine wichtige Rolle. Der Heilungsprozess verläuft immer in der gleichen „Reihenfolge“ der dominanten Zellgruppen, die dann jeweils durch Nekrose, Emigration oder Apoptose die Wunde wieder verlassen. Die Apoptose stellt dabei den wichtigsten Mechanismus dar, denn durch sie können die Zellen ohne zusätzliche Migration oder Entzündungsreize beseitigt werden [Greenhalgh 1998]. Die wichtigste Zellgruppe in der ersten Phase der Wundheilung sind die Monozyten bzw. die aus ihnen entstandenen Makrophagen und ohne sie würde keine Wundheilung möglich sein. Wird bei diesen zentralen Entzündungszellen dann die Apoptoserate herabgesetzt bzw. zumindest konstant gehalten, z.B. durch Entzündungsmediatoren wie LPS oder, wie bei uns, durch das Prolene<sup>®</sup>-Netz (in den ersten 72 h der Untersuchung), so entsteht eine exzessive und unkontrollierte Entzündungsreaktion, die besonders nach der Fremdmaterialimplantation immer wieder beobachtet wird. Nach verlängertem Fremdkörperkontakt steigt im Implantationsgebiet u. a. die TGF- $\beta$ -Konzentration an, als Versuch des Körpers, die Entzündungsreaktion abzuschwächen. Dadurch wird die Apoptoserate gesteigert und die Fibroseentstehung induziert. Die, wenn auch nur geringe, Zunahme der Apoptoserate sowohl in der Prolene<sup>®</sup>- als auch der Vypro<sup>®</sup> II-Gruppe lässt sich durch die Zunahme dieser antiinflammatorischen Stimuli deuten.

### 4.3 Vergleich verschiedener Netze

Bernatchez hat gezeigt, dass eine Kombination von morphologischen, immunologischen und biochemischen Markern zur Unterscheidung der Makrophagenantwort bei zahlreichen Materialien verwendet werden kann [Bernatchez et al. 1996]. In unseren Untersuchungen haben wir die Zahl der Monozyten, die Proliferationsrate und die Apoptoserate der Monozyten und Makrophagenfraktion von zwei häufig verwendeten Kunststoffnetzen gegenüber gestellt. Während sowohl die Monozytenzellzahl (vgl. 3.4.1) als auch die Apoptoserate (vgl. 3.4.2) im Vergleich keine signifikanten Unterschiede zeigen, so ist in Bezug auf die Proliferationsrate der CD14-positiven Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen dem einfachen Prolene<sup>®</sup>-Netz und dem Kombinationsnetz Vypro<sup>®</sup>II zugunsten des geringeren Prolene<sup>®</sup>-Anteils im Vypro<sup>®</sup>II-Netz nachweisbar (vgl. 3.4.3).

In tierexperimentellen und klinischen Studien mit explantierten Netzen wurde von Klosterhalfen bei allen Netzmaterialien eine chronisch-persistierende Entzündungsreaktion mit erhöhtem Gewebeumbau nachgewiesen, wobei die Intensität der entzündlich-proliferativen Fremdkörperreaktion vom Netz beeinflusst wurde. Entscheidend ist hier die Materialmenge und Kontaktfläche, die Porengröße, die Materialverarbeitung und die Materialoberfläche, also die Morphologie der Netze und nicht primär das Material [Klosterhalfen et al. 1997; Beets et al. 1996]. Viel Fremdmaterial mit großer Kontaktfläche, wie das Prolene<sup>®</sup>-Netz, führt zu einer akuten Entzündungsreaktion mit der Ausbildung von viel Stützgewebe mit hoher Zugfestigkeit, während eine Materialreduktion zu vorwiegend chronischen Entzündungen mit geringerem Bindegewebsanteil und weniger Langzeitkomplikationen führt [Ortiz-Oshiro et al. 1999; Schumpelick et al. 1999a; Klinge et al. 2002]. Bei kleinen Poren ist eine stärkere Fremdkörperreaktion und Serombildung nachweisbar als bei großporigen Geweben, weil der Flüssigkeitstransport eingeschränkt ist [Rosch et al. 2003a]. Bei einer Porengröße zwischen 0,8 µm und 8,0 µm ist eine gesteigerte Neovaskularisation möglich mit der Folge einer dünneren Kapselbildung, da die Nährstoffversorgung ausreichend ist. Ab Porengrößen von 10 µm und mehr wächst das Bindegewebe in die Netzstrukturen ein und es findet keine Einkapselung mehr statt [Sanders et al. 2000, Greca et al. 2001]. Bei explantierten Netzen waren die Poren der schwergewichtigen (heavy weight meshes) Netze vollständig mit zahlreichen Fibroblasten und Narbengewebe ausgefüllt, während sich in den großen Poren der leichtgewichtigen Netze (low weight meshes) überwiegend Fettgewebe mit nur wenigen Fibroblasten befand [Klinge et al. 2002a]. Außerdem konnte histologisch ein Unterschied in der Orientierung

der bindegewebigen Fasern zwischen den beiden Netzgruppen gezeigt werden: Bei den schwergewichtigen Prolene<sup>®</sup>-Netzen verliefen die Fasern parallel zum Netz und das Netz war von einer dicken Kollagen-Narben-Kapsel umgeben. Beim leichtgewichtigen Vypro<sup>®</sup> II-Netz hingegen lagerten sich die Fasern konzentrisch (perifilamentär) um die einzelnen Netzfilamente an und es kam nur zu einer moderaten Kapselbildung [Klinge et al. 1998; 1999b und 2002b]. Die Zellen im Implantatlager des offensichtlich nicht inertem Polypropylen-Netzes sind durch die chronische Irritation einem vermehrten Zellstress und -umsatz ausgesetzt und antworten darauf mit erhöhten, chronisch-persistierenden Proliferations-, DNA-Schädigungs- und Apoptoseraten [Klosterhalfen et al. 2000]. Diese Beobachtungen decken sich mit unseren *in-vitro*-Ergebnissen, bei denen die Proliferationsrate in den Prolene<sup>®</sup>-Netzproben im Vergleich zum Vypro<sup>®</sup> II-Netz schon in unserem kurzen Untersuchungszeitraum signifikant höher liegt (vgl. 3.4.3).

Die Akkumulation von proliferierenden Zellen und die, von uns nicht weiter untersuchte DNA-Schädigung in direktem Kontakt mit dem Implantat, sind mögliche erste Veränderungen der Fremdkörper-induzierten Kanzerogenese im Sinne einer Sarkominduktion (Fremdkörperreaktion- Sarkom - Sequenz) [James et al. 1997; Schumpelick et al. 1999b, Peiper et al. 2002]. Tierexperimentell wurden Weichgewebssarkome im Implantatlager von implantierten Meshes nach einer Tumorinduktionszeit von 1/2 bis 2/3 der Lebenszeit der Versuchstiere, sowie in der Umgebung von anderen Biomaterialien, wie Dacron-Gefäßprothesen oder resorbierbaren Osteosynthesematerialien [Hoppert et al. 1992; Pistner et al. 1993], nachgewiesen. Seit der Verwendung der Meshes beim Menschen ist bisher aber noch kein einziger Fall einer malignen Entartung beobachtet worden, so dass alles andere zunächst eine reine Hypothese bleibt. Da aber mit potentiellen Induktionszeiten von 30 - 50 Jahren gerechnet werden muss, kann das Risiko dennoch nicht komplett ausgeschlossen werden [Herfarth und Siewert 2000]. Der alleinige Nachweis von Proliferationsmarkern, Apoptose und HSP ist aber sicher nicht ausreichend, um das Malignomrisiko einzuschätzen, denn es sind Zeichen einer ubiquitären Stressantwort, die auch bei nicht tumorösen Erkrankungen nachweisbar sind [Ghadimi et al. 2002].

Die klinischen Nebenwirkungen der Netze, wie die Ausbildung von Granulomen, Fisteln, Seromen und nicht zuletzt von Parästhesien sind Zeichen einer inadäquaten Biokompatibilität. Diese wird maßgeblich durch die Art und Dauer der Entzündungsreaktion beeinflusst, denn eine dauerhaft aktive Entzündungsreaktion führt zu einer harten Narbenplatte und so zu einer Einschränkung der Beweglichkeit und zu Parästhesien [Welty et al. 2001]. Klinge konnte tierexperimentell im Vergleich verschiedener Netzmaterialien zeigen, dass weniger Netzmaterial und größere Poren zu einer geringeren Fibrose und Entzündungsreaktion, sowie zu einer Reduktion der proliferierenden und apoptotischen Zellen führen [Klinge et al. 2002b]. Beim direkten tierexperimentellen Vergleich zwischen Prolene<sup>®</sup>- und Vypro<sup>®</sup>II-Netzen ließen sich in der Funktionalität der Bauchwandstabilisierung keine signifikanten Unterschiede beobachten. Mit beiden Materialien war die Bauchwand nach der Netzimplantation stabiler als die physiologische Bauchwand. Die materialreduzierten Netz-Varianten wie z. B. das Vypro<sup>®</sup>II, sind den Anforderungen der Bauchwand auch gewachsen. Hingegen ist beim Prolene<sup>®</sup> die Zugkraft 5 x höher, als benötigt [Klosterhalfen et al. 1998]. Im klinischen Vergleich konnte Post bestätigen, dass die leichtgewichtigeren Polypropylen-Netze zudem zu signifikant weniger Schmerzen bei körperlicher Belastung führen und dass deutlich weniger Patienten über ein Fremdkörpergefühl klagen, bei sonst vergleichbaren postoperativen Ergebnissen [Post et al. 2004]. Durch die Anwendung von Netzen mit Polyglactinmultifilamenten zur dauerhaften Materialreduktion konnte tierexperimentell außerdem die Zahl der Makrophagen und Granulozyten deutlich reduziert werden [Klinge et al. 1999a]. Rosch beschreibt zwar eine kurzzeitige Polyglactin-induzierte Zunahme der Entzündung und Fibrose um das Implantatlager, auf lange Sicht kann aber sogar eine antiinflammatorische Wirkung der Polyglactin-Multifilamente des Vypro<sup>®</sup>II-Netzes nicht ausgeschlossen werden [Rosch et al. 2003b]. In unserem kurzen Beobachtungszeitraum ließ sich diese Theorie (noch) nicht bestätigen: Sowohl in der Prolene<sup>®</sup>-, als auch in der Vypro<sup>®</sup>II-Gruppe kam es zu einer deutlichen Abnahme der Zahl der Monozyten und Makrophagen im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Da aber nur die ersten 96 h erfasst wurden, kann unser Modell keine Aussagen über die Langzeitwirkung machen. Zudem kann in unserem *in-vitro*-Modell keine komplexe Entzündungsreaktion simuliert werden und die Abnahme ist möglicherweise durch das Zellkulturmilieu bedingt (s.u.).

Auf zellulärer Ebene zeigte sich eine chronische Entzündungsreaktion in beiden Gruppen, aber ein geringeres inflammatorisches Infiltrat mit weniger PBMNCs und mehr Fremdkörperriesenzellen in der Vypro<sup>®</sup>II-Gruppe. Außerdem findet sich dort mehr

Fettgewebe und eine gesteigerte Angiogenese, sowie signifikant weniger Zellumsatz, der durch die Apoptose und die Proliferation charakterisiert wird [Welty et al. 2001; Junge et al. 2002]. Wir konnten in unserem *in-vitro*-Modell eine reduzierte Proliferationsrate in der Vypro<sup>®</sup> II-Gruppe und eine Reduktion der Apoptoserate in der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe während der ersten 72 h bestätigen. Hingegen stimmen unsere Ergebnisse in Hinblick auf die Apoptoserate beim Vypro<sup>®</sup> II-Netz nicht mit den Ergebnissen der explantierten Netze überein: In unseren Versuchen ist die Apoptoserate ab einer Inkubationszeit von 48 h sogar höher, als die in den Versuchen mit Prolene<sup>®</sup>. Nur in der frühen Phase der Beobachtung (nach 24 h), überragt die Apoptoserate der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe die der Vypro<sup>®</sup> II-Gruppe. Nach 96 h nähern sich dann die Apoptoseraten beider Netzgruppen wieder an und es ist kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (vgl. 3.4.2). Grund für dieses andere Ergebnis ist wahrscheinlich der kürzere Beobachtungszeitraum in unseren Zellkulturen im Vergleich zu den Explantaten, denn auch die Monozytenzellzahl zeigt bei uns in 96 h keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Da die Bildung von Fremdkörperriesenzellen aber erst nach 14 Tagen stattfindet [Klosterhalfen et al. 1998], schließen unsere Ergebnisse dies nicht aus. Außerdem lässt sich die höhere Apoptoserate in unserem Modell mit den anderen Bedingungen der *in-vitro*-Untersuchungen im Vergleich zu den *in vivo* durchgeführten Versuchen erklären: Die Monozyten unserer Untersuchung unterliegen im Zellkulturmilieu der Zellularalterung, der Kontakthemmung und der Ansammlung von Stoffwechselmetaboliten, die ebenfalls Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Zellen haben. *In vivo* können diese weiter abgebaut oder abtransportiert werden und haben somit keine Auswirkung auf die Apoptose. Auch die mögliche Freisetzung toxischer Substanzen aus den Netzen unter den Kulturbedingungen kann die Ursache des Anstiegs der Apoptose sein (vgl. 4.4). Insgesamt sind die speziellen Bedingungen der *in-vitro*-Untersuchungen aber nur zu einem geringen Teil für den Anstieg der Apoptoserate verantwortlich. Auch in der Kontrollgruppe ohne Netz kam es im Verlauf des Experiments zu einer wenn auch geringgradigen Zunahme der in Apoptose befindlichen Monozyten.

Die Interaktion der Monozyten und Makrophagen mit den Fasern der Gewebe ist sehr unterschiedlich, denn der Faserdurchmesser, die -zusammensetzung und insgesamt die „Faserarchitektur“ haben Einfluss auf die Zellmorphologie und die Stärke der Fremdkörperreaktion [Beets et al. 1996]. Eine Ausbreitung der adhärenen Zellen findet z. B. nur auf gewebten, nicht aber auf glatten Oberflächen statt und bei zu großen Materialien kommt es zu frustranen Phagozytoseversuchen der Makrophagen (vgl. 4.1.1).

Salthouse beobachtete das Verhalten der Makrophagen beim Kontakt mit Polypropylen-Nahtmaterial und konnte weder nach 24 h noch nach einem Jahr Zelladhäsionen an dem glatten und hydrophoben Faden nachweisen [Salthouse 1984]. Hingegen lassen sich Adhäsionen bei Polypropylen-Netzen, vermehrt in der Peripherie der Implantate, nachweisen. Dabei finden sich die konzentrischen Zellansammlungen um die Monofilamente des Netzes herum, so dass das Netz insgesamt in das narbige Ersatzgewebe integriert wird [Bellón et al. 1995]. Bei einer Faserdicke von  $> 6 \mu\text{m}$  Durchmesser zeigte Sanders eine signifikant höhere Makrophagendichte, als bei Fasern  $< 6 \mu\text{m}$  mit der Vermutung, dass die Zellen nach dem Prinzip des Biomimikri natürliche Faserdicken bevorzugen [Sanders et al. 2000]. Langer konnte in neuesten Untersuchungen im Vergleich des Wachstumsverhaltens von Fibroblasten auf verschiedenen Netzen elektronenmikroskopisch nachweisen, dass v. a. auf dünnen, multifilen Fasern und auf Knoten bei Porengrößen  $> 130 \mu\text{m}$  ein Wachstum stattfindet. Interessant war hier die Beobachtung, dass das Vypro<sup>®</sup>II-Netz zum einen eine sehr hohe Zelldichte (bis zu 60 %) aufgewiesen hat, und dass zum anderen das Wachstum in den ersten 6 Wochen fast ausschließlich entlang der Polyglactinfasern stattgefunden hat. Das Prolene<sup>®</sup>-Material wurde erst nach der vollständigen Resorption des Polyglactins bewachsen [Langer et al. 2005].

Das Zellgemisch im Periimplantatlager besteht zu verschiedenen Anteilen aus Fremdkörperriesenzellen, Plasmazellen, Eosinophilen, Monozyten und Makrophagen sowie aus Fibroblasten. Insgesamt ist die Zellzahl dabei steigend, im Verhältnis sinkt aber die Makrophagenzahl (vgl. 4.1.1), denn es entstehen durch Fusion vermehrt Fremdkörperriesenzellen [Bellón et al. 1994]. Die so nach und nach entstandenen Fremdkörperkapseln können durch die adhärenen Zellen zu einem Versagen des Implantates führen. Xing beschreibt sogar einen direkten Zusammenhang zwischen dem verlängerten Überleben der Makrophagen nach der frustranen Phagozytose von Implantatmaterial und der Materialzerstörung und somit dem Versagen des Implantates [Xing et al. 2002]. Untersuchungen zu verschiedenen Materialeigenschaften zeigten, dass hydrophile und anionische Oberflächen oder Beschichtungen eine Abnahme der Monozytenadhäsion und eine Steigerung der Apoptose der adhärenen Zellen bewirken, wodurch das Risiko eines Versagens der Implantate deutlich reduziert wird [Brodbeck et al. 2002; Riet et al. 2003]. Brodbeck hatte gezeigt, dass die Fremdmaterialien nur durch direkten Kontakt und Adhäsion die Apoptose der Monozyten signifikant beeinflussen können [Brodbeck et al. 2002].

Dies konnte diese Studie nicht bestätigen: Obwohl keine Adhäsionen der Monozyten an die Netzstücke beobachtet werden konnten und die freien Zellen im Kulturmedium untersucht wurden, ließen sich in unseren Untersuchungen signifikant niedrigere Apoptoseraten in den Proben mit Prolene<sup>®</sup>-Netz im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (vgl. 3.2.2). Beim Vypro<sup>®</sup>II-Netz ist insgesamt kein Unterschied nachweisbar (vgl. 3.3.2). Dadurch wird deutlich, dass u. a. auch die materialabhängigen Zytokin-konzentrationen im Kulturmedium einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Zellen haben und dass die Anwesenheit des Fremdmaterials ausreichen kann, diese Zytokinmenge zu beeinflussen.

Ähnlich wie von Xing beschrieben wurde, stellte sich auch in unseren mikroskopischen Beobachtungen die Morphologie der PBMNCs im zeitlichen Verlauf heterogen dar: Sie erschienen abgerundeter, abgeflachter und verlängert, sie wurden zunehmend größer und enthielten mehr Granula, was mit dem Reifungsprozess von den Monozyten hin zu den Makrophagen vereinbar ist [Xing et al. 2002]. Wir konnten allerdings keine Ausbildung von kleinen Kolonien beobachten, was möglicherweise durch das flüssige Kulturmedium bedingt sein könnte.

Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse beim Vergleich des schwergewichtigen Prolene<sup>®</sup> und des materialreduzierten, leichtgewichtigen Vypro<sup>®</sup>II-Netzes die schon tierexperimentell und klinisch beschriebenen Vorteile der leichteren Varianten auch auf zellulärer Ebene. Das Vypro<sup>®</sup>II-Netz hat im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Apoptoserate der Monozyten und stimuliert deren Proliferation signifikant schwächer als das Prolene<sup>®</sup>.

#### **4.4 Autoklaviertes Prolene®-Netz**

Von der Herstellerfirma der Prolene®-Netze wurde in der Gebrauchsanweisung die Anwendung resterilisierten Netze zwar nicht empfohlen, aber ein einmaliges Autoklavieren der Netze wurde als problemlos möglich beschrieben. In der jetzigen Auflage der Gebrauchsanweisung fehlt inzwischen dieser Zusatz.

In früheren Untersuchungen mit humanen Fibroblasten konnte nämlich gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Inhibition des Wachstums und einer gesteigerten Apoptoserate humaner Fibroblasten nach dem Kontakt mit den autoklavierten Polypropylnetzen kam [Bethge et al. 2002; Broll et al. 2002; Bethge 2004]. In den Untersuchungen mit den Monozyten-Zellkulturen ergaben sich entsprechende Ergebnisse (vgl. 3.5): Die Zahl der Monozyten sank schon nach 24 h signifikant ab, die Apoptoserate nahm deutlich zu und insgesamt nahm die Proliferationsrate nach einem initialen Peak im Vergleich zu den Proben mit sterilem Netz über 96 h ebenfalls stark ab. In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Netze vor und nach der Sterilisation wurden im Vergleich deutliche Veränderungen der Oberfläche nach dem Autoklavieren beobachtet. Es zeigten sich Risse und Spalten unterschiedlicher Tiefe und schwarze Spots auf der Filamentoberfläche. Beides deutet auf ein Aufbrechen und Einreißen der Filamentoberfläche und eine Materialdesintegration hin. Durch diese Mechanismen ist eine Freisetzung toxischer Substanzen aus den Netzen generell möglich und in massenspektrometrischen Untersuchungen der Kulturmedien konnten polymere Moleküle nachgewiesen werden [Bethge 2004]. Die stark abfallenden Zellzahlen der Monozyten und die stark zunehmende Apoptoserate unterstützen diese Vermutung. Nach Inkubation der resterilisierten Netze über 96 h steigt demnach möglicherweise die Konzentration der toxischen Substanzen im Kulturmedium an und bedingt dadurch den stark zunehmenden Rückgang der Proliferationsrate nach 48 h bzw. 72 h.

Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der vergrößerten und rauhen Oberfläche des Netzes nach der Resterilisation. Hoppert, James, Kirkpatrick und Matthews erklären die physikalische Beschaffenheit, wie Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Porosität der Fremdmaterialien und nicht die chemischen Eigenschaften für die Auslösung von Zelltransformationen und sogar maligner Entartung verantwortlich (vgl.4.3) [Hoppert et al. 1992; James et al. 1997; Kirkpatrick et al. 2000; Matthews et al. 2000]. Entscheidend ist hier eine nicht materialabhängige oft deutlich prä-maligne Kapselreaktion mit einer fokalen

Akkumulation von Makrophagen [Kirkpatrick et al. 2000]. Und auch von Tang und Anderson wurde nachgewiesen, dass es bei einer großen Oberfläche im Verhältnis zum Volumen des Implantats höhere Zahlen von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen gibt als bei Implantaten mit glatten Oberflächen [Tang et al. 1996; Anderson 1988]. Dies könnte mit dem primären Anstieg der Proliferationsrate der Monozyten nach dem Kontakt mit den autoklavierten Prolene<sup>®</sup>-Netzen übereinstimmen.

## 4.5 LPS

Monozyten sterben in Kulturen ohne Serum, Zytokine oder andere Stimuli zunehmend durch den programmierten Zelltod ab. Die Zugabe von Escherichia coli Lipopolysaccharid (LPS) täuscht das Vorliegen einer bakteriellen Entzündung vor und reicht in sehr geringen Dosierungen (0,1 ng/ml) aus, um eine Steigerung des Überlebens der Monozyten zu erreichen und eine DNA-Fragmentierung zu verhindern. Das LPS wirkt zum einen über eine Induktion intrazellulärer Signale, die den programmierten Zelltod verhindern und zum anderen über die Induktion von Monokinen, die das Überleben der Monozyten steigern [Mangan et al. 1991; Bruzzone et al. 2003]. Die LPS-induzierte Aktivierung der Monozyten erfolgt über das membranständige CD14 (mCD14), dessen Transkription durch das LPS oder andere bakterielle Zellwandbestandteile gesteigert wird. Eine Stimulation der Zellen mit LPS induziert dann bereits nach 4 h eine vermehrte Sekretion von TNF $\alpha$  und IL-6, beides proinflammatorische Zytokine. Auch humane CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten reagieren auf eine Stimulation der Monozyten mit LPS nach direktem Zellkontakt durch Proliferation und Lymphokinproduktion [Bruzzone et al. 2003; Mattern et al. 1994].

Die von uns mit LPS stimulierten Monozyten dienten als Positivkontrolle. Die Monozytenzahlen blieben im gesamten Versuchszeitraum auf konstanten Werten und die Apoptoserate blieb im Vypro<sup>®</sup>II-Spenderkollektiv niedrig bzw. stieg im Prolene<sup>®</sup>-Spenderkollektiv im letzten Zeitintervall an. Die Proliferationsrate nahm initial im Vypro<sup>®</sup>II-Kollektiv sogar zu und fiel lediglich im letzten Untersuchungsintervall deutlich ab; im Prolene<sup>®</sup>-Kollektiv fiel sie konstant ab. In beiden Kollektiven aber auf insgesamt deutlich höheren prozentualen Leveln als die Netz- oder Kontrollgruppen.

Durch IFN- $\gamma$ , ein Zytokin mit antiinflammatorischen Eigenschaften, wird der mCD14-Rezeptor herunterreguliert. Bei reinen Monozyten ist die Zunahme des CD14-Rezeptors bereits nach 15 h deutlich früher zu beobachten („early effect“), als bei den PBMNCs, wo das LPS erst nach 44 h einen „late effect“ auslöst. Ursächlich dafür steht das Verhältnis von mCD14 zum löslichen CD14 (sCD14), welches bei den PBMNCs deutlich höher ist, als bei den reinen Monozyten [Landmann et al. 1996]. Um das sCD14 zu entfernen, wurden die verschiedenen Probenansätze in dieser Versuchsreihe alle vor der Färbung gewaschen.

Bei der Beobachtung der Zellgröße beschreibt Mangan deutlich größere Zellen mit der LPS-Stimulation, während die nicht stimulierten Zellen sogar kleiner als die Ausgangszellen erschienen. Ein Absterben der mit LPS stimulierten Zellen während der Inkubationszeit ist nach seinen Ergebnissen ein Zeichen für eine Übersäuerung des Kulturmediums und es löst eine Nekrose der kultivierten Zellen aus. Die Art des Mediums und die eingesetzte Zellzahl pro Kulturansatz spielt dabei eine zu vernachlässigende Rolle. Wichtig für den Laboralltag ist aber, dass Kulturmedien mit einem Serumzusatz oftmals  $\geq 100$  pg/ml LPS enthalten, und dass schon Mengen  $< 10$  pg/ml LPS ausreichen, um einen programmierten Zelltod zu verhindern [Mangan et al. 1991; Mangan und Wahl 1991].

In unserem Versuchsprotokoll dienten die Ansätze mit dem LPS-Zusatz als Positivkontrolle. Die Monozytenzahl blieb über 96 h konstant, und zeigt so im Vergleich zur Negativkontrollgruppe deutlich den vom LPS ausgehenden Überlebensstimulus. Die Proliferationsrate der Monozyten nimmt über 96 h nur gering ab und erreicht prozentual schon nach 24 h ein deutlich höheres Niveau, als die Kontrollgruppe. Dies lässt sich durch den erwähnten „early effect“ erklären (s.o.).

Unklar bei unseren Untersuchungen bleibt, in wie weit die Stimulation der Monozyten mit LPS die Anfärbung mit dem monoklonalen CD14-Antikörper beeinflusst hat, da beide den CD14-Rezeptor als Zielmolekül an der Oberfläche der Monozyten haben. Für die Betrachtung der CD14-positiven Monozyten ist allerdings das LPS ein sehr geeignetes Stimulationsmolekül und wurde deshalb trotzdem verwendet. Die Induktion von mehr mCD14-Rezeptoren insgesamt zeigt in unserer Messung keine Unterschiede solange die Zellzahl gleich bleibt, denn im Cytometer wird nicht die Anzahl der markierten Rezeptoren sondern die Anzahl der mit markierten Rezeptoren besetzten Zellen gemessen.

In früheren Untersuchungen wurde von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass die Endotoxin-Werte der Netzproben nicht mit bakteriellen Endotoxinen kontaminiert waren und somit ein Einfluss auf die Proliferations- und Apoptoserate ausgeschlossen werden konnte [Bethge 2004].

#### **4.6 High-and Low-Responder**

Um die funktionellen Eigenschaften eines Implantatmaterials vor der Implantation zu testen und weiter zu entwickeln, stellen Zellkulturen eine verlässliche und sensitive Methode dar. Sie ermöglichen insbesondere Aussagen über die Toxizität des zu untersuchenden Fremdstoffes, da die Zellen sehr sensitiv auf das Fremdmaterial reagieren. Sie geben darüber hinaus Aufschluss über direkte Effekte der Biomaterialien auf den Metabolismus und das Wachstumsverhalten der kultivierten Zellen [Langer et al. 2005]. Viel schwieriger hingegen ist die Vorhersage des biologischen Verhaltens, denn es gibt nur wenig Information über die Variabilität der Host-Antwort auf unterschiedliche Materialklassen, -typen und -formen [Pizzoferrato et al. 1985].

Die Sekretion der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF und PGE<sub>2</sub> zeigte in den *in-vitro*-Untersuchungen von Gretzer nach dem Kontakt mit Polyethylen oder Polystyrene eine Heterogenität der humanen Blutmonozyten der verschiedenen Spender [Gretzer et al. 2002]. Auch die Aktivität des MTF, die u. a. durch das IL-1 stimuliert wird, zeigt eine high- und low-Response, die durch genetisch bedingte individuelle, plasmaabhängige Adhäsionseigenschaften gesteuert wird [Nijziel et al. 2001]. *In-vivo*-Studien mit künstlichen Hüftprothesen zeigten ein ähnliches Verhalten, was von Gretzer mit einer teilweise ungleichen Verteilung der Partikel mit unterschiedlichen Zellaktivierungseigenschaften erklärt wurde [Gretzer et al. 2002]. Zum einen spielt hier bei gleichen Zytokinmengen die Partikelgröße eine wichtige Rolle, wobei Partikel mit 3  $\mu$ m Durchmesser die Apoptoserate senken, während die Zellen bei Partikeln mit 1  $\mu$ m Durchmesser hingegen wie unstimulierte Zellen den normalen Weg der Apoptose durchmachen. Zum anderen wirkt sich aber auch die Ummantelung der Fremdkörper mit Fibrinogen darauf aus. Es fördert die Adhäsion und senkt die Apoptose und beeinflusst dadurch die Zell-Interaktionen.

Wodurch allerdings genau das Verhalten der Monozyten beeinflusst wird, bleibt weiter unbekannt. Schachtrupp zeigte neben einem materialabhängigen auch einen individuellen Einfluss auf die Entzündungsantwort der humanen Monozyten auf, der vermutlich auf genetischen Unterschieden basiert [Schachtrupp et al. 2002]. Seine Arbeitsgruppe konnte eine mittelgradige Korrelation zwischen der TNF $\alpha$ -Freisetzung nach der Stimulation mit LPS und nach dem Kontakt mit den Biomaterialien beobachten und vermutet einen gemeinsamen Mechanismus. Auch Matthews zeigte in seinen Untersuchungen zur Antwort der PBMNCs auf Polyethylenpartikel verschiedener Größe eine Heterogenität der Individuen nicht nur in Bezug auf die Art, sondern auch die Ausprägung der Zytokinantwort und damit der Makrophagenaktivierung [Matthews et al. 2000]. Ein Zusammenhang zu den High- oder Non-Respondern, wie bei der gram-negativen Sepsis [Schraut et al. 1997], könnte in Zukunft dazu beitragen, dass die individuelle Reaktion eines Empfängers auf ein Biomaterial und damit auch die Implantatüberlebenszeit frühzeitig abgeschätzt werden kann [Schachtrupp et al. 2002; Matthews et al. 2000]. Das Individuum konnte insgesamt als unabhängiger Faktor für die Entzündungsreaktion der Monozyten auf ein Biomaterial identifiziert werden und Individuen mit starker und geringer Entzündungsantwort auf die Biomaterialien wurden beschrieben [Schachtrupp et al. 2003]. Der Median der Zytokinverteilung in der Untersuchung von Schachtrupp war nicht normal verteilt und interindividuell sehr variabel. Auch in unserem Versuchsansatz lag eine starke Streuung der Messwerte vor und in der Kontrollgruppe für die Apoptoserate in den Untersuchungen mit dem Prolene<sup>®</sup>-Netz konnte unter unseren Spendern ein High-Responder und für die LPS-Stimulation sogar ein Non-Responder identifiziert werden. Deshalb sind die Mediane und nicht die Mittelwerte angegeben und die Graphiken in Form der Boxplots dargestellt (vgl. 2.5 und Abbildung 3.2).

Die Reaktionen auf Fremdmaterialien und auf die Stimulation mit Lipopolysacchariden variiert interindividuell z. T. erheblich. Um allgemein gültige Aussagen zur zellulären Antwort treffen zu können, sollte daher die Zahl der untersuchten Individuen in folgenden Studien deutlich größer gewählt werden.

## 4.7 Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse belegen, dass die Netze zweifelsohne auf zellulärer Ebene Einfluss auf die immunkompetenten Zellen der Umgebung haben. Die Zahl der Monozyten sinkt statistisch signifikant, die Proliferationsrate nimmt deutlich ab und zumindest beim Prolene<sup>®</sup>-Netz ist auch ein Einfluss auf das Apoptoseverhalten zu beobachten. Im Vergleich der Netzmaterialien kann in Bezug auf die Monozytenzahlen kein Unterschied zwischen dem schwergewichtigen Prolene<sup>®</sup>- und dem leichtgewichtigen Vypro<sup>®</sup>II-Netz beobachtet werden, aber sowohl der Einfluss auf das Proliferationsverhalten, als auch die Auslösung der Apoptose ist beim Prolene<sup>®</sup>-Material stärker ausgeprägt. Diese Ergebnisse decken sich mit den klinischen Beobachtungen, dass bei den materialreduzierten Netzen die Nebenwirkungen geringer sind und die Fremdkörperreaktion im Bereich des Netzes weniger stark ausgeprägt ist. Demnach könnte eine weitere Materialreduktion und materialspezifische Verarbeitung die unbestrittenen Vorteile der Netze mit einer Reduktion der Nebenwirkungen und Spät komplikationen vereinen. Da diese aber auch bei den leichtgewichtigeren Netzen, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß auftreten und es immer noch wenig Informationen über die Langzeitreaktionen des Körpers auf den Fremdkörper gibt, ist nach wie vor die Indikation für die Implantation kritisch zu stellen. Wenn auf ein Netz nicht verzichtet werden kann, so sollten leichtgewichtige Polypropylen-Varianten, wie z. B. das Vypro<sup>®</sup>II-Netz, bevorzugt zum Einsatz kommen.

## 5 Zusammenfassung

In der heutigen Hernienchirurgie spielen Kunststoffnetze eine immer größere Rolle. Sie dienen der mechanischen Verstärkung der Bauchwand und induzieren eine Fremdkörperreaktion mit der Ausbildung einer Narbenplatte, die zusätzliche Stabilität bringt, aber auch maßgeblich für die Komplikationen verantwortlich ist. Die zentrale Zellgruppe der chronischen Entzündungsreaktion stellen die Monozyten und die aus ihnen hervorgegangenen Makrophagen dar. Das Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, die Reaktionen der Monozyten auf den Kontakt mit zwei unterschiedlichen Kunststoffnetzen in einer *in-vitro*-Studie zu untersuchen und zu vergleichen. Untersucht wurden dazu mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Zellzahl der CD-14 positiven Monozyten, deren Apoptoserate sowie die proliferative Aktivität nach der Inkubation mit dem schwergewichtigen Polypropylen-Netz Prolene<sup>®</sup> und dem materialreduzierten leichtgewichtigen Vypro<sup>®</sup>II-Netz. Außerdem wurden diese Parameter auch bei autoklaviertem Prolene<sup>®</sup>-Netz untersucht. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe des Annexin-V gemessen und die Proliferationsrate nach Anfärbung der Monozyten mit dem MIB-1-Antikörper gegen das Ki-67-Antigen bestimmt. Als Positivkontrolle dienten mit LPS stimulierte Monozyten.

Folgende Auswirkungen konnten nachgewiesen werden:

Das Prolene<sup>®</sup>-Netz bewirkt eine signifikante Abnahme der Monozytenzellzahl um 19 % von 44,4 % nach 24 h auf 25,8 % nach 96 h und signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Apoptoserate liegt nach 96 h deutlich unter der der Kontrollgruppe. Die Proliferationsrate nimmt über 96 h signifikant um 21 % ab, ist allerdings im Vergleich zur Kontrollgruppe nur nach 24 h statistisch signifikant erniedrigt.

Das Autoklavieren des Prolene<sup>®</sup>-Netzes führt schon nach 24 h zu einer signifikanten Abweichung der Zellzahl der Monozyten von 28 % im Vergleich zum sterilen Prolene<sup>®</sup>-Netz. Die Apoptoseraten unterscheiden sich ab einer Inkubationszeit von 72 h mit einer Differenz von 29 % ebenfalls signifikant. Die Proliferationsindizes zeigen einen Proliferationspeak nach 48 h, rechnerisch kann aber keine signifikante Differenz zwischen dem resterilisierten Prolene<sup>®</sup> und dem sterilen Prolene<sup>®</sup>-Netz aufgezeigt werden.

Das Vypro<sup>®</sup>II-Netz induziert ebenfalls eine Abnahme der Monozytenzellzahl um 12 % mit signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe nach 72 h und 96 h. Ein Einfluss auf die Apoptoserate lässt sich nicht nachweisen. Anders dagegen ist der Einfluss auf die

Proliferationsindizes: Hier bewirkte das Vypro<sup>®</sup>II-Netz über 96 h eine signifikante Abnahme um 43 % und signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Im Vergleich der beiden Netze lässt sich der größte Unterschied bei den Proliferationsraten verifizieren, mit signifikanten Unterschieden während des ganzen Beobachtungszeitraumes von 10 % nach 24 h und 31 % nach 96 h, wobei die höheren Proliferationsraten in der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe nachweisbar sind. Die Monozytenzellzahl unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Netzen, weist aber in beiden Fällen eine signifikante Differenz zu den Kontrollen auf. Auch die Apoptoserate unterscheidet sich statistisch nicht zwischen den beiden Netzgruppen, obwohl in der Prolene<sup>®</sup>-Gruppe während der ersten 72 h eine stärkere Hemmung der Apoptose nachweisbar war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die zur Hernienversorgung verwendeten Polypropylen-Netze einen starken Einfluss auf die humanen Monozyten in Bezug auf deren Zellhomöostase haben. Die Zellzahl der Monozyten sinkt und sowohl deren Proliferation, als auch, wenn auch in deutlich geringerem Maße, die Apoptose wird deutlich durch das Fremdmaterial beeinflusst. Im Vergleich der Netzmaterialien Prolene<sup>®</sup> und Vypro<sup>®</sup>II zeigt sich ein stärkerer Einfluss des schwergewichtigen Prolene<sup>®</sup> sowohl auf die Proliferation, als auch auf das Apoptoseverhalten der Monozyten. Damit decken sich die Ergebnisse mit klinischen Beobachtungen, bei denen die Fremdkörperreaktion und damit auch die Nebenwirkungen bei den materialreduzierten Netzen geringer ausgeprägt sind. Da die Monozyten und die aus ihnen entstandenen Makrophagen eine entscheidende Rolle in humanen immunologischen und inflammatorischen Prozessen spielen, sind sie auch die Schlüsselzellen für die Reaktionen zwischen den implantierten Netzen und dem umgebenden Gewebe.

Um die Interaktionen zwischen dem Fremdkörper und dem Abwehrsystem des Körpers besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen mit immunkompetenten Zellen und deren Botenstoffen unbedingt nötig. Zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung sollte der Einsatz von Kunststoffnetzen nur unter kritischer Indikationsstellung erfolgen. Wenn auf ein Netz nicht verzichtet werden kann, so sollte ein materialreduziertes, leichtgewichtiges Netz, wie z. B. das Vypro<sup>®</sup>II, verwendet werden.

---

## 6 Literaturverzeichnis

**Anderson JM (1988):** Inflammatory response to implants.

*Trans Am Soc Artif Intern Organs 34: 101-107*

**Becker HP, Hartel W (2001):** Epidemiologische und sozioökonomische Aspekte der Narbenhernie.

*Viszeralchirurgie 36: 133-137*

**Beets GL, Go PMNYH, Mameren H van (1996):** Foreign body reactions to monofilament and braided polypropylene mesh used as preperitoneal implants in pigs.

*Eur J Surg 162: 823-825*

**Bellón JM, Buján J, Contreras L, Hernando A (1995):** Integration of biomaterials implanted into abdominal wall: process of scar formation and macrophage response.

*Biomaterials 16: 381-387*

**Bellón JM, Bujan J, Contreras L, Hernando A, Jurado F (1994):** Macrophage response to experimental implantation of polypropylene prostheses.

*Eur Surg Res 26: 46-53*

**Bernatchez SF, Parks PJ, Gibbons DF (1996):** Interaction of macrophages with fibrous materials in vitro.

*Biomaterials 17: 2077-2086*

**Bethge T, Duchrow M, Windhövel U, Broll R (2002):** Inhibition des Wachstums humaner Fibroblasten durch resterilisierte Kunststoffnetze aus Polypropylen.

*Chir Forum Exp Klin Forsch 31: 173-175*

**Bethge T (2004):** In-vitro-Untersuchungen zur Interaktion implantierbarer Kunststoffnetze aus Polypropylen mit humanen Fibroblastenkulturen.

*med. Diss. [Lübeck]: Selbstverlag*

**Bhardwaj RS, Eblenkamp M, Berndt T, Tietze L, Klosterhalfen B (2001):** Role of HSP70i in regulation of biomaterial-induced activation of human monocytes-derived macrophages in culture.

*J Mater Sci Mater Med 12: 97-106*

**Bhardwaj RS, Henze U, Klein B, Zwadlo-Klarwasser G, Klinge U, Mittermayer C, Klosterhalfen B (1997):** Monocyte – biomaterial interaction inducing phenotypic dynamics of monocytes: a possible role of monocyte subsets in biocompatibility.

*J Mater Sci Mater Med 8: 737-742*

**Bringman S, Wollert S, Osterberg J, Heikkinen T (2005):** Early results of a randomized multicenter trial comparing Prolene® and Vypro®II mesh in bilateral endoscopic extraperitoneal hernioplasty (TEP)

*Surg Endosc 19(4): 536-540*

**Brodbeck WG, Patel J, Voskerician G, Christenson E, Shive MS, Nakayama Y, Matsuda T, Ziats NP, Anderson JM (2002a):** Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo.

*Proc Natl Acad Sci USA 99 (16): 10287-10292*

**Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Ziats NP, Anderson JM (2002b):** Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages.

*J Lab Clin Med 139 (2): 90-100*

**Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM (2001):** Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells.

*J Biomed Mater Res 55: 661-668*

**Broll R, Bethge T, Windhövel U, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Duchrow M (2002):** Einfluss resterilisierter Kunststoffnetze aus Polypropylen auf das Wachstum humaner Fibroblasten.

*Zentralbl Chir 127: 589-593*

**Bruzzone S, de Flora A, Usai C, Graeff R, Lee HC (2003):** Cyclic ADP-ribose is a second messenger in the lipopolysaccharide-stimulated proliferation of human blood mononuclear cells.

*Biochem J, Immediate Publication 10. Juli 2003*

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

*Hernia 7: 29-34*

**DeGuzman LJ, Nyhus LM, Yared G, Schlesinger PK (1995):** Colocutaneous fistula formation following polypropylene mesh placement for repair of a ventral hernia.

*Endoscopy 27: 459-461*

**Deligiannidis N, Papavasiliou I, Sapolidis K, Kesisoglou I, Papavramidis S, Gamvros O (2002):** The use of three different meshmaterials in the treatment of abdominal wall defects.

*Hernia 6: 51-55*

**Duchrow M, Windhövel U, Bethge T, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Broll R (2002):** Kunststoffnetze aus Polypropylen beeinflussen das Wachstum humaner Zellen in vitro.

*Chirurg 73: 154-160*

**EU Hernia Trialists Collaboration (2000):** Mesh compared with non-mesh methods of open groin hernia repair: systemic review of randomized controlled trials.

*Br J Surg 87: 854-859*

**Evan G, Littlewood T (1998):** A matter of life and cell death.

*Science 281: 1317-1322*

**Geissmann F, Jung S, Littman D (2003):** Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.

*Immunity 19: 71-82*

**Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H (1984):** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.

*J Immunol* 133 (4): 1710-1715

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

*Chirurg* 73: 833-838

**Greca FH, Paula JB de, Biondo-Simões MLP, Costa FD da, Silva APG da, Time S, Mansur A (2001):** The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects.

*Hernia* 5: 59-64

**Greenhalgh DG (1998):** The role of apoptosis in wound healing.

*Int J Biochem Cell Biol* 30: 1019-1030

**Gretzer C, Werthén M, Thomsen P (2002):** Apoptosis and cytokine release in human monocytes cultured on polystyrene and fibrinogen-coated polystyrene surfaces.

*Biomaterials* 23: 1639-1648

**Hamilton JA (2003):** Nondisposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action.

*J Leukoc Biol* 73: 702-712

**Hamilton JA, Byrne R, Whitty G (2000):** Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic proliferative response to GM-CSF and CSF-1.

*J Leukoc Biol* 67: 226-232

**Hengirmen S, Cete M, Soran A, Aksoy F, Sencer H, Olcay E (1998):** Comparison of meshes for the repair of experimental abdominal wall defects.

*J Invest Surg* 11 (5): 315-325

**Herfarth C, Siewert JR (2000):** Mehr Aufmerksamkeit der Hernienchirurgie!

*Chirurg* 71: 41-42

**Hidalgo M, Castillo MJ, Eymar JL, Hidalgo A (2005):** Lichtenstein inguinal hernioplasty: sutures versus glue.

*Hernia, Online-Publikation 13.05.2005*

**Hodge G; Hodge S, Han P (2000):** Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by annexin-V binding: relevance to cytokine production.

*Cytokine 12 (12): 1763-1768*

**Hoppert T, Pistner H, Stolte M, Mühling J (1992):** Sarkomauslösung durch resorbierbares Osteosynthesematerial bei der Ratte.

*Z Orthop Ihre Grenzgeb 130: 244-247*

**Hu WJ, Eaton JW, Tang L (2001):** Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions

*Blood 98 (4): 1231-1238*

**James SJ, Pogribna M, Miller BJ, Bolon B, Muskhelishvili L (1997):** Characterization of cellular response to silicone implants in rats: implications for foreign-body carcinogenesis.

*Biomaterials 18 (9): 667-675*

**Junge K, Klinge U, Rosch R, Klosterhalfen B, Schumpelick V (2002):** Functional and morphologic properties of a modified mesh for inguinal hernia repair.

*World J Surg 26: 1472-1480*

**Kao WJ (1999):** Evaluation of protein-modulated macrophage behaviour on biomaterials: designing biomimetic materials for cellular engineering.

*Biomaterials 20: 2213-2221*

**Kirkpatrick CJ, Alves A, Köhler H, Kriegsmann J, Bittinger F, Otto M, Williams DF, Eloy R (2000):** Biomaterial-Induced Sarcoma.

*Am J Pathol 156 (4): 1455-1467*

**Klinge U, Junge K, Stumpf M, Öttinger AP, Klosterhalfen B (2002a):** Functional and morphological evaluation of a low-weight, monofilament polypropylene mesh for hernia repair.

*J Biomed Mater Res 63: 129-136*

**Klinge U, Klosterhalfen B, Birkenhauer V, Junge K, Conze J, Schumpelick V (2002b):** Impact of polymer pore size on the interface scar formation in a rat model.

*J Surg Res 103: 208-214*

**Klinge U, Klosterhalfen 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, Klosterhalfen B, Müller M, Anurov M, Öttinger A, Schumpelick V (1999a):** Influence of polyglactin-coating on functional and morphological parameters of polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair.

*Biomaterials 20: 613-623*

**Klinge U, Klosterhalfen B, Müller M, Schumpelick V (1999b):** Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias.

*Eur J Surg 165: 665-673*

**Klosterhalfen 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*

**Klosterhalfen B, Klinge U, Hermanns B, Schumpelick V (2000):** Pathologie traditioneller chirurgischer Netze zur Hernienreparation nach Langzeitimplantation im Menschen.

*Chirurg 71: 43-51*

**Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V (1998):** Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair.  
*Biomaterials 19: 2235-2246*

**Korenkov M, Sauerland S, Paul A, Neugebauer EAM (2002):** Die deutsche Narbenhernienchirurgie im Umbruch. Ein Vergleich zweier Klinikumfragen 1995 und 2001.  
*Zentralbl Chir 127: 700-705*

**Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W (1996):** Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide.  
*Infect Immun 64 (5): 1762-1769*

**Langer C, Flosman M, Kley C, Liersch T, Becker H (2001):** Rezidive und Komplikationen nach Narbenhernien-Netzplastik – Inzidenz, Ursache, Therapie.  
*Viszeralchirurgie 36: 161-168*

**Langer C, Liersch T, Kley C, Flosman M, Süss M, Siemer A, Becker H (2003):** 25 Jahre Erfahrung in der Narbenhernienchirurgie.  
*Chirurg 74: 638-645*

**Langer C, Schwartz P, Krause P, Mohammadi H, Kulle B, Schaper A, Füzesi L, Becker H (2005):** Hernienchirurgie: Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten auf alloplastischen Kunststoffnetzen. In-vitro-Studie zum Einfluss des Materials und der Oberflächenstruktur.  
*Chirurg, online publiziert 20.5.2005*

**Liakakos T, Karanikas I, Panagiotidis H, Dendrinis S (1994):** Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia  
*Br J Surg 81: 248-249*

**Löffler G:** Der Zellzyklus.  
In: *Löffler G, Petrides PE (1975): Biochemie und Pathobiochemie. Berlin: Springer-Verlag (6. Auflage 1998)*

**Luijendijk RW, Hop WCJ, Tol MP van den, Lange DCD de, Braaksma MMJ, Ijzermans JNM, Boelhouwer RU, Vries BC de, Salu MKM, Wereldsma JCJ, Bruijninx CMA, Jeekel J (2000):** A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia.

*N Engl J Med* 343: 392-398

**Majno G, Joris I (1995):** Apoptosis, Oncosis, and Necrosis.

*Am J Pathol* 146 (1): 3-15

**Mangan DF, Wahl SM (1991):** Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines.

*J Immunol* 147 (10): 3408-3412

**Mangan DF, Welch GR, Wahl SM (1991):** Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes.

*J Immunol* 146 (5): 1541-1546

**Mattern T, Thanhäuser A, Reiling N, Toellner KM, Duchrow M, Kusumoto S, Rietschel E, Ernst M, Brade H, Flad HD, Ulmer AJ (1994):** Endotoxin and Lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes.

*J Immunol* 153: 2996-3004

**Matthews JB, Green TR, Stone MH, Wroblewski BM, Fisher J, Ingham E (2000):** Comparison of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes from different donors to challenge with model polyethylene particles of known size and dose.

*Biomaterials* 21: 2033-2044

**Nijziel M, Oerle R van, Veer C van 't, Pampus E van, Lindhout T, Hamulyák K (2001):** Tissue factor activity in human monocytes is regulated by plasma: implications for the high and low responder phenomenon.

*Br J Haematol* 112: 98-104

**O'Dwyer PJ, Kingsnorth AN, Molloy RG, Small PK, Lammers B, Horeysek G (2005):** Randomized clinical trial assessing impact of a lightweight or heavyweight mesh on chronic pain after inguinal hernia repair.

*Br J Surg* 92 (2): 166-170

**Ortiz-Oshiro E, Civantos G, Villalta L, Furió-Bacete V, Mayol Martínez J, Ortega López D, Fdez-Represa JA (1999):** Non-absorbable prosthetic meshes: which is the best option in the repair of abdominal wall defects?

*Int Surg* 84: 246-250

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

*Zentralbl Chir* 127: 573-577

**Perera LP, Waldmann TA (1998):** Activation of human monocytest induces differential resistance to apoptosis with rapid down regulation of caspase-8/FLICE.

*Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14308-14313

**Pistner H, Gutwald R, Ordnung R, Reuther J, Mühling J (1993):** Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo.

*Biomaterials* 14 (9): 671-677

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

*Biomaterials* 6: 346-351

**Post S, Weiss B, Willer M, Neufang T, Lorenz D (2004):** Randomized clinical trial of lightweight composite mesh for Lichtenstein inguinal hernia repair.

*Br J Surg* 91: 44-48

**Pschyrembel W:** *Klinisches Wörterbuch*, 258. Auflage, de Gruyter, Berlin (1998)

**Raff M (1992):** Social controls on cell survival and cell death.

*Nature* 356: 397-400

**Reddy SM, Hsiao KH, Abernethy VE, Fan H, Longacre A, Lieberthal W, Rauch J, Koh JS, Levine JS (2002):** Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: Activation of akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2.

*J Immunol* 169: 702-713

**Rekhter MD, Gordon D (1995):** Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques.

*Am J Pathol* 147: 668-677

**Riet M van't, Steenwijk PJ de Vos van, Bonthuis F, Marquet RL, Steyerberg EW, Jeekel J, Bonjer HJ (2003):** Prevention of adhesion to prosthetic mesh.

*Ann Surg* 237 (1): 123-128

**Rosch R, Junge K, Quester R, Klinge U, Klosterhalfen B (2003a):** Vypro®II mesh in hernia repair: Impact of polyglactin on long-term incorporation in rats.

*Eur Surg Res* 35: 445-450

**Rosch R, Junge K, Schachtrupp A, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V (2003b):** Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model.

*Eur Surg Res* 35: 161-166

**Ruppert J, Friedrichs D, Xu H, Peters JH (1991):** IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency.

*Immunobiol* 182: 449-464

**Salthouse TN (1984):** Some aspects of macrophage behavior at the implant interface.

*J Biomed Mater Res* 18: 395-401

**Sanders JE, Stiles CE, Hayes CL (2000):** Tissue response to single-polymer fibers of varying diameters: Evaluation of fibrous encapsulation and macrophage density.

*J Biomed Mater Res* 52: 231-237

**Schachtrupp A, Klinge U, Bhardwaj R, Rosch R, Schumpelick V (2002):** Individuelle Response humaner Blutmakrophagen auf Netzmaterialien in der Zellkultur.

*Chir Forum Exp Klin Forsch 31: 169-172*

**Schachtrupp A, Klinge U, Junge K, Rosch R, Bhardwaj RS, Schumpelick V (2003):** Individual inflammatory response of human blood monocytes to mesh biomaterials.

*Br J Surg 90: 114-120*

**Scheidbach H, Tamme C, Tannapfel A, Lippert H, Köckerling F (2004):** In vivo studies comparing the biocompatibility of various polypropylene meshes and their handling properties during endoscopic total extraperitoneal (TEP) patchplasty.

*Surg Endosc 18: 211-220*

**Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M, Key G, Flad H, Gerdes J (1993):** The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.

*J Cell Biol 123 (3): 513-522*

**Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993):** The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.

*J Cell Biol 123 (3): 513-522*

**Schumpelick V (1999):** Biotop Mensch.

*Chirurg 70: 845-846*

**Schumpelick V, Bleese NM, Mommsen U:** Chirurgie.

*3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 1993 S. 730-734*

**Schumpelick V, Klinge U, Junge K, Stumpf M (2001):** Biomaterialien zur Versorgung der Narbenhernie.

*Viszeralchirurgie 36: 126-132*

**Schumpelick V, Klinge U, Welty G, Klosterhalfen B (1999a):** Meshes in der Bauchwand.

*Chirurg 70: 876-887*

**Schumpelick V, Klosterhalfen B, Müller M, Klinge U (1999b):** Minimierte Polypropylen-Netze zur präperitonealen Netzplastik (PNP) der Narbenhernie.

*Chirurg 70: 422-430*

**Schraut W, Wendelgass P, Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HWL (1997):**

TNF gene expression in monocytes of low and high responder individuals.

*Cytokine 9 (3): 206-211*

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

*J Immunol Methods 90: 65-70*

**Takahashi K, Naito M, Takeya M (1996):** Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways.

*Pathol Int 46: 473-485*

**Tang L, Jennings TA, Eaton JW (1998a):** Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials.

*Proc Natl Acad Sci USA 95: 8841-8846*

**Tang L, Liu L, Elwing HB (1998b):** Complement activation and inflammation triggered by model biomaterial surfaces.

*J Biomed Mater Res 41: 333-340*

**Tang L, Lucas AH, Eaton JW (1993):** Inflammatory responses to implanted polymeric biomaterials: Role of surface-adsorbed immunoglobulin G.

*J Lab Clin Med 122 (3): 292-300*

**Tang L, Ugarova TP, Plow EF, Eaton JW (1996):** Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials.

*J Clin Invest* 97 (5): 1329-1334

**Telford W, King LE, Fraker PJ (1998):** Simultaneous analysis of DNA content and surface immunophenotype using gentle ethanol fixation techniques.

In: *Robinson JP (Hrsg.): Purdue Cytometry CD-Rom Series 4, Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, USA*

**Thompson CB (1995):** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.

*Science* 267: 1456-1462

**Usher FC, Ochsner J, Tuttle LL Jr (1958):** Use of marlex mesh in the repair of incisional hernias.

*Am Surg* 24: 969-974

**Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995):** A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.

*J Immunol Methods* 184: 39-51

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

*Zentralbl Chir* 122: 885-888

**Wang J, Wang S, Lu Y, Weng Y, Gown AM (1994):** GM-CSF and M-CSF expression is associated with macrophage proliferation in processing and regressing rabbit atheromatous lesions.

*Exp Mol Pathol* 61: 109-118

**Wegener S, Müller-Eckhardt G (1998):** Zellisolierung.

*DGI Technisches Handbuch Histokompatibilität & Immunogenetik 1998, B: 12-16*

**Welty G, Klinge U, Klosterhalfen B, Kasperk R, Schumpelick V (2001):** Functional impairment and complaints following incisional hernia repair with different polypropylene meshes.

*Hernia 5: 142-147*

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

*Chirurg 70: 847-857*

**Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990):** CD14, a receptor for complexes of LPS and LPS Binding Protein.

*Science 249: 1431-1433*

**Xing S, Waddell JE, Boynton EL (2002):** Changes in macrophage morphology and prolonged cell viability following exposure to polyethylene particulate in vitro.

*Microsc Res Tech 57: 523-529*

**Ziegler-Heitbrock HWL (2000):** Definition of human blood monocytes.

*J Leukoc Biol 67: 603-606*

**Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ (1993):** CD14: Cell surface receptor and differentiation marker.

*Immunol Today 14 (3): 121-125*

## 7 Abkürzungen

Aqua bidest.	zweifach destiliertes Wasser
Arg	Arginin
BD	Becton Dickinson
Boc	Butoxycarbonylamino-säure
B-Zelle	B-Lymphozyt (B = bone)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cr	Chrom
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destiliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	(engl.:) enzyme-linked immuno sorbent assay
engl.	englisch
et al.	und andere (lat.: et altera)
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenz
G	Erdbeschleunigung ( $G = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
g	Gramm
g/m <sup>2</sup>	Gramm pro Quadratmeter
g/ml	Gramm pro Milliliter
g/mol	Gramm pro Mol
G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> -Phase	Zellzyklusphase zwischen der S- und M-Phase (G = gap (engl.: Lücke))
Gly	Glycin

---

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
h	Stunde(n) (lat.: hora)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HSP	Hitze-schock-protein
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL	Interleukin
IQB	Interquartilenbereich
immun.	immunologisch
Inc.	incorporated (engl.: eingetragen)
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo Dalton
kg/cm <sup>2</sup>	Kilogramm pro Quadratzentimeter
l	Liter
LAL	Limulus Amöbozyten-Lysat
lat.	lateinisch
LBP	LPS-Binding-Protein
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozyten Separationsmedium
m	männlich
M 1,2	Markierung 1, Markierung 2
M	Molar
mCD14	membranständiges CD14
MCP-1	membrane cofactor protein
min	Minute(n)
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
$\mu$ m	Mikrometer
Mn	Mangan

---

M-Phase	Mitose-Phase
MTF	Monocyte tissue factor (engl.: Monozyten Gewebefaktor)
NaCl	Natriumchlorid
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
Ni	Nickel
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
P	Phosphor
P	probability (engl.: Wahrscheinlichkeit)
PBMNC	peripheral blood mononuclear cell(s) (engl.: periphere mononukleäre Blutzelle(n))
PBS	Phosphate buffered saline
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pg/ml	Picogramm pro Milliliter
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pH	(lat.: pondus hydrogenii) Säuregrad ( $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ )
PI	Propidium Iodid
p-NA	para-Nitroanilin
PP	Polypropylen
PS	Phosphatidylserin
PTFE	Polytetrafluorethylen
R	Region
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
S	Schwefel
sCD14	soluble (engl. lösliches) CD14
SD	Standardabweichung
Si	Silicium
s. o.	siehe oben
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
St.	Saint
TC	tissue culture (engl.: Gewebekultur)

---

TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
T-Zelle	T-Lymphozyt (T = Thymus)
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
v. a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w	weiblich
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
$\emptyset$	Durchmesser

## 8 Anhang

### 8.1 Materialien

#### 8.1.1 Nähr- und Kulturmedien

FKS (Fetales Kälberserum)	FKS, 50 min bei 56 °C hitzeinaktiviert (Fa. Gibco Invitrogen corporation, Berlin)
Kulturmedium	RPMI 1640 „Kulturmedium without L-Glutamine“, 500 ml, Nr. 31870-025 (Fa. Gibco Invitrogen corporation, Berlin)
Separationsmedium	Lymphozyten Separations Medium LSM 1007, 500ml Nr. J15-004 (Fa. PAA Laboratories, Cölbe)

#### 8.1.2 Lösungen

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

Alkohol-Lösung	70 % Ethanol in ddH <sub>2</sub> O (Apotheke UKSH Campus Lübeck)
Annexin-V Binding Buffer	0,1 M HEPES, pH 7,4, 1,4 mM NaCl; 25 mM CaCl <sub>2</sub> (Apoptosis detection Kit I, Pharmingen Heidelberg)
FACS-Diluid	Diluid, Azide Free, 20 l, Nr. N31032 (Fa. JT Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA)
Natriumazid-Lösung	0,1 % Natriumazid in PBS aus: Natriumazid reinst (NaN <sub>3</sub> , M = 65,01 g/mol), 100 g, Nr. K17991588 (Fa. E. Merck, Darmstadt)

---

Phosphate buffered saline (PBS)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x7 H <sub>2</sub> O; 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 0,25% (v/v) (Fa. Gibco Invitrogen corporation, Berlin)
Propidiumiodid-Lösung	50 µg PI/ml PBS, Apoptosis detection Kit I (Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
staining buffer	2 % FKS in PBS mit 0,1 % Natriumazid
Trypanblau-Lösung	Trypan blue solution 0,4 % (Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA)

### 8.1.3 Antikörper und Färbemethoden

Annexin-V-Antikörper	Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Nr. 556547 (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
CD14-Antikörper	CD14-PerCP-Antikörper, Nr. 34578 (Fa. BD Biosciences, Heidelberg)
Lipopolysaccharid (LPS)	LPS from E. coli (026:B6), 10 mg, Nr. L8274 (Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
MIB-1-Antikörper	FITC-konjugiertes monoklonales Mäuse anti- humanes Ki-67 Antigen, Nr. F 0788 (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark)

### 8.1.4 Materialien

Polypropylen-Netze	Prolene <sup>®</sup> , Vypro <sup>®</sup> II (Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt)
12-Lochplatte	Cellstar <sup>®</sup> , TC-Plate, 12-well, ø 22 mm, sterile with lid, Nr. 665 180 (Fa. Greiner bio-one, Solingen)

### 8.1.5 Software

CellQuest <sup>®</sup>	Version 3.2 (Fa. BD Biosciences, Heidelberg)
SPSS für Windows	Version 11.5.1 (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA)

### 8.1.6 Geräte

Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero (Fa. Heraeus, Osterode)
Durchflusszytometer	FACScan <sup>®</sup> (Fa. BD Biosciences, Heidelberg)
Mikroskop	Axiovert 10 (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen)
Sterile Werkbank	BSB 4 A, (Fa. GELAIRE Flow Laboratories, Meckenheim)
Sterilisator	Vernichtungs-Sterilisator, Modell CS-V (Fa. Webeco, Bad Schwartau)

---

Zählkammer	Typ Neubauer (Fa. Brand, Ludwighafen)
Zentrifuge	Rotanta/TR Hettich (Fa. Andreas Hettich, Tuttlingen)

## **8.2 Färbeprotokolle**

### **8.2.1 Ficoll (Lymphozyten-Separation)**

- 10 ml Blut in spez. NH1-Heparin-Röhrchen oder buffy coat
- Blut mit 7 ml PBS versetzen und mischen (50 ml Zentrifugenröhrchen)
- 2 Zentrifugenröhrchen (15 ml) mit 5 ml Ficoll'schem Reagenz (Lymphozyten-Separationsmedium: Endotoxin-tested, steril filtered) vorbereiten
- je 5 ml des Blutgemisches langsam über das Ficoll'sche Reagenz schichten
- 30 min bei 4 °C und 1380 U/min (400 G) mit Bremse zentrifugieren
- mit Pasteurpipette den Leukozytenring abheben
- Leukozytenfraktion 2 x mit 5 ml PBS-Puffer spülen
- 10 min bei 4 °C und 1200 U/min (300 G) mit Bremse zentrifugieren
- 3. Spülung mit 5 ml RPMI-1640-Medium (-L-Glutamine)
- 10 min bei 4 °C und 1200 U/min (300 G) mit Bremse zentrifugieren
- Pellet in 1 ml PBS-Puffer lösen

### **8.2.2 Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und CD14**

- Zellen 2 x mit PBS waschen
- mit 1 x Binding Buffer resuspendieren (Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen / ml)
- 100 µl der Lösung ( $1 \times 10^5$  Zellen) in 5 ml Röhrchen
- 5 µl Annexin V-FITC und 20 µl CD14-Antikörper
- vortexen und bei 25 °C 15 - 30 Min im Dunkeln inkubieren
- 400 µl 1 x Binding Buffer hinzufügen
- am FACScan innerhalb einer Stunde messen

### 8.2.3 Ethanol-Doppelfärbung mit CD-14 und Ki-67

- 500 µl Zellsuspension mit 500 µl PBS mit Natriumazid (0,1 %) waschen und 5 min bei 4 °C und 1200 U/min abzentrifugieren
- 20 µl CD-14 Antikörper hinzufügen und für 15 - 30 Minuten im Dunkeln inkubieren
- mit 500 µl staining buffer waschen und 5 min bei 4 °C und 1200 U/min abzentrifugieren
- mit 500 µl PBS + Natriumazid waschen und 5 min bei 4 °C und 1200 U/min abzentrifugieren
- Pellet in 300 µl PBS + 50 % FKS resuspendieren und unter ständigem Schütteln 900 µl kalten 70 % Ethanol in ddH<sub>2</sub>O tropfenweise hinzufügen  
(Ausflockungen des FKS sind möglich, beeinträchtigen das Ergebnis aber nicht, da sie in den nächsten Schritten ausgewaschen werden.)
- Im Kühlschrank bei 4 °C für mindestens 2 h oder über Nacht inkubieren
- Zellsuspension 2 x mit 500 µl kaltem PBS + Natriumazid waschen und je 5 min bei 4° C und 1200 U/min abzentrifugieren
- 1 µl FITC- Ki-67-Antikörper hinzufügen, gut mischen und für 45 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubieren
- mit PBS + Natriumazid waschen und 5 min bei 4 °C und 1200 U/min abzentrifugieren
- in 400 µl FACSDiluid resuspendieren
- am FACS messen

### 8.3 Buffy coat Identifikationsnummern

Versuchsgruppe	Nummer	Alter	Geschlecht
<b>Prolene</b>	3417355	56	w
	3418671	19	w
	3419262	62	m
	3419266	61	m
	3419911	65	m
	3419894	64	m
	3421832	31	w
	3421838	54	m
	3422519	44	w
	3422502	45	m
<b>Vypro</b>	3423769	41	m
	3423772	38	m
	3424296	25	m
	3424299	63	m
	3424292	50	m
	3425236	42	w
	3425226	44	w
	3425222	64	m
	3425238	42	w
	3425221	48	w

**Tabelle 8.1: Anonymisierte Daten zu den verwendeten buffy coats**  
(Alter angegeben in Jahren, m = männlich, w = weiblich)

## 8.4 Datensätze

### 8.4.1 Prolene®

#### 8.4.1.1 Monozytenzellzahlen

	<b>Kontrolle 24h</b>	<b>mit Netz 24h</b>	<b>mit LPS 24h</b>
	36,1	39,2	43,0
	52,4	54,3	58,2
	42,2	44,8	47,3
	43,2	44,0	46,3
	47,3	43,0	47,0
	55,8	59,4	60,0
	48,1	45,0	42,1
	39,0	43,3	51,6
	38,8	34,6	38,7
	39,2	38,3	46,4
	50,4	50,4	63,7
	54,0	53,3	61,8
<b>Median</b>	<b>45,2</b>	<b>44,4</b>	<b>47,2</b>
<b>SD</b>	<b>6,7</b>	<b>7,3</b>	<b>8,4</b>
<b>IQB</b>	<b>39,2 - 50,9</b>	<b>42,0 - 51,1</b>	<b>45,4 - 58,6</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>36,1 - 55,8</b>	<b>34,6 - 59,42</b>	<b>38,7 - 63,7</b>
	<b>Kontrolle 48h</b>	<b>mit Netz 48h</b>	<b>mit LPS 48h</b>
	38,9	30,7	53,1
	52,1	49,0	61,5
	16,7	20,5	35,8
	37,0	33,9	36,8
	44,9	28,9	51,5
	40,0	37,9	56,7
	54,9	41,1	51,1
	22,9	36,0	42,5
	43,8	49,0	67,0
	56,3	50,4	64,9
<b>Median</b>	<b>41,9</b>	<b>37,0</b>	<b>52,3</b>
<b>SD</b>	<b>13,0</b>	<b>9,8</b>	<b>11,0</b>
<b>IQB</b>	<b>37,5 - 50,3</b>	<b>31,5 - 47,0</b>	<b>44,6 - 60,3</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>16,7 - 56,3</b>	<b>20,5 - 50,4</b>	<b>35,8 - 67,0</b>

	<b>Kontrolle 72h</b>	<b>mit Netz 72h</b>	<b>mit LPS 72h</b>
	36,8	36,8	48,2
	39,5	33,6	53,3
	32,2	24,0	47,0
	38,7	30,6	43,6
	29,0	21,7	35,5
	47,6	25,3	48,9
	44,4	32,1	51,6
	26,9	28,7	47,9
	50,6	25,5	58,1
	31,3	19,4	31,6
	51,7	43,4	61,6
	50,3	45,0	55,4
<b>Median</b>	<b>39,1</b>	<b>29,6</b>	<b>48,6</b>
<b>SD</b>	<b>8,9</b>	<b>8,1</b>	<b>8,7</b>
<b>IQB</b>	<b>32,0 - 48,3</b>	<b>25,0 - 34,4</b>	<b>46,2 - 58,8</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>26,9 - 51,7</b>	<b>19,4 - 45,0</b>	<b>31,6 - 61,6</b>
	<b>Kontrolle 96h</b>	<b>mit Netz 96h</b>	<b>mit LPS 96h</b>
	42,5	31,5	53,8
	33,8	25,8	50,9
	31,3	22,4	40,7
	25,7	17,3	37,2
	40,4	22,5	39,9
	43,5	27,3	54,8
	36,0	21,1	46,9
	42,2	26,8	42,6
	31,9	18,8	40,6
	51,3	39,2	60,2
	40,1	31,4	52,2
<b>Median</b>	<b>40,1</b>	<b>25,8</b>	<b>46,9</b>
<b>SD</b>	<b>7,1</b>	<b>6,4</b>	<b>7,5</b>
<b>IQB</b>	<b>32,9 - 42,3</b>	<b>21,8 - 29,4</b>	<b>40,7 - 53,0</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>25,7 - 51,3</b>	<b>17,3 - 39,2</b>	<b>37,2 - 60,2</b>

Tabelle 8.2: Einzelmesswerte der Monozytenzellzahlen in den Versuchsansätzen mit Prolene®-Netz

Alle Angaben in Prozent (%)

IQB = Interquartilenbereich

SD = Standardabweichung

## 8.4.1.2 Apoptose

	<b>Kontrolle 24h</b>	<b>mit Netz 24h</b>	<b>mit LPS 24h</b>
	39,2	40,2	16,3
	24,8	19,2	
	21,8	21,2	17,2
	37,4	39,9	10,4
	34,0	19,6	2,2
	41,8	27,8	11,3
	41,0	26,7	18,6
	23,1	18,0	10,6
	31,8	35,4	14,0
<b>Median</b>	<b>34,0</b>	<b>26,7</b>	<b>12,6</b>
<b>SD</b>	<b>7,8</b>	<b>8,9</b>	<b>5,2</b>
<b>IQB</b>	<b>24,8 - 39,2</b>	<b>19,6 - 35,4</b>	<b>10,6 - 16,6</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>21,8 - 41,8</b>	<b>18,0 - 40,2</b>	<b>2,2 - 18,6</b>
	<b>Kontrolle 48h</b>	<b>mit Netz 48h</b>	<b>mit LPS 48h</b>
	50,3	26,6	19,3
	19,3	14,0	14,5
	24,9	25,9	2,7
	26,0	16,9	14,6
	28,7	10,1	31,8
	30,4	22,4	28,8
	28,8	29,0	17,9
<b>Median</b>	<b>28,7</b>	<b>22,4</b>	<b>17,9</b>
<b>SD</b>	<b>9,7</b>	<b>7,1</b>	<b>9,7</b>
<b>IQB</b>	<b>25,5 - 29,6</b>	<b>15,5 - 26,3</b>	<b>14,5 - 24,0</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>19,3 - 50,3</b>	<b>10,1 - 29,0</b>	<b>2,7 - 31,8</b>
	<b>Kontrolle 72h</b>	<b>mit Netz 72h</b>	<b>mit LPS 72h</b>
	69,4	22,3	17,3
	23,4	22,7	10,5
	33,8	20,8	16,4
	40,7	16,8	5,5
	26,3	15,0	2,5
	42,1	24,1	13,9
	36,7	13,1	20,3
	30,8	10,7	3,1
	25,5	10,4	10,2
<b>Median</b>	<b>33,8</b>	<b>16,8</b>	<b>10,5</b>
<b>SD</b>	<b>14,0</b>	<b>5,3</b>	<b>6,4</b>
<b>IQB</b>	<b>26,3 - 40,7</b>	<b>13,1 - 22,3</b>	<b>5,5 - 16,4</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>23,4 - 69,4</b>	<b>10,4 - 24,1</b>	<b>2,5 - 20,3</b>

	<b>Kontrolle 96h</b>	<b>mit Netz 96h</b>	<b>mit LPS 96h</b>
	79,2	41,0	31,0
	74,0	30,2	18,9
	70,9	39,0	22,0
	46,3	25,2	18,8
	36,9	24,7	3,0
	45,6	22,4	38,8
	41,9	29,5	26,1
	44,7	26,5	27,6
	57,0	29,2	16,2
<b>Median</b>	<b>46,3</b>	<b>29,2</b>	<b>22,0</b>
<b>SD</b>	15,7	6,4	10,1
<b>IQB</b>	<b>44,7 - 70,9</b>	<b>25,2 - 30,2</b>	<b>18,8 - 27,6</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>36,9 - 79,2</b>	<b>22,4 - 41,0</b>	<b>3,0 - 38,8</b>

Tabelle 8.3: Einzelmesswerte der Apoptoserate in den Versuchsansätzen mit Prolene®-Netz

Alle Angaben in Prozent (%)

#### 8.4.1.3 Proliferation

	<b>Kontrolle 24h</b>	<b>mit Netz 24h</b>	<b>mit LPS 24h</b>
	43,2	80,3	89,4
	64,8	75,9	90,5
	46,9	77,9	79,9
	69,3	69,4	78,0
	42,4	72,7	62,6
	50,2	73,4	87,7
	65,8	74,4	87,9
	41,9	67,8	87,3
	36,8	80,1	97,2
	49,0	73,8	95,6
	64,3	82,5	72,8
<b>Median</b>	<b>49,0</b>	<b>74,4</b>	<b>87,7</b>
<b>SD</b>	11,6	4,6	10,3
<b>IQB</b>	<b>42,8 - 64,5</b>	<b>73,1 - 79,0</b>	<b>79,0 - 90,0</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>36,8 - 69,3</b>	<b>67,8 - 82,5</b>	<b>62,6 - 97,2</b>

	<b>Kontrolle 48h</b>	<b>mit Netz 48h</b>	<b>mit LPS 48h</b>
	23,8	51,9	62,5
	46,2	48,9	86,1
	32,8	61,1	54,4
	46,1	46,0	74,4
	58,2	32,1	84,3
	37,4	59,5	88,0
	28,4	52,5	91,0
	58,5	57,6	82,7
	62,7	66,2	84,9
<b>Median</b>	<b>46,1</b>	<b>52,5</b>	<b>84,3</b>
<b>SD</b>	<b>14,1</b>	<b>10,1</b>	<b>12,5</b>
<b>IQB</b>	<b>32,8 - 58,2</b>	<b>48,9 - 59,5</b>	<b>74,4 - 86,1</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>23,8 - 62,7</b>	<b>32,1 - 66,2</b>	<b>54,4 - 91,0</b>
	<b>Kontrolle 72h</b>	<b>mit Netz 72h</b>	<b>mit LPS 72h</b>
	39,8	64,2	78,8
	22,2	35,1	54,4
	42,0	64,4	68,1
	51,8	57,6	70,8
	49,1	40,2	62,0
	60,0	56,2	85,6
	42,0	34,9	84,0
	48,1	62,8	83,4
	35,8	65,4	83,9
	31,4	32,9	58,9
<b>Median</b>	<b>42,0</b>	<b>56,9</b>	<b>74,8</b>
<b>SD</b>	<b>10,8</b>	<b>13,8</b>	<b>11,7</b>
<b>IQB</b>	<b>36,8 - 48,9</b>	<b>36,3 - 63,8</b>	<b>63,5 - 83,8</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>22,2 - 60,0</b>	<b>32,9 - 65,4</b>	<b>54,4 - 85,6</b>
	<b>Kontrolle 96h</b>	<b>mit Netz 96h</b>	<b>mit LPS 96h</b>
	33,3	46,0	72,0
	29,4	53,4	43,4
	56,0	74,8	71,9
	39,5	62,5	68,6
	42,8	48,8	71,5
	50,2	39,8	55,2
	44,1	59,6	85,4
	27,5	52,8	82,7
	36,7	60,3	59,4
	38,9	49,6	63,2
<b>Median</b>	<b>39,2</b>	<b>53,1</b>	<b>70,0</b>
<b>SD</b>	<b>8,9</b>	<b>9,9</b>	<b>12,6</b>
<b>IQB</b>	<b>34,1 - 43,8</b>	<b>49,0 - 60,2</b>	<b>60,4 - 72,0</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>27,5 - 56,0</b>	<b>39,9 - 74,8</b>	<b>43,4 - 85,4</b>

**Tabelle 8.4: Einzelmesswerte der Proliferationsrate in den Versuchsansätzen mit Prolene®-Netz**  
**Alle Angaben in Prozent (%)**

## 8.4.2 Vypro® II

### 8.4.2.1 Monozytenzellzahlen

	<b>Kontrolle 24h</b>	<b>mit Netz 24h</b>	<b>mit LPS 24h</b>
	54,3	54,2	60,3
	46,5	54,1	58,0
	59,8	59,3	58,2
	51,1	54,7	58,3
	49,5	52,1	58,9
	41,7	33,5	49,7
	45,5	52,3	55,6
	43,8	48,2	58,3
	42,5	48,9	46,6
	37,1	36,7	42,8
<b>Median</b>	<b>46,0</b>	<b>52,2</b>	<b>58,1</b>
<b>SD</b>	<b>6,7</b>	<b>8,2</b>	<b>6,1</b>
<b>IQB</b>	<b>42,8 - 50,7</b>	<b>48,4 - 54,2</b>	<b>51,2 - 58,3</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>37,1 - 59,8</b>	<b>33,5 - 59,3</b>	<b>42,8 - 60,3</b>
	<b>Kontrolle 48h</b>	<b>mit Netz 48h</b>	<b>mit LPS 48h</b>
	39,9	33,7	54,1
	31,9	37,8	53,0
	58,7	31,6	57,7
	47,1	45,5	52,0
	43,1	45,3	51,4
	44,0	37,1	50,9
	44,7	43,2	60,9
	40,1	41,4	55,0
	38,1	38,8	57,6
	33,4	33,6	44,5
<b>Median</b>	<b>41,6</b>	<b>38,3</b>	<b>53,5</b>
<b>SD</b>	<b>7,6</b>	<b>5,0</b>	<b>4,6</b>
<b>IQB</b>	<b>38,5 - 44,5</b>	<b>34,6 - 42,7</b>	<b>51,6 - 57,0</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>31,9 - 58,7</b>	<b>31,6 - 45,5</b>	<b>44,5 - 60,9</b>

	<b>Kontrolle 72h</b>	<b>mit Netz 72h</b>	<b>mit LPS 72h</b>
	26,1	18,3	47,2
	48,7	38,4	55,9
	36,3	36,4	43,6
	44,8	31,1	39,5
	37,3	23,8	43,7
	43,4	39,7	55,7
	53,6	44,4	61,3
	40,8	28,0	53,3
	41,0	32,3	55,0
	34,0	27,9	51,8
<b>Median</b>	<b>40,9</b>	<b>31,7</b>	<b>52,5</b>
<b>SD</b>	<b>7,8</b>	<b>7,9</b>	<b>6,9</b>
<b>IQB</b>	<b>36,6 - 44,5</b>	<b>27,9 - 37,9</b>	<b>44,6 - 55,5</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>26,1 - 53,6</b>	<b>18,3 - 44,4</b>	<b>39,5 - 61,3</b>
	<b>Kontrolle 96h</b>	<b>mit Netz 96h</b>	<b>mit LPS 96h</b>
	43,4	22,9	43,2
	19,2	30,1	50,9
	28,6	20,1	53,5
	42,2	13,2	54,4
	42,0	28,2	51,1
	36,6	21,3	54,3
	42,3	34,2	56,0
	36,4	22,6	54,5
	37,3	21,6	54,5
	29,4	21,5	42,3
<b>Median</b>	<b>36,9</b>	<b>22,1</b>	<b>53,9</b>
<b>SD</b>	<b>7,8</b>	<b>5,9</b>	<b>4,9</b>
<b>IQB</b>	<b>31,1 - 42,2</b>	<b>21,3 - 26,9</b>	<b>42,3 - 42,3</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>19,2 - 43,4</b>	<b>13,2 - 34,2</b>	<b>42,3 - 56,0</b>

**Tabelle 8.5: Einzelmesswerte der Monozytenzellzahlen in den Versuchsansätzen mit Vypro®II –Netz**  
**Alle Angaben in Prozent (%)**

## 8.4.2.2 Apoptose

	<b>Kontrolle 24h</b>	<b>mit Netz 24h</b>	<b>mit LPS 24h</b>
	40,8	20,3	20,2
	56,4	39,7	10,4
	20,3	13,7	4,8
	30,6	13,3	14,5
	23,4	20,4	16,2
	31,9	26,7	13,0
	38,6	24,5	12,4
	28,3	16,4	10,4
	22,5	27,5	13,7
	15,0	31,6	2,7
<b>Median</b>	<b>29,4</b>	<b>22,5</b>	<b>12,7</b>
<b>SD</b>	<b>12,1</b>	<b>8,3</b>	<b>5,1</b>
<b>IQB</b>	<b>22,7 - 36,9</b>	<b>17,4 - 27,3</b>	<b>10,4 - 14,3</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>15,0 - 56,4</b>	<b>13,3 - 39,7</b>	<b>2,7 - 20,2</b>
	<b>Kontrolle 48h</b>	<b>mit Netz 48h</b>	<b>mit LPS 48h</b>
	29,5	9,1	17,9
	22,6	19,7	12,8
	20,8	18,9	11,0
	12,7	26,0	8,8
	17,8	22,4	9,0
	47,8	33,9	13,7
	41,6	33,5	17,0
	59,2	37,7	24,9
	34,5	34,9	24,5
	35,7	35,5	12,0
<b>Median</b>	<b>32,0</b>	<b>29,7</b>	<b>13,2</b>
<b>SD</b>	<b>14,5</b>	<b>9,4</b>	<b>5,9</b>
<b>IQB</b>	<b>21,3 - 40,1</b>	<b>20,4 - 34,7</b>	<b>11,2 - 17,7</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>12,7 - 59,2</b>	<b>9,11 - 37,7</b>	<b>8,8 - 24,9</b>
	<b>Kontrolle 72h</b>	<b>mit Netz 72h</b>	<b>mit LPS 72h</b>
	32,6	12,6	25,4
	39,6	31,0	19,7
	16,0	18,7	8,7
	23,0	23,1	7,6
	30,2	25,4	14,7
	38,7	31,6	4,9
	45,4	22,4	9,3
	64,1	29,3	8,3
	29,5	22,0	12,7
	35,0	36,1	9,6
<b>Median</b>	<b>33,8</b>	<b>24,2</b>	<b>9,4</b>
<b>SD</b>	<b>13,1</b>	<b>6,9</b>	<b>6,3</b>
<b>IQB</b>	<b>29,7 - 39,4</b>	<b>22,1 - 30,6</b>	<b>8,4 - 14,2</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>16,0 - 64,1</b>	<b>12,6 - 36,1</b>	<b>4,9 - 25,4</b>

	<b>Kontrolle 96h</b>	<b>mit Netz 96h</b>	<b>mit LPS 96h</b>
	51,0	49,5	14,2
	70,9	38,3	18,8
	41,7		18,8
	32,9	37,4	9,0
	30,9	37,9	7,9
	31,2	30,4	7,5
	58,5	21,7	8,1
	42,1	31,5	7,8
	35,0	15,2	8,2
	28,7	26,8	12,0
<b>Median</b>	<b>38,3</b>	<b>31,5</b>	<b>8,6</b>
<b>SD</b>	<b>13,9</b>	<b>10,2</b>	<b>4,5</b>
<b>IQB</b>	<b>31,7 - 48,8</b>	<b>26,8 - 37,9</b>	<b>7,9 - 13,6</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>28,7 - 70,9</b>	<b>15,2 - 49,5</b>	<b>7,5 - 18,8</b>

Tabelle 8.6: Einzelmesswerte der Apoptoserate in den Versuchsansätzen mit Vypro®II-Netz

Alle Angaben in Prozent (%)

#### 8.4.2.3 Proliferation

	<b>Kontrolle 24h</b>	<b>mit Netz 24h</b>	<b>mit LPS 24h</b>
	53,2	60,6	70,0
	55,0	69,0	73,4
	56,1	63,2	71,5
	50,7	57,0	77,0
	45,2	63,4	69,1
	56,9	62,8	79,9
	46,5	66,3	67,7
	41,0	69,8	68,1
	43,9	69,7	69,3
	63,4	66,5	69,8
<b>Median</b>	<b>51,9</b>	<b>64,8</b>	<b>69,9</b>
<b>SD</b>	<b>7,0</b>	<b>4,2</b>	<b>4,0</b>
<b>IQB</b>	<b>45,5 - 55,8</b>	<b>62,9 - 68,4</b>	<b>69,1 - 72,9</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>41,0 - 63,4</b>	<b>57,0 - 69,8</b>	<b>67,7 - 79,9</b>

	<b>Kontrolle 48h</b>	<b>mit Netz 48h</b>	<b>mit LPS 48h</b>
	54,5	44,1	74,9
	45,7	40,4	77,6
	45,5	36,5	76,3
	61,1	54,8	84,3
	51,6	42,8	84,3
	44,4		
	57,0	50,2	73,2
	44,5	43,1	76,1
	49,1	49,9	83,7
<b>Median</b>	<b>49,1</b>	<b>43,6</b>	<b>76,9</b>
<b>SD</b>	<b>6,1</b>	<b>6,0</b>	<b>4,6</b>
<b>IQB</b>	<b>45,5 - 54,5</b>	<b>42,2 - 50,0</b>	<b>75,8 - 83,9</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>44,4 - 61,1</b>	<b>36,5 - 54,8</b>	<b>73,2- 84,3</b>
	<b>Kontrolle 72h</b>	<b>mit Netz 72h</b>	<b>mit LPS 72h</b>
	35,9	22,2	69,3
	39,2	29,0	82,7
	45,9	27,5	82,3
	43,7	36,5	71,9
	42,4	32,7	73,6
	39,9	33,9	66,4
	43,5	38,3	69,6
	37,0	35,4	68,3
	35,9	34,2	62,9
	40,1	35,9	70,5
<b>Median</b>	<b>40,0</b>	<b>34,0</b>	<b>70,1</b>
<b>SD</b>	<b>3,5</b>	<b>4,9</b>	<b>6,4</b>
<b>IQB</b>	<b>37,5 - 43,2</b>	<b>29,9 - 35,8</b>	<b>68,6 - 73,2</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>35,9 - 45,9</b>	<b>22,2 - 38,3</b>	<b>62,9 - 82,7</b>
	<b>Kontrolle 96h</b>	<b>mit Netz 96h</b>	<b>mit LPS 96h</b>
	31,2	23,2	62,4
	34,2	17,2	52,1
	39,8	25,3	58,1
	29,1	22,0	62,8
	35,3	17,6	63,2
	26,4	19,6	59,2
	35,0	22,6	67,3
	34,2	19,8	69,7
	40,2	28,2	61,4
	32,4	23,3	67,6
<b>Median</b>	<b>34,2</b>	<b>22,3</b>	<b>62,6</b>
<b>SD</b>	<b>4,3</b>	<b>3,4</b>	<b>5,2</b>
<b>IQB</b>	<b>31,5 - 35,2</b>	<b>19,6 - 23,3</b>	<b>59,8 - 66,3</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>26,4 - 40,2</b>	<b>17,2 - 28,2</b>	<b>52,1 - 69,7</b>

**Tabelle 8.7: Einzelmesswerte der Proliferationsrate in den Versuchsansätzen mit Vypro® II-Netz**  
**Alle Angaben in Prozent (%)**

### 8.4.3 Autoklaviertes Prolene®

#### 8.4.3.1 Monozytenzellzahlen

	Prolene autoklaviert 24h	Prolene autoklaviert 48h	Prolene autoklaviert 72h	Prolene autoklaviert 96h
	12,3	3,2	2,5	7,3
	22,8	5,2	0,5	6,1
	16,1	3,8	0,4	0,7
<b>Median</b>	<b>16,1</b>	<b>3,8</b>	<b>0,5</b>	<b>6,1</b>
<b>SD</b>	<b>5,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>3,5</b>
<b>IQB</b>	<b>14,2 - 19,5</b>	<b>3,5 - 4,5</b>	<b>0,5 - 1,5</b>	<b>3,4 - 6,7</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>12,3 - 22,8</b>	<b>3,2 - 5,2</b>	<b>0,4 - 2,5</b>	<b>0,7 - 7,3</b>

Tabelle 8.8: Einzelmesswerte der Monozytenzellzahlen in den Versuchsansätzen mit autoklaviertem Prolene®-Netz

Alle Angaben in Prozent (%)

#### 8.4.3.2 Apoptose

	Prolene autoklaviert 24h	Prolene autoklaviert 48h	Prolene autoklaviert 72h	Prolene autoklaviert 96h
	21,2	20,7	46,3	62,3
	35,7	37,7	46,3	50,3
	24,4	37,0	32,8	43,3
<b>Median</b>	<b>24,4</b>	<b>37,0</b>	<b>46,3</b>	<b>50,3</b>
<b>SD</b>	<b>7,6</b>	<b>9,6</b>	<b>7,8</b>	<b>9,6</b>
<b>IQB</b>	<b>22,8 - 30,1</b>	<b>28,9 - 37,4</b>	<b>39,5 - 46,3</b>	<b>46,8 - 56,3</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>21,2 - 35,7</b>	<b>20,7 - 37,7</b>	<b>32,8 - 46,3</b>	<b>43,3 - 62,3</b>

Tabelle 8.9: Einzelmesswerte der Apoptoserate in den Versuchsansätzen mit autoklaviertem Prolene®-Netz

Alle Angaben in Prozent (%)

#### 8.4.3.3 Proliferation

	Prolene autoklaviert 24h	Prolene autoklaviert 48h	Prolene autoklaviert 72h	Prolene autoklaviert 96h
	44,4	84,7	69,1	44,5
	50,3	91,9	69,9	30,9
	42,8	85,5	62,6	36,3
<b>Median</b>	<b>44,4</b>	<b>85,5</b>	<b>69,1</b>	<b>36,3</b>
<b>SD</b>	<b>4,0</b>	<b>3,9</b>	<b>4,0</b>	<b>6,9</b>
<b>IQB</b>	<b>43,6 - 47,3</b>	<b>85,1 - 88,7</b>	<b>65,8 - 69,5</b>	<b>33,6 - 40,4</b>
<b>Datenbereich</b>	<b>42,8 - 50,3</b>	<b>84,7 - 91,9</b>	<b>62,6 - 69,9</b>	<b>30,9 - 44,5</b>

Tabelle 8.10: Einzelmesswerte der Proliferationsrate in den Versuchsansätzen mit autoklaviertem Prolene®-Netz

Alle Angaben in Prozent (%)

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. M. Duchrow für die Überlassung des Themas sowie die geduldige, freundliche und unterstützende Betreuung. Besonders während des experimentellen Teils haben Deine Erfahrung und Deine Ratschläge zum Gelingen der Experimente beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. Broll bedanke ich mich für die hilfsbereite Unterstützung und die klinischen Denkanstöße.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. H. - P. Bruch, Direktor der Chirurgischen Klinik der Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im chirurgischen Forschungslabor und bei Frau C. Killaitis für die Hilfestellungen bei der Erstellung der Statistik.

Ich danke außerdem Herrn Dr. med. P. Schlenke, Herrn Dr. med. P. Hasselwander und allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin insbesondere dem Direktor Herrn Prof. Dr. med. H. Kirchner für die Bereitstellung der buffy coats und die problemlose und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich zudem 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.

Und last, but not least, möchte ich mich bei meinen Eltern, bei Frank und meinen Freunden für die Unterstützung während der Entstehungsphase dieser Arbeit bedanken.

## 10 Lebenslauf

Persönliches: Maren Ulrike Gehrts  
Kniebisstrasse 29  
70188 Stuttgart  
0711-3000 212

18.12.1978 geboren in Hamburg

*Eltern:*

Hans-Jürgen Gehrts, Baudirektor i. R. an der  
Stadtentwicklungsbehörde Hamburg - Amt für Stadt- und  
Regionalplanung  
Armgard Gehrts, geb. Linse  
Gymnasiallehrerin i. R. für Englisch und Musik

Schulbildung:

1985-1989 Grundschule Goosacker, Hamburg  
1989-1998 Gymnasium Osdorf, Hamburg  
1995-1996 Austauschjahr mit Besuch der Tipton-High-School, Missouri, USA  
26.06.1998 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

Aug.-Okt. 1998 Krankenpflegepraktikum am Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke  
Oktober 1998 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck  
September 1999 freiwilliges Krankenpflegepraktikum am Marienkrankenhaus  
Lübeck  
September 2000 Ärztliche Vorprüfung  
August 2001 1. Staatsexamen  
März 2004 2. Staatsexamen  
Mai 2005 3. Staatsexamen  
Juni 2005 Approbation als Ärztin

Famulaturen: März-April 2001 Chirurgie am Kreiskrankenhaus Heidenheim  
September 2001 Pädiatrie Praxisfamulatur in Hamburg  
Februar 2002 Dermatologie am Universitätsklinikum Lübeck  
Aug.-Sept. 2002 Kardiologie am MidAmericaHeart-Institute,  
St. Lukes-Hospital, Kansas City, Missouri,  
USA  
September 2002 Pädiatrie Praxisfamulatur bei KCPediatrics,  
Kansas City, Missouri, USA  
August 2003 Anästhesie am Klinikum am Steinenberg,  
Reutlingen

---

Praktisches Jahr:	April-Juli 2004	Pädiatrie und Kinderchirurgie am Ostschweizer Kinderspital St. Gallen, Schweiz
	Aug.-Nov. 2004	Innere Medizin an den Sana Kliniken Lübeck
	Dez.-März 2005	Chirurgie am Zuger Kantonsspital, Schweiz

Promotion:

Mai 2002	Annahme des Promotionsthemas am chirurgischen Forschungslabor der Universität Lübeck unter der Betreuung von Herrn PD Dr. rer. nat. M. Duchrow
September 2005 Februar 2006	Fertigstellung der Promotionsarbeit mündliche Promotionsprüfung

Berufliche Tätigkeit:

seit Oktober 2005	Assistenzärztin am Bethesda Krankenhaus Stuttgart, Abteilung für Chirurgie
-------------------	---

Sonstige Aktivitäten:

WS 98/99 Aufnahme in das Orchester der Medizinischen Universität Lübeck (Violine) mit regelmäßigen Konzerten und Konzertreisen, zeitweise Tätigkeit als ehrenamtliche Schatzmeisterin des Orchesters

Lübeck, im Februar 2006