

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

**Wechselwirkung zwischen leichtgewichtigen Herniennetzen
aus Polypropylen verschiedener Hersteller und ausgewählten
humanen Zellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Matthias Friedrich
aus Schwerin
Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Priv. –Doz. Dr. med. Stefan Farke
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Hoch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.07.2009

gez. Prof. Dr. med Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät-

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation veröffentlicht:

Eingereichte Originalarbeit:

Friedrich M, Blumberg C, Meder S, Broll R, Wedel T, Bruch HP, Franke C, Farke S
(2008): Auswirkungen des Resterilisierens auf die Oberflächenstruktur von
leichtgewichtigen Herniennetzen aus Polypropylen – eine in vitro Studie
Zentralblatt Chirurgie (eingereicht Mai 2008)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Hernien und ihre chirurgische Therapie	6
1.1.1. Leistenhernien und Narbenhernien.....	6
1.1.2. Methoden der operativen Therapie.....	6
1.2. Herniennetze als Biomaterialien in der Abdominalchirurgie	8
1.2.1. Entstehung der Herniennetze.....	8
1.2.2. Moderne Herniennetze.....	9
1.2.3. Leichtgewichtige Herniennetze.....	10
1.2.4. Polypropylen als Bestandteil von Herniennetzen.....	10
1.2.5. Verbreitung der Kunststoffnetze.....	11
1.3. Betrachtungen zur Biokompatibilität von Herniennetzen	12
1.3.1. Biokompatibilität und Biofunktionalität.....	12
1.3.2. Probleme bei der Biokompatibilität von Herniennetzen.....	12
1.3.3. Die Fremdkörperreaktion – ein Hauptfaktor der Biokompatibilität....	14
1.4. Marker der zellulären Vitalität	15
1.4.1. Apoptoserate und Proliferationsindex.....	15
1.4.2. Apoptosebestimmung mittels Annexin-V – Protein.....	15
1.4.3. Ki-67 – Marker der Zellproliferation.....	16
1.5. Aufgabenstellung	18
2. Materialien und Methoden	21
2.1. Zellen	21
2.1.1. Verwendete Primärzellen.....	21
2.1.2. Kultivierung der Zellen.....	21
2.1.2.1. Kulturmedium.....	21
2.1.2.2. Mediumwechsel.....	21

2.1.2.3.	Passagieren der Zellen.....	22
2.1.2.4.	Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung.....	22
2.1.2.5.	Kryokonservierung der Zellen.....	22
2.2.	Endotoxintest.....	23
2.3.	Kunststoffnetze.....	23
2.3.1.	Verwendete Kunststoffnetze.....	23
2.3.2.	Aufbereitung der Netze.....	24
2.4.	Zellbiologische Methoden.....	24
2.4.1.	Versuchsaufbau.....	24
2.4.2.	Annexin V-Färbung.....	25
2.4.3.	Ki-67-Färbung.....	25
2.4.4.	Durchflusszytometrie.....	26
2.5.	Rasterelektronenmikroskopie.....	26
2.5.1.	Versuchsaufbau.....	26
2.5.2.	Aufbereitung der Netze.....	26
2.5.3.	Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie.....	27
2.6.	Statistik.....	27
3.	Ergebnisse.....	28
3.1.	Vitalitätsprüfung und Endotoxintest.....	28
3.1.1.	Vitalitätsprüfung.....	28
3.1.2.	Endotoxintest.....	28
3.2.	Durchflußzytometrie MRC 5-Zellen.....	29
3.2.1.	Apoptose.....	29
3.2.1.1.	Atrium [®] ProLite nicht resterilisiert.....	29
3.2.1.2.	Atrium [®] ProLite resterilisiert.....	30
3.2.1.3.	Optilene [®] Mesh LP.....	31
3.2.1.4.	Premilene [®] Mesh LP.....	32

3.2.1.5. Zusammenfassung Apoptose MRC 5.....	33
3.2.2. Proliferation.....	34
3.2.2.1. Atrium® ProLite nicht resterilisiert.....	34
3.2.2.2. Atrium® ProLite resterilisiert.....	35
3.2.2.3. Optilene® Mesh LP.....	36
3.2.2.4. Premilene® Mesh LP.....	37
3.2.2.5. Zusammenfassung Proliferation MRC 5.....	38
3.3. Durchflußzytometrie HeLa-Zellen.....	39
3.3.1. Apoptose.....	39
3.3.1.1. Atrium® ProLite nicht resterilisiert.....	39
3.3.1.2. Atrium® ProLite resterilisiert.....	40
3.3.1.3. Optilene® Mesh LP.....	41
3.3.1.4. Premilene® Mesh LP.....	42
3.3.1.5. Zusammenfassung Apoptose HeLa.....	43
3.3.2. Proliferation.....	44
3.3.2.1. Atrium® ProLite nicht resterilisiert.....	44
3.3.2.2. Atrium® ProLite resterilisiert.....	45
3.3.2.3. Optilene® Mesh LP.....	46
3.3.2.4. Premilene® Mesh LP.....	47
3.3.2.5. Zusammenfassung Proliferation HeLa.....	48
3.4. Rasterelektronenmikroskopie.....	48
3.4.1. Atrium® ProLite.....	49
3.4.1.1. Atrium® ProLite steril.....	49
3.4.1.2. Atrium® ProLite nach Inkubation mit MRC 5-Zellen in Kulturmedium.....	50
3.4.2. Atrium resterilisiert.....	51
3.4.2.1. Rest. Atrium® ProLite ohne Kontakt zu MRC 5-Zellen und Medium.....	51
3.4.2.2. Rest. Atrium® ProLite nach Inkubation mit MRC 5-Zellen in Kulturmedium.....	52

3.4.3. Optilene® Mesh LP.....	53
3.4.3.1. Optilene® Mesh LP steril.....	53
3.4.3.2. Optilene nach Inkubation mit MRC 5-Zellen in Kulturmedium.	54
4. Diskussion.....	55
4.1. Das in vitro Modell.....	56
4.2. Vergleich der unterschiedlichen Netze.....	57
4.2.1. MRC 5-Zellen.....	57
4.2.2. HeLa-Zellen.....	59
4.3. Elektronenmikroskopie.....	60
5. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis.....	65
7. Abkürzungen.....	73
8. Anhang.....	75
8.1. Nähr- und Kulturmedien.....	75
8.1.1. Einfriermedium.....	75
8.1.2. FKS (Fötale Kälberserum).....	75
8.1.3. MRC 5 Kulturmedium.....	75
8.1.4. HeLa Kulturmedium.....	75
8.2. Lösungen.....	75
8.2.1. Phosphate buffered saline (PBS, Gibco BRL, Berlin.....	75
8.2.2. 0,25% (v/v) Triton-x 100 Lösung.....	75

8.2.3. Paraformaldehyd-Lösung.....	75
8.2.4. Annexin V Binding Buffer (Apoptosis detection Kit I, Pharmingen Heidelberg).....	76
8.2.5. Propidiumiodid-Lösung (Apoptosis detection Kit I).....	76
8.3. Antikörper.....	76
8.4. Geräte.....	76
9. Einzelwerte der durchflusszytometrischen Untersuchung.....	78
10. Danksagungen.....	84
11. Lebenslauf.....	85

1. Einleitung

1.1. Hernien und ihre chirurgische Therapie

1.1.1. Leistenhernien und Narbenhernien

Die typische Leistenhernie tritt meist vor dem 50. Lebensjahr und mit einem Verhältnis von 9:1 vornehmlich bei Männern auf. Ursache ist oft eine angeborene Bindegewebsschwäche. An einem bestimmten Punkt (Locus minoris resistentiae) oberhalb des Leistenbandes kommt es dann zu einer sackförmigen Ausstülpung des parietalen Peritoneums, in welche Baucheingeweide eindringen können. Der therapeutische Ansatz ist immer chirurgisch. Dies gilt auch für Narbenhernien, die nach Operationen am Abdomen entstehen können. Durch ihre Häufigkeit, die mit bis zu 30 % nach abdominalen Operationen angegeben wird, stellen Narbenhernien ähnlich wie Leistenhernien ein großes Problem dar. (Schiebler T, 1999)

1.1.2. Methoden der operativen Therapie

Am Anfang des letzten Jahrhunderts bestand die operative Behandlung der Hernien im Verschluss der Lücke durch Naht. Diesbezüglich stehen zahlreiche Methoden der operativen Hernienversorgung zur Verfügung. Gemeinsames Ziel ist dabei die Verstärkung der Hinterwand des Leistenkanals. Der italienische Chirurg Eduardo Bassini, der übrigens 1867 im preußisch-österreichischen Krieg selbst eine schwere Leistenverletzung erlitt, veröffentlichte 1890 die von ihm seit 1884 angewandte Technik der Hernienoperation, in der er die Verstärkung der Leistenhinterwand beschreibt. (Bassini, 1890) Der amerikanische Chirurg William J. Mayo beschrieb 1901 ein Verfahren zur Korrektur von Narbenhernien, bei dem die Faszienränder gedoppelt aneinander adaptiert werden. (Mayo 1901, Paul et al 1997)

Seither sind auf dem Gebiet der Leisten- und Narbenhernienchirurgie zahlreiche Verfahren entwickelt worden. Eine konventionelle Operationstechnik der Leistenhernie ist die Methode nach Shouldice. Dabei wird die Fascia transversalis zur Verstärkung zweireihig gedoppelt und die Internusmuskulatur ebenfalls zweireihig am Leistenband fixiert.

Mit dem Einzug von Kunststoffnetzen etablierten sich auch neue Operationstechniken der Hernienversorgung, die sich mehr und mehr durchsetzten.

Durch den Gebrauch dieser Kunststoffnetze konnten die teilweise erheblichen Rezidivraten von bis zu 50 % deutlich gesenkt werden. Man unterscheidet hauptsächlich drei Methoden. Bei der so genannten Onlay-Methode wird das Netz auf der äußeren Muskel- Faszienschicht der Bauchwand am Übergang zur Subkutis fixiert. Die Inlay-Methode, bei der ein Kunststoffnetz Stoß auf Stoß mit den Muskelrändern vernäht wird, konnte sich mit einer inakzeptablen Rezidivrate von 46 % nicht durchsetzen. In Deutschland ist die Sublay -Methode am gebräuchlichsten.

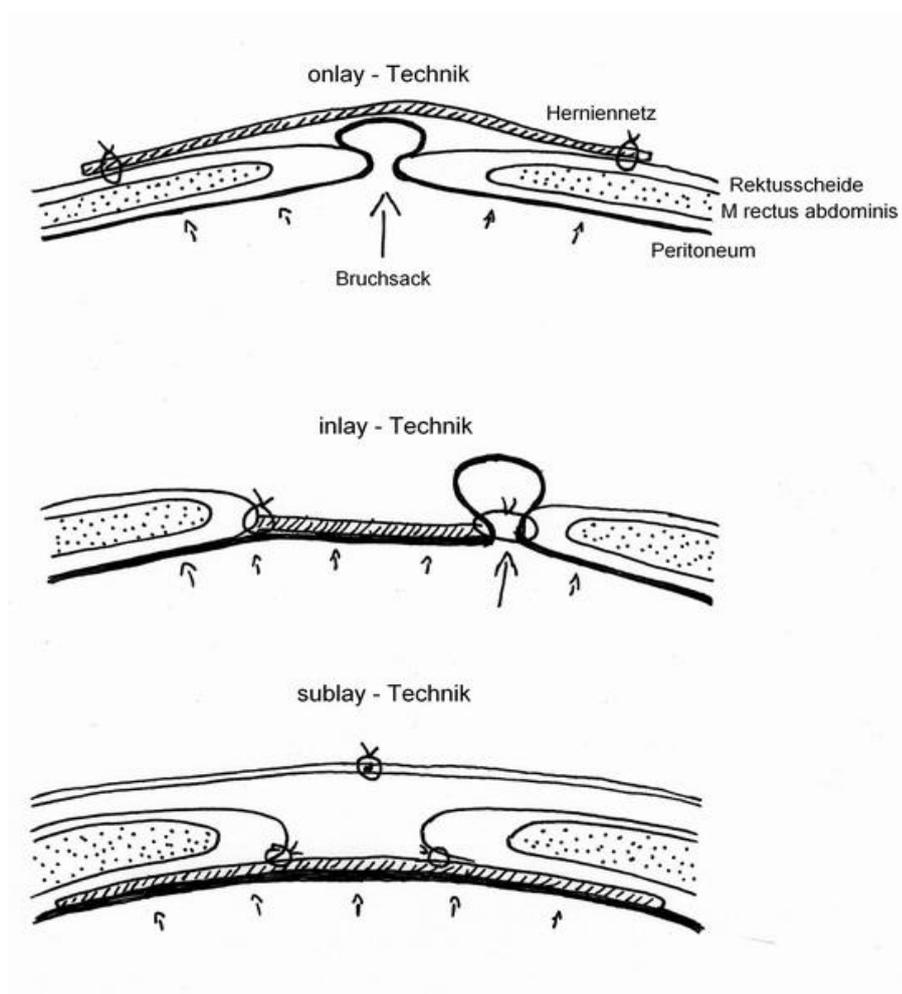


Abb 1: Schema der Methoden zur operativen Hernienversorgung

Bei dieser auch Underlay-Methode genannten Operationstechnik liegt das Netz präperitoneal direkt unter der Muskulatur. So wird das Netz zusätzlich durch den intraabdominellen Druck stabilisiert und somit vor einer Dislokation geschützt.

Kombinationen der einzelnen Methoden werden als Sandwich-Verfahren bezeichnet. (Vestweber et al., 1997; Schumpelick et al., 1999; Korenkov et al., 2002)

Auch die Operationsverfahren für Leistenhernien haben sich mit dem Einzug der Netze verändert, wobei hier das Netz in der Sublay-Position platziert wird. Von Bedeutung ist die Herniotomie nach Lichtenstein. Hierbei kommt das Netz unter der Aponeurose des Musculus obliquus externus abdominis zu liegen. (Lichtenstein et al., 1989; Amid, 2003). Ebenfalls in Sublay-Position befinden sich die Netze in der 1996 von Schumpelick vorgestellten transinguinalen präperitonealen Plastik (TIPP), sowie bei den laparoskopischen Techniken der transabdominellen präperitonealen Plastik (TAPP) bzw. der totalen extraperitonealen Plastik (TEP). (Schumpelick und Arlt, 1996; Schumpelick et al., 1999)

1.2. Herniennetze als Biomaterialien in der Abdominalchirurgie

1.2.1. Entstehung der Herniennetze

Schon vor 3500 Jahren, als die erste chirurgische Naht dokumentiert wurde (Westendorf et al. 1966), verwendete man Biomaterialien in Form von Leinenfäden zum Wundverschluss. Im Laufe der Jahrhunderte waren verschiedene Materialien pflanzlichen (Leinenfäden, Pergament) und tierischen (Seide, Darm) Ursprungs gebräuchlich. Künstlich hergestellte Materialien wie Metalle sind als Nahtmaterialien ebenfalls belegt (Köhler A. 1901). Mit dem Fortschreiten der chirurgischen Techniken wuchsen die Anforderungen an Nahtmaterialien besonders hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und Funktionalität. Durch die Entstehung der organischen Chemie wurde der Grundstock für die Entwicklung entsprechender Kunststoffe gelegt. Folglich häuften sich in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts wissenschaftliche Forschungsarbeiten, die die Entwicklung synthetischer Nahtmaterialien, die letztendlich das Ausgangsprodukt für Herniennetze sind, zum Gegenstand hatten.

In der Hernienchirurgie werden seit über 60 Jahren implantierbare Biomaterialien aus verschiedenen Werkstoffen in Form von Kunststoffnetzen zur Verstärkung der Bauchwand eingesetzt. Die polymeren Kunststoffnetze wurden 1944 erstmals in der Medizin eingesetzt. In der Folge kam es zu erhöhten Infektionsraten und einer

vermehrten Fistelbildung, so dass sich diese Methode nicht durchsetzen konnte. (Coda et al., 2003)

Das 1939 entwickelte Polyester ist ein weiterer Kunststoff, der aber erst 1956 unter dem Namen Mersilene[®] als Herniennetz eingeführt wurde. Da dieses Netz in klinischen Studien zufrieden stellende Ergebnisse zeigte, konnte es sich auch im praktischen Gebrauch durchsetzen. Usher entwickelte 1959 das Marlex[®]-Netz, welches ursprünglich auch aus Polyester bestand. 1963 wurde es dann durch eine Neukonstruktion aus Polypropylenfasern ersetzt. Durch die zunehmende Popularität der Polypropylenetze nahm der Einsatz von Polyesterneetzen kontinuierlich ab. (Usher et al., 1959; Lau, 2002)

Ein weiterer Kunststoff, das 1938 entwickelte Polytetrafluorethylene (PTFE), wird seit 1983 in Form von Netzen in der Hernienchirurgie eingesetzt. Mit einer Porengröße von weniger als 10 µm handelt es sich eher um eine Folie, als um ein Netz. (De Bord, 1998)

1.2.2. Moderne Herniennetze

In der modernen Hernienchirurgie steht eine große Zahl verschiedener Netze aus unterschiedlichen Materialien zur Verfügung. Da solche Materialien wie Polyglactin 910 und Polyglycolsäure vom menschlichen Organismus resorbiert und Bruchlücken größerer Hernien dadurch nicht dauerhaft verschlossen werden, konnten sie sich nur in Verbindung mit nicht resorbierbaren Biomaterialien in der Praxis durchsetzen. Polyglactinfäden werden heutzutage als resorbierbare Komponente in Kombination mit Polypropylenfäden in sogenannten Composite-Netzen eingesetzt. (Lau, 2002; Peiper et al., 2002) In jüngster Vergangenheit werden auch Herniennetze aus Verbundwerkstoffen implantiert. So wird z.B. seit 2001 das titanbeschichtete Polypropylenetz TiMesh[®] angeboten (Schardey et al. 2004).

Eine der Hauptkomplikationen ist die Verwachsung von Herniennetzen mit serösen Häuten wie z.B. dem visceralen Peritoneum, das intraabdominell gelegene Organe überzieht. Hierzu wurde von der Firma W. L. Gore & Associates, Inc mit dem DualMesh[®] ein Herniennetz aus e-PTFE mit zwei unterschiedlich strukturierten Seiten konstruiert. Die stärker strukturierte Seite soll dabei den Geweben anliegen, bei denen das Einwachsen angestrebt wird. Die andere glattere Oberfläche sollte den Geweben anliegen, bei denen eine möglichst minimale Anhaftung gewünscht wird.

1.2.3. Leichtgewichtige Herniennetze

Nach der Einführung von Kunststoffnetzen zur operativen Versorgung von Hernien richtete sich die Aufmerksamkeit der Chirurgen zunächst auf die Optimierung der Operationstechniken, da diesen im Hinblick auf die Resultate eine größere Rolle zugesprochen wurde. Die Herniennetze selbst betrachtete man als biologisch inert.

Seit 1990 häuften sich Berichte über Komplikationen, die in direktem Zusammenhang mit der Implantation von Herniennetzen zu stehen schienen. Um die Bioverträglichkeit zu verbessern, wurden von unterschiedlichen Herstellern leichtgewichtige Herniennetze entwickelt und auf den Markt gebracht. Diese zeichnen sich maßgeblich durch ein verringertes Gewicht und eine reduzierte Oberfläche aus. Hauptsächlich wird dies durch Materialreduktion und vergrößerte Poren mit Durchmessern von 1 mm und mehr erreicht. Elastizität und Zugfestigkeit liegen bei ungefähr 16 N/cm. Polypropylen hat sich heute als alleiniger Netzbestandteil und in Kombination mit anderen Materialien wie z.B. Polyglactin oder mit einer Titanbeschichtung durchgesetzt.

1.2.4. Polypropylen als Bestandteil von Herniennetzen

Polypropylen ist ein moderner Kunststoff. Er wurde 1954 zum ersten Mal von Giulio Natta in Italien synthetisiert und industriell hergestellt. Die Synthese verläuft auf Basis der Ziegler-Natta-Polymerisation. Diese Leistung wurde 1963 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. (Hart et al, 2007) Polypropylen ist dem Niederdruck-Polyethen sehr ähnlich. Es ist ein Thermoplast mit hoher Stabilität und Chemikalienbeständigkeit. Allerdings ist es härter und wärmebeständiger. Es kann kurzfristig auf 140 °C erhitzt werden, der Erweichungspunkt liegt bei 160 °C. Sinkt die Temperatur auf unter 0 °C, so wird das Material spröde. Die Versprödungstemperatur kann jedoch durch Copolymerisation mit Ethen gesenkt werden. Zudem kann man Polypropylen auch zu Fasern verarbeiten, die mit ca. 0,9 g/cm³ die leichtesten aller Chemiefasern sind. Die einzelnen Faserstoffe erreichen eine Festigkeit von Stahl obwohl Polypropylen nur ein Achtel der Dichte von Eisen besitzt. (Schumpelick et al., 1999) Ausgangsmaterial für die Herstellung von Polypropylen ist Propen.

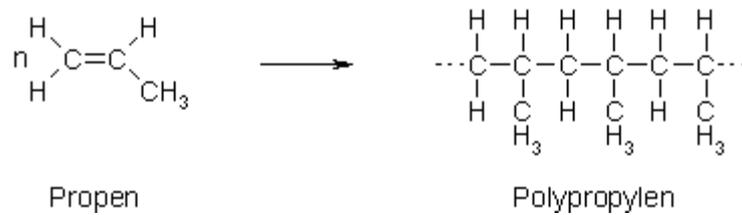


Abb.2: Schematische Darstellung der Polypropylensynthese

Polypropylen ist heute eines der am häufigsten in der Hernienchirurgie verwendeten Materialien. (Klinge et al., 1999)

1.2.5. Verbreitung der Kunststoffnetze

Die Verwendung von Herniennetzen ist heute weltweit verbreitet und in der Hernienchirurgie unentbehrlich geworden. Dies wird unter anderem dadurch verdeutlicht, dass jährlich Herniennetze in siebenstelliger Zahl implantiert werden. In den Jahren 1995 und 2001 wurden in Deutschland 732 Kliniken nach den bei ihnen üblichen Methoden der Hernienversorgung befragt. Korenkow konnte dabei zeigen, dass im Jahr 1995 noch 85 % der Kliniken die konventionellen Techniken anwendeten. Bereits 6 Jahre später waren es nur noch 20 %. (Korenkov et al. 2002)

Kunststoffnetze haben die Aufgabe, für eine Stabilisierung und Verstärkung der Bauchwand zu sorgen. Zum einen wird dies durch einen mechanischen Verschluss der Bruchpforte realisiert, zum anderen induzieren die implantierten Kunststoffnetze idealerweise auch das Wachstum einer Narbenplatte, die dem Netz bei der Stabilisierung des Herniengebietes zusätzliche Beständigkeit verleiht. (Bellon et al., 1995; Klinge et al., 1999; Klosterhalfen et al., 2000; Klosterhalfen et al., 2002)

Heutzutage werden ca. 80 % der Hernien mit einem Durchmesser über 5 cm mit einem implantierbaren Netz versorgt. In der Mehrzahl der Fälle wird dabei die Sublay-Technik verwendet. Es gibt Studien, in denen auch schon bei kleineren Hernien mit einem Durchmesser ab 2 cm eine Versorgung mit implantierbaren Netzen empfohlen wird. (Luijendijk et al., 2000)

1.3. Betrachtungen zur Biokompatibilität von Herniennetzen

1.3.1. Biokompatibilität und Biofunktionalität

Mit den Begriffen Biokompatibilität und Biofunktionalität prägte Alberto Pizzoferrato 1985 zwei Kriterien, die es auch heute ermöglichen, die Eigenschaften von Biomaterialien zu klassifizieren. Die Biofunktionalität beschreibt die Begriffe Funktionalität und Lebensdauer von Biomaterialien. Der Begriff Biokompatibilität hingegen charakterisiert die Wechselwirkungen von Bioimplantat und dem umliegenden Gewebe. (Pizzoferrato et al., 1985) Ein ideales Implantat zeichnet sich dadurch aus, dass es unter anderem weder allergieinduzierend noch kanzerogen oder toxisch auf das umgebende Gewebe wirkt (Biokompatibilität). Außerdem sollte es eine lange Lebensdauer besitzen und in der Funktionalität der zu ersetzenden Struktur gleichwertig sein (Biofunktionalität). Um diesen hohen Anforderungen möglichst nahe zu kommen, sollten Biomaterialien vor dem klinischen Gebrauch sowohl in Tierversuchen, als auch in zellbiologischen Untersuchungen ausgiebig auf die zu erwartende Biokompatibilität und Biofunktionalität getestet werden. (Pizzoferrato et al. 1985; Schumpelick 1999; Deligiannidis et al. 2002) Im Hinblick auf solche Untersuchungen wurde von Pizzoferrato die plausible These aufgestellt, dass der Grad der Toxizität eines Biomaterials in vitro meist umgekehrt proportional zu seiner Biokompatibilität in vivo ist. Er fügte jedoch hinzu, dass die Ergebnisse von in vitro Versuchen nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind, da in Zellkulturen die komplexen Vorgänge des menschlichen Gewebes nur andeutungsweise darstellbar sind. Um eine bessere Aussage bezüglich der Biokompatibilität und Biofunktionalität von Bioimplantaten machen zu können, sind vergleichende in vivo Versuche notwendig. (Pizzoferrato et al., 1985) In Zellversuchen lässt sich der Einfluss toxischer Substanzen mit einer hohen Sensitivität und unter standardisierten reproduzierbaren Bedingungen untersuchen. Von Vorteil ist auch, dass im Vergleich zu in vivo Studien schneller Ergebnisse erzielt werden können.

1.3.2. Probleme bei der Biokompatibilität von Herniennetzen

Mit Rezidivraten von 20-50 % zeigen konventionelle Methoden der Hernienversorgung wie die Mayo-Faszien-Dopplung oder die direkte Stoß auf Stoß-Nahttechnik keine zufrieden stellenden Ergebnisse. (Langer et al.,1985; Trupka et al., 1997; Langer et al.,

2003) Mit dem vermehrten Einsatz von Kunststoffnetzen ließ sich die Rezidivrate auf unter 10 % senken, (Amid et al., 1992; Lichtenstein et al., 1993; Amid et al., 1994; Shulman et al., 1996), gleichzeitig stieg aber auch die Komplikationsrate an. Nach der Implantation eines Netzes entstanden in 30-50 % der Fälle Serome oder Hämatome im Bereich der Implantationsstelle, über Parästhesien klagten 10-20 % und 25 % berichteten über eine eingeschränkte Beweglichkeit im Bereich der Bauchwand.(Amid et al., 1994, Langer et al., 1996, Schumpelick et al., 1996) Über Beschwerden im Sinne von Missempfindungen, Nervenirritationen, Bewegungseinschränkungen oder lang anhaltende Schmerzen im Implantationsbereich klagten bis zu 50 % der Patienten, denen ein großflächiges Netz implantiert wurde. (Klein et al., 1996; Klinge et al., 1996; Vestweber et al., 1997) In einem speziellen Fall wurde von einem Patienten berichtet, bei dem nach einer laparoskopischen Implantation eines Netzes ein unspezifisches und konservativ nicht beherrschbares inguinales Schmerzsyndrom auftrat. Mehrfache Revisionen mit Entfernung von Clips und die Durchtrennung von Nerven konnten die Schmerzen nicht lindern. Bei der notwendig gewordenen Netzexplantation zeigte sich dann eine massive Schrumpfung und Faltung des Implantates. (Schumpelick et al., 1997) Auch Coda beschrieb die morphologische Veränderung von explantierten Herniennetzen aus Polypropylen und Polyester. Dabei kam es zu Schrumpfungen um bis zu 40 % die sich z.B. durch die Fibrozytenaktivität bei der Durchwachsung der Netze erklären lassen. Auch die beobachteten Netzausdehnungen um bis zu 58,5 % erscheinen auf Grund von postoperativ auftretender mechanischer Belastung nachvollziehbar. Nach Inkubation mit aqua dest., menschlichem Blut, Formalin und Bleichmitteln zeigten sich jedoch interessanterweise ebenfalls morphologische Veränderungen der Netze im Sinne von Schrumpfung und Expansion. Grad und Richtung der Veränderungen ließen sich aber keinem bestimmten Parameter zuordnen. (Coda et al., 2003)

In der Literatur finden sich des weiteren Berichte über Netzwanderungen mit Arrosionen von Haut, Darm oder Blase. (Hume et al., 1996) Nach Implantation von Netzen bildeten sich in einigen Fällen enterocutane oder colovesicale Fisteln, die eine Netzexplantation und operative Versorgung der Fisteln erforderlich machten. (Gray et al., 1994; De Guzman et al., 1995) Noch nach 10 Jahren trat bei einem Patienten, dem ein Polypropylenetz implantiert wurde, eine enterocutane Fistel auf. Dabei hatte sich das Implantat infiziert und war disloziert. (Losanoff et al., 2002) In ihrer Studie berichten Liakakos et al. von einer akuten Infektion eines Polypropylen-Netzes 12 Jahre nach der

Implantation. (Liakakos et al., 1994) So können, wie diese Beispiele zeigen, auch nach Jahren noch Komplikationen mit implantierten Polypropylnetzen auftreten, die eine sofortige Explantation der Netze notwendig machen. Diesbezüglich gibt es Untersuchungen, die für leichtgewichtige Netze aus Polypropylen einen positiven Einfluss auf postoperative Komplikationen beschreiben. (Weyhe et al. 2007)

Prinzipiell besteht nach Implantationen von Biomaterialien, wie z.B. Herniennetzen, beim Menschen auch die Gefahr der malignen Entartung. Die postoperativ ablaufenden Interaktionen zwischen Fremdmaterial und dem umliegenden Gewebe sind komplex, so dass eine Fehlregulation im Sinne einer Tumorentstehung denkbar ist. Auch wenn ein Zusammenhang zwischen implantiertem Biomaterial und Tumorentstehung nicht bewiesen werden konnte, so existieren bereits tierexperimentelle Untersuchungen, die auf die Entstehung von Weichteilsarkomen hinweisen, die in direktem Zusammenhang mit der Implantation von Herniennetzen stehen. (Herrmanns B, 2004) Auch wenn diese Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind, so zeigen sie dennoch eine prinzipielle karzinogene Potenz von implantierbaren Herniennetzen.

1.3.3. Die Fremdkörperreaktion – ein Hauptfaktor der Biokompatibilität

Seit vielen Jahrzehnten werden besonders in der Chirurgie Biomaterialien für die verschiedensten Zwecke eingesetzt. Diese sind meist chemisch und physikalisch inert. Im klinischen Alltag wurden allerdings immer wieder kleinere, aber auch schwere Komplikationen im Zusammenhang mit implantierbaren Biomaterialien beschrieben. Dies lässt Defizite der Materialien bezüglich ihrer Biokompatibilität vermuten. Es werden in vivo eine Vielzahl von Reaktionen induziert. Neben Infektionen, Fibrosierung, Granulombildung und Kalzifikationen spielt die Fremdkörperreaktion eine wichtige Rolle, da sie nach der Implantation von Biomaterialien immer auftritt. Vornehmlich Monozyten und Makrophagen charakterisieren diese schnelle Immunreaktion. (Junge, 2002, Klosterhalfen, 1998)

Es ist noch nicht vollständig geklärt, warum Biomaterialien, seien sie auch chemisch und physikalisch inert, diese Entzündungsreaktion induzieren. Die Fremdkörperreaktion ist durch mastzell- und komplementabhängige Adsorption von lokalen Proteinen und Immunglobulinen sowie deren Interaktion mit dem Biomaterial charakterisiert. In der Folge beginnen die Entzündungszellen einzuwandern. Diesbezüglich spielt neben

Albumin das Fibrinogen eine besondere Rolle, da es, wenn es in gebundener Form vorliegt, von Phagozyten als Fibrin erkannt wird und damit eine weitere Kaskade der Fremdkörperreaktion auslöst. Phagozyten strömen aber auch in Abwesenheit der adhärennten Immunglobuline in das Wundgebiet ein. (Tang et al 1993, 1998) In der Folge kommt es zum Stadium der akuten Entzündungsreaktion und zur chemotaktisch induzierten Migration von neutrophilen Granulozyten sowie Ausbildung eines Wundexsudats. Phagozyten in Form von Monozyten/Makrophagen spielen damit die zentrale Rolle in der Fremdkörperreaktion.

Da sich die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Netzoberflächen stark unterscheiden, variieren auch Zusammensetzung und Menge der auf der Implantatoberfläche angelagerten Proteine. Jedes Biomaterial, in unserem Falle also jedes Herniennetz, induziert somit seine eigene ganz bestimmte Fremdkörperreaktion. (Junge K, 2002) Da Fremdkörperreaktionen komplex, und je nach Individuum, Abwehrlage, verwendetem Biomaterial sowie vielen anderen Faktoren unterschiedlich stark ausgeprägt sein können, gibt es hierzu vornehmlich in vivo Studien.

1.4. Marker der zellulären Vitalität

1.4.1. Apoptoserate und Proliferationsindex

Neben der in vitro nur unzureichend reproduzierbaren Fremdkörperreaktion, besteht die Möglichkeit, mittels Bestimmung von Apoptoserate und Proliferationsindex von Zellen, die auch in vivo mit Biomaterialien interagieren, eine Aussage über deren Wechselwirkungen zu treffen.

1.4.2. Apoptosebestimmung mittels Annexin-V – Protein

Der Ablauf der Zellapoptose wird durch unterschiedliche Merkmale charakterisiert. Dazu gehören die Schrumpfung des Zytoplasmas, die Aggregation des Chromatins an der Kernmembran und die Fragmentation der DNA. Die Veränderung der Zellmembran ist ein weiteres charakteristisches Merkmal. Diese besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit asymmetrisch verteilten Phospholipiden. Die negativ geladenen Phosphatidylserine kommen in vitalen Zellen im Gegensatz zu anderen Phospholipiden wie Phosphatidylcholin nur auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran vor. Der

Vorgang der Apoptose führt unabhängig vom Zelltyp zu einer Translokation des Phosphatidylserins von der zytoplasmatischen Seite auf die Außenseite der Zellmembran. Dieser Vorgang spielt sich in der frühen Phase der Apoptose ab, in der die Zellmembranen noch intakt sind. (Darzynkiewicz et al., 1997; van Engeland et al., 1998) Das Ca^{2+} -abhängige Protein Annexin V bindet sich an Phospholipide mit einer sehr hohen Affinität für Phosphatidylserine. Somit eignet sich Annexin V als Marker für die Frühphase der Apoptose. Als geeignete Methode zur Bestimmung der Apoptoserate hat sich die Durchflußzytometrie erwiesen. Mit Fluorescein - (FITC) konjugiertem Annexin V lässt sich dabei die Apoptoserate in Zellsuspensionen bestimmen. Um die apoptotischen Zellen von den nekrotischen Zellen zu unterscheiden, werden diese zusätzlich mit Propidiumjodid angefärbt. Propidiumjodid färbt DNA und markiert somit nur nekrotische Zellen mit defekter Zellmembran. Annexin V positiv aber Propidiumjodid negativ gefärbt sind somit Zellen in der frühen Phase der Apoptose mit intakter Membran. (Vermes et al., 1994).

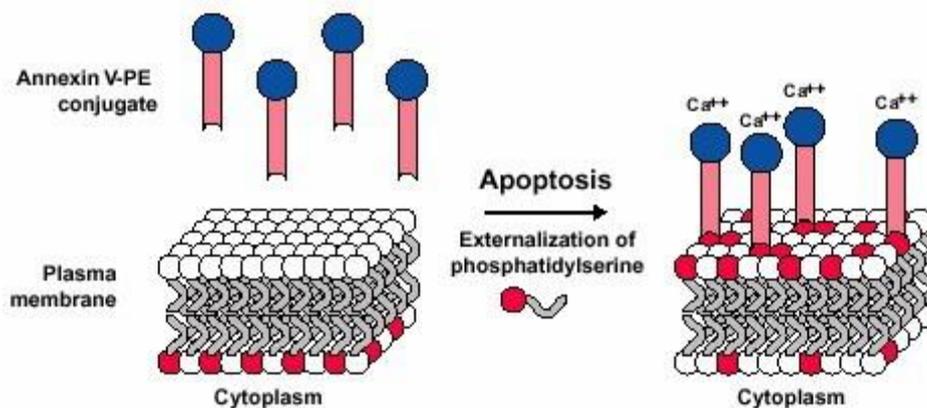


Abb. 3: Schematische Darstellung der Annexin V - Färbung

1.4.3. Ki-67 – Marker der Zellproliferation

Ki-67 ist ein monoklonaler Antikörper mit dessen Hilfe sich Aussagen über die Proliferationsrate einer Zellkultur treffen lassen. Dieser Antikörper bindet an das humane Ki-67 Antigen, welches sich nur innerhalb der Kerne proliferierender Zellen befindet. Zellen, die sich in der Ruhephase des Zellzyklus befinden, exprimieren das Ki-67 Antigen nicht. (Gerdes et al., 1984) Durchflußzytometrie und Immunhistochemie

erwiesen sich als sehr geeignete Methoden, um mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ki-67 die Proliferationsrate von Zellen zu bestimmen. Aufgrund seiner Eigenschaft ist Ki-67 einer der am meisten benutzten Marker zur Ermittlung der Proliferationsrate von Zellen aus Zellkulturen, in Geweben oder soliden Tumoren und hat sich damit zu einer Standardmethode entwickelt. Um die Proliferationsrate durchflußzytometrisch bestimmen zu können, ist eine Permeabilisierung und Fixierung der Zellen nötig, damit die monoklonalen Ki-67 Antikörper bis in den Zellkern gelangen können. (Schwartz et al., 1986) Für die Fixation der Zellen existieren momentan viele verschiedene Methoden, die für jede einzelne Zellkultur speziell getestet werden müssen. Die besten Ergebnisse liefert dabei die Methode mit Paraformaldehyd und Triton X 100-Lösung, die sich als Standardmethode durchgesetzt hat. (Endl et al., 2001)

1.5. Aufgabenstellung

Seit der Einführung der Polypropylnetze vor über 50 Jahren ließen sich durch deren Verwendung die Anzahl der Rezidivhernien deutlich reduzieren. Gleichzeitig kam es mit zunehmender Verwendung implantierbarer Herniennetze aus Polypropylen aber auch zu einer Erhöhung der Früh- und Spät komplikationen. Das lässt eine noch nicht optimale Biokompatibilität der verwendeten Kunststoffe vermuten. Diese Problematik wurde bereits in zahlreichen Studien thematisiert. Da über die Wechselbeziehungen zwischen Kunststoffnetzen und dem sie umgebenden Gewebe nur wenig bekannt war, gilt der Arbeitsgruppe um Schumpelick besondere Aufmerksamkeit. Diese führte erstmals immunhistochemische Untersuchungen an explantierten Herniennetzen durch. Dabei zeigte sich neben einer gesteigerten proliferativen Aktivität auch eine erhöhte Apoptoserate der Zellen, die aus der direkten Umgebung der explantierten Polypropylen - Netze stammten. (Schumpelick et al., 1999; Klosterhalfen et al., 2000).

Vor kurzem gelang es einem Mitglied der Arbeitsgruppe um Prof. Broll nachzuweisen, dass sich die Apoptoserate humaner Fibroblasten, die mit nativen und resterilisierten Prolene[®]-Netzen (Ethicon, Norderstedt) inkubiert wurden, gegenüber Negativkontrollen erhöhte. Dieser Effekt ließ sich in der Gruppe der nativen Prolene[®]-Netze nur diskret, bei den resterilisierten Netzen dieses Typs aber deutlich beobachten. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen der Proliferationsraten bei gleichem Versuchsaufbau. Es ergab sich eine Abnahme der Wachstumsrate von humanen Fibroblasten, hier wieder besonders stark in der Gruppe humaner Fibroblasten, die mit resterilisierten Prolene[®]-Netzen inkubiert wurden. (Broll et al. 2002, Bethge, 2004)

Da es mittlerweile eine Vielzahl von Herniennetzen aus Polypropylen und Polypropylenanteilen gibt, gilt es zu untersuchen, ob die bisher für Prolene[®]-Netze erzielten Ergebnisse auch auf andere, insbesondere leichtgewichtige Netze aus Polypropylen übertragbar sind. Wir wählten dazu folgende Netze aus:

- Atrium[®] ProLite Mesh, Atrium Medical Corporation
- Optilene[®] Mesh LP, BBD-Aesculap
- Premilene[®] Mesh LP, BBD-Aesculap

Sollte die sterile Verpackung der Atrium® ProLite-Netze versehentlich geöffnet oder beschädigt werden, ist es laut Hersteller (Atrium Medical Corporation) möglich, ein unter sterilen Bedingungen der Packung entnommenes Atrium® ProLite-Netz sowohl mit Ethylenoxid-Gas als auch im Dampfautoklaven bei 121°C für 20 Min zu resterilisieren.(Abb.4) Nach dem sterilen Zuschnitt nicht mehr benötigte Netze könnten auf diese Weise wiederverwendet werden.

Mesh Plug is used for groin hernias, the flat preshape onlay patch provided can be placed directly over the inserted plug and sutures, stapled or tacked in position as required. For recurrent hernias, the flat preshape onlay may not be required.

To shorten plug depth, reduce the overall size of the circular multilayered mesh prior to insertion by trimming the outer edge of the circular mesh plug to a smaller diameter. Material can also be removed between the weld seams from the top 2 layers of the multilayered mesh plug (center tab and inner layer only) to reduce the bulk width of the plug. Do not cut or trim away any portion of a weld seam or forcibly delaminate any mesh layer when reducing the overall size or depth of the mesh plug.

Resterilization

Should the original sterile package be inadvertently opened or damaged prior to use, Atrium Mesh may be resterilized using validated ETO or steam sterilization methods no more than one time. Suitable lot number traceability must accompany product through all phases of handling, repackaging and sterilization. Atrium Mesh should never be exposed to temperatures greater than 250°F (121°C). Sterility and fitness of resterilized product will be the sole responsibility of the hospital. Do not sterilize this mesh using radiation techniques.

SYMBOLS USED ON PRODUCT LABELS

REF CODE NUMBER

LOT LOT NUMBER

STERILE EO STERILE. STERILIZED BY ETHYLENE OXIDE.

 SEE PACKAGE INSERT

 SINGLE USE ONLY

 EXPIRATION DATE

Rx ONLY PRESCRIPTION ONLY

DIM DIMENSIONS



ATRIUM MEDICAL CORPORATION
5 Wentworth Drive
Hudson, New Hampshire 03051 U.S.A.
☎ 603-880-1433 📠 603-880-6718

European Representative:
ATRIUM MEDICAL CORPORATION
Rendementsweg 24,
3641 SL Mijdrecht, The Netherlands
☎ 31-297-230-420 📠 31-297-230-422

Abb 4: Gebrauchsinformation Atrium® prolite mit dem Hinweis zur Resterilisation

Obwohl das Resterilisieren laut Hersteller (Ethicon sowie Atrium Medical Corporation) nicht ausdrücklich empfohlen wird, ist diese Vorgehensweise in medizinischen Entwicklungsländern bereits gängige Praxis. (Serbetci et al, 2007) Da die ersten Untersuchungen ergaben, dass resterilisierte Prolene[®]-Netze in besonderem Maße mit humanen Fibroblasten interagieren, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt eine Eigenart des Polypropylen ist, oder ob es sich z.B. um produktionsbedingte Besonderheiten des Prolene[®]-Netzes handeln könnte. Deshalb sollte das Atrium[®] ProLite Netz resterilisiert und analog den oben genannten Netzen untersucht werden.

Bei der Ausbildung einer Narbenplatte und der Durchwachsung von Herniennetzen spielen Fibroblasten eine wichtige Rolle, da sie einen erheblichen Anteil an der postoperativen Stabilität der Netze haben. Wir wählten MRC 5-Zellen, die auch als „fibroblast like“ bezeichnet werden, als eine der Primärzellenart für unsere in vitro Versuche. Die Bestimmung des Wachstums- und Apoptoseverhalten der MRC 5-Zellen, die mit den Netzen inkubiert wurden, soll dabei einen möglichen Einfluss der Netze auf das um sie herum entstehende Bindegewebe in vivo deutlich machen.

Bisher wurde eine karzinogene Potenz implantierbarer Kunststoffe im Tiermodell beobachtet und konnte für den Menschen nicht völlig ausgeschlossen werden. (B.Herrmanns, 2004; Adams, 2003) Darum wurden auch transformierte Epithelzellen (HeLa- Zellen) in unsere Untersuchungen einbezogen, um eventuelle Einflüsse der Netze bezüglich des Wachstums und des Apoptoseverhaltens genetisch veränderter Zellen zu prüfen.

Neben den eventuellen Auswirkungen der Netze auf die Funktion von humanen Zellen soll auch ein möglicher Einfluss auf die Oberflächenstruktur der Netze durch die Zellen in physiologischer Umgebung untersucht werden. Von besonderem Interesse sind außerdem die Auswirkungen des Resterilisierens auf die Morphologie von Polypropylenetzen. Wir wählten die Elektronenmikroskopie, um die Veränderungen der Netzoberfläche vor und nach Inkubation mit MRC 5-Zellen unter physiologischen Bedingungen sichtbar zu machen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellen

2.1.1. Verwendete Primärzellen

Für die in vitro Untersuchungen wurden HeLa S3 Zellen (GSMZ Braunschweig) und MRC 5 - Zellen (Sigma) verwendet.

HeLa Zellen sind Klone von Cervix-Carcinomzellen einer 31-jährigen afroamerikanischen Frau die im Jahre 1951 kultiviert wurden. HeLa S3 Zellen sind Subklone der HeLa Zelllinie aus dem Jahr 1955.

Die MRC 5 Zelllinie wurde 1966 aus Lungengewebe eines 14 Wochen alten männlichen Feten einer 27-jährigen psychisch kranken Frau kultiviert. Die Zellmorphologie wird als „fibroblast-like“ beschrieben.

2.1.2. Kultivierung der Zellen

2.1.2.1. Kulturmedium

Für die Kultivierung der MRC 5-Zellen verwendeten wir als Basismedium Minimal Essential Medium Eagle (Sigma Aldrich, Deisenhofen). Zusätzlich wurden dem Medium inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS), L – Glutamin, non essential Amino-Acid sowie Penicillin-Streptomycin-Lösung zur Verhinderung von Bakterienwachstum zugesetzt. Das Medium für die HeLa – Zellen bestand aus DMEM low glucose (PAA Laboratories, Coelbe), dem neben inaktiviertem FKS Glukose, Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), sowie Penicillin-Streptomycin-Lösung zur Verhinderung von Bakterienwachstum zugesetzt wurden.

2.1.2.2. Mediumwechsel

Um sowohl MRC 5- als auch HeLa-Zellen in vitalem Zustand zu erhalten wurde alle 48 Stunden ein Medienwechsel durchgeführt. Bestimmte Bestandteile des Mediums

einschließlich der Zusätze zerfielen bei 37 °C im Laufe der Zeit oder wurden von den Zellen metabolisiert. Mit Hilfe einer Pipette wurde das verbrauchte Medium entnommen, die Zellen mit kalter „Phosphate Buffered Saline“ Lösung (Dulbecco's PBS, Gibco BRL, Berlin) gewaschen und im Anschluss daran die Zellkulturflasche mit frischem Medium aufgefüllt.

2.1.2.3. Passagieren der Zellen

Die Kultivierung der HeLa und MRC 5-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden-Biebrich). Nach Bildung eines Monolayers (ca. 80-90% Konfluenz) wurden adhärent wachsende HeLa bzw. MRC 5-Zellen mit PBS gewaschen und danach mit einer 1:250 verdünnten Trypsin-Lösung (Gibco BRL, Berlin) zur Ablösung der Zellen für 5-10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurden sie in 15 ml Röhrchen überführt und mit kaltem PBS gewaschen (5 min, 1200 U/min, 4 °C). Im Anschluss daran wurden die Zellen in einer Konzentration von ca. 3×10^6 Zellen in neuen Zellkulturflaschen mit frischem Medium ausgesät.

2.1.2.4. Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung

Zur Überprüfung der Vitalität und Bestimmung der Zellzahl eignete sich am besten die Trypanblau-Färbung. Hierbei wurden 90 µl Trypanblau (Trypan blue solution 0,4 %, Sigma, St Louis, USA) mit 10 µl der Zellsuspension in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und in einer Zählkammer (Typ Neubauer, Brand, Ludwigshafen) unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan, Oberkochen) ausgezählt. Trypanblau hat die Eigenschaft, nur durch perforierte Membranen toter Zellen diffundieren zu können und diese blau anzufärben. Vitale Zellen erscheinen dagegen farblos unter dem Mikroskop, da sie von dem Trypanblau nicht angefärbt werden können.

2.1.2.5. Kryokonservierung der Zellen

Um die Zellen für die Langzeitlagerung zu präparieren, wurden sie wie unter 2.1.2.3. beschrieben, trypsiniert und in einer Konzentration 1×10^6 in 1 ml Einfriermedium (siehe Anhang) aufgenommen. Weiterhin wurden die Zellen in Kryoröhrchen (Nunc,

Wiesbaden-Biebrich) überführt. Um die Konservierung schonend vorzunehmen wurden die Röhren zunächst in Zellstoff eingewickelt und für einen Tag bei -80 °C schonend eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2. Endotoxintest

Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination, die einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben kann, wurde das bakterielle Endotoxin im Medium der Versuchsansätze bestimmt. Der sogenannte Endotoxintest erfolgte mit Hilfe des Limulus Amöbozyten Lysat (LAL) Test (COATEST[®] Endotoxin; Chromogenix AB; Mölndal, Schweden). Das LAL enthält nach Angaben des Herstellers ein Enzym, das aktiviert wird, wenn Endotoxin anwesend ist. Aus dem zugeführten chromogenen Substrat S-2423 ist dieses aktivierte Enzym in der Lage, para-Nitro-Anilin (pNA) herauszulösen und gelb zu färben. Die Entstehung des pNA kann photometrisch gemessen werden und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung des bakteriellen Endotoxins im flüssigen Medium. Um diesen Versuch durchführen zu können, wurden die Zellen mit den Proben der Netze für 24, 48 und 72 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium zur quantitativen Bestimmung des Endotoxins abgenommen. Nach Vorinkubation der Proben mit der LAL-Reagenz wurde das chromogene Substrat S-2423 in die Mikroplatten hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung einem Mikroplattenleser bei 37 °C und 405 nm.

2.3. Kunststoffnetze

2.3.1. Verwendete Kunststoffnetze

Premilene[®] Mesh LP ist ein nicht resorbierbares, leichtgewichtiges Herniennetz aus monofilem Polypropylen und einem Gewicht von 55 g/m². Es ist hochtransparent, so dass das darunter liegende Gewebe intraoperativ sichtbar bleibt.

Optilene[®] Mesh LP ist ein leichtgewichtiges nicht resorbierbares monofiles Polypropylen-Netz mit einem Gewicht von 36 g/m². Die Porengröße beträgt 1,0 mm.

Hersteller beider Netze ist die BBD Aesculap GmbH Postfach 31 78532 Tuttlingen, Germany.

Atrium® ProLite ist ein monofilamentäres, nicht resorbierbares leichtgewichtiges Polypropylenetz. Sein Gewicht beträgt 85 g/m^2 , die Porengröße ca. 0,8 mm.

Sollte die sterile Originalverpackung versehentlich geöffnet oder beschädigt werden, kann nach Angaben des Herstellers das Atrium® ProLite -Netz einmalig mit Ethylenoxid oder Dampf resterilisiert werden.

Hersteller ist die Atrium Medical Corporation 5 Wentworth Drive Hudson New Hampshire 03051 U.S.A.

2.3.2. Aufbereitung der Netze

Nachdem die Netze unter sterilen Bedingungen aus der Verpackung entnommen wurden, erfolgte der Zuschnitt in 1 x 1 cm große rechteckige Teilstücke. Danach wurden die Netzstücke in sterile Bechergläser überführt und je nach Bedarf für die Versuche verwendet. Das Atrium® ProLite - Netz wurde nach Entnahme aus der Packung in Folie eingeschweißt (SBW, Self Seal Sterilisation Pouch, Smith Brothers, Whitehaven) und den Vorschriften des Herstellers entsprechend bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min im Dampfautoklaven (Webeco Modell CS-V, Webeco, Bad Schwartau) resterilisiert.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Versuchsaufbau

Um Proliferationsrate und Apoptoseindex bestimmen zu können, wurden HeLa- bzw. MRC 5-Zellen nach Bildung eines Monolayers geerntet. Die Zellen wurden in einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen je Vertiefung in Standard-12-Well Platten (Nunc Brand Products, Dänemark) eingesät und mit den verschiedenen Netzen für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Danach erfolgten jeweils die Färbung und die durchflusszytometrischen Bestimmungen von Apoptose- und Proliferationsindex. Die Versuche bestanden jeweils aus 2 Ansätzen (siehe Abb. 2). Ansatz 1: Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Netzen, Ansatz 2: Ansatz mit Zellen ohne Zugabe eines Netzes als Kontrollgruppe. Jede Versuchsreihe beinhaltete die zweimalige Wiederholung der jeweiligen Einzelmessungen. Insgesamt wurde jede Versuchsreihe dreimal durchgeführt.

Die in der Auswertung angeführten Werte ergeben sich also jeweils aus dem arithmetischen Mittel von 9 Einzelmessungen.

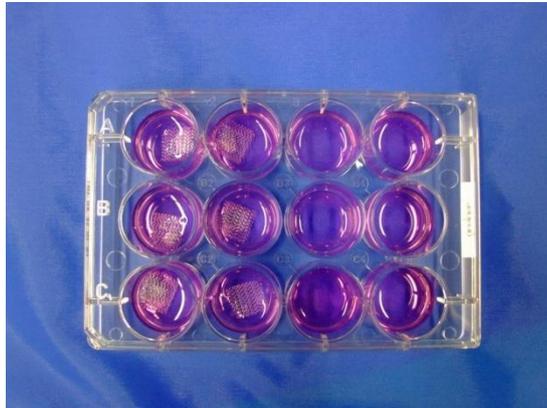


Abb. 5: Versuchsanordnung der zellbiologischen Untersuchungen

2.4.2. Annexin V-Färbung

Die Markierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen; Heidelberg). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen aus den Standard-12-Loch Platten unter Zuhilfenahme von Trypsin-Lösung geerntet, in 5 ml Röhrrchen (Falcon, Round-Bottom Tubes, BD, Heidelberg) umgefüllt und mehrmals mit PBS gewaschen (4°C, 1200 U/min, 5 min). Jetzt wurden 100 µl „Binding-Buffer“ (siehe Anhang), 5 µl Annexin V und 2 µl Propidium-Iodid-Lösung (siehe Anhang) hinzupipettiert und nach fünfzehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit nochmals 400 µl des „Binding-Buffers“ zu der Zellsuspension gegeben.

2.4.3. Ki-67-Färbung

Im Anschluss an die Ernte der Zellen wurden diese mit Wasch-Puffer (siehe Anhang) gewaschen. Nachdem je 500 µl des Wasch-Puffers in jedes Röhrrchen pipettiert wurden, erfolgte die Fixierung der Zellen mit 500 µl 2 %iger Paraformaldehyd-Lösung (siehe Anhang) für 10 min auf Eis. Die Zellsuspension wurde nun mit einer 0,25 %igen Triton-x-100-Lösung (siehe Anhang) für 5 min auf Eis inkubiert mit Wasch-Puffer gewaschen 4 °C, 1200 U/min, 5 min). Es erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem FITC-konjugierten monoklonalen Maus-Antikörper gegen das humane Ki-67 Antigen (Verdünnung 1:10, Code Nr.: F 0788, Dako, Glostrup, Dänemark) für 45 min bei

Raumtemperatur. Nach nochmaligem Waschen mit Wasch-Puffer wurden die Zellen in 500 µl der Diluid Acid free-Lösung (JT Baker, Deventer, Holland) für die Messung im Durchflusszytometer resuspendiert.

2.4.4. Durchflusszytometrie

Nachdem die verwendeten Zellen mit speziellen Antikörpern angefärbt wurden, konnten Apoptoserate und Proliferationsindex mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACscan[®]; Becton Dickinson, Heidelberg) bestimmt werden. Anschließend wurden die Proben im Durchflußzytometer gemessen und mit Hilfe des Programms CellQuest Version 3.2 ausgewertet.

2.5. Rasterelektronenmikroskopie

2.5.1. Versuchsaufbau

Mit der Rasterelektronenmikroskopie sollten die nicht resterilisierten und die resterilisierten Netze unter zwei verschiedenen Bedingungen verglichen werden. In der ersten Gruppe wurden die nativen Netze und die resterilisierten Netze ohne weitere Aufbereitung oder Inkubation sofort unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die zweite Gruppe bildeten sterile und resterilisierte Polypropylen-Netze. Diese wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und mit einem speziellen Zellkulturmedium und MRC 5-Zellen (siehe 2.1.2.1.) in einer 12 -Well - Platte (siehe Abb. 4) für 72 Std. inkubiert. Anschließend erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung. Dafür wurden die MRC 5-Zellen bis zur Anzuchtung eines Monolayers im Brutschrank kultiviert, geerntet und dann in einer Konzentration von 3×10^4 MRC 5-Zellen in die 12-Loch Platten ausgesät (Abb. 4). Anschließend wurden die resterilisierten und nicht resterilisierten Netze in die Vertiefungen der 12 Well-Platten überführt und wie unter 2.4.1. beschrieben inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Netze aus den Platten entfernt, getrocknet und für die Rasterelektronenmikroskopie aufbereitet.

2.5.2. Aufbereitung der Netze

Wie schon in den vorangegangenen Versuchen wählten wir für die Untersuchungen unter dem Rasterelektronenmikroskop implantierbare Kunststoffnetze aus Polypropylen.

Exemplarisch für die Firma BBD Aesculap und bei ähnlichen morphologischen Eigenschaften verwendeten wir für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen das Optilene® Mesh LP, außerdem Atrium® ProLite welches von der Firma Atrium Medical Corporation hergestellt wird. Diese nicht resterilisierten Kunststoffnetze wurden unter sterilen Bedingungen auf eine Größe von ca. 1 cm² zugeschnitten und sofort für die Untersuchungen verwendet. Außerdem wurden Atrium® ProLite-Netze, wie unter 2.3.2. beschrieben, den Angaben des Herstellers entsprechend in einem Dampfautoklaven resterilisiert und nach dem Zuschnitt für die verschiedenen Versuchsansätze verwendet.

2.5.3. Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie

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

2.6. Statistik

Der zweizeitige U-Test nach Mann und Whitney kam zum Gruppenvergleich für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Dabei galt ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS Version 11.0 (Fa SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

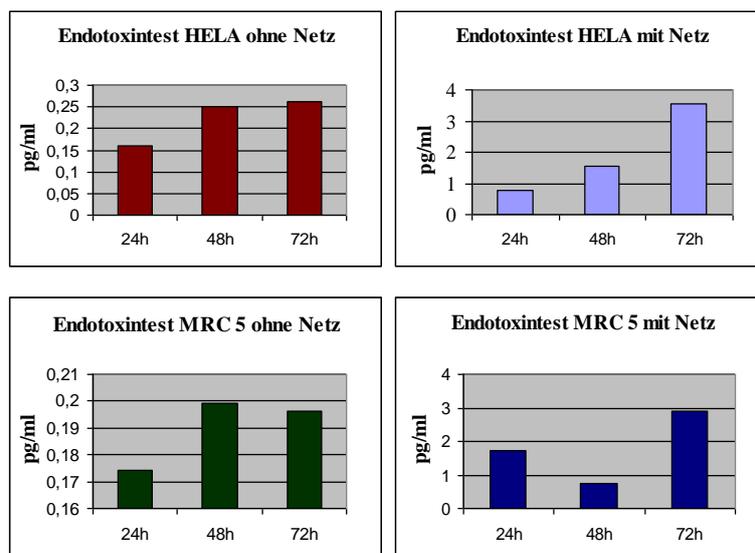
3.1. Vitalitätsprüfung und Endotoxintest

3.1.1. Vitalitätsprüfung

Um zu gewährleisten, dass die Versuche mit vitalen Zellen durchgeführt wurden, führten wir im Laufe der Untersuchungen regelmäßig Vitalitätsprüfungen mit Hilfe der Trypanblau-Färbung durch. Es zeigte sich hierbei, dass die Vitalität der Zellen stets über 98 % lag.

3.1.2. Endotoxintest

Um eine bakterielle Kontamination der Netzproben auszuschließen, wurde ein photometrischer Test auf bakterielle Endotoxine durchgeführt. Dazu wurden HeLa- und MRC 5-Zellen mit Netzmaterial (exemplarisch verwendeten wir dafür nicht resterilisiertes Atrium® ProLite) für 24, 48 und 72 Std. inkubiert. Anschließend wurden mittels LAL-Test die Endotoxin-Werte ermittelt. Alle Messwerte lagen dabei deutlich unterhalb des vom Hersteller angegebenen Grenzwertes von 0,06 EU/ml (5 pg/ml). Es kann somit ein negativer Einfluss auf die durchflusszytometrische Messung der Apoptoserate und Zellproliferation durch eine möglicherweise bakterielle Kontamination der Netzproben ausgeschlossen werden.



Graphik 1 – 4 stellen die Endotoxinwerte zu den verschiedenen Zeitpunkten dar. Der zulässige Höchstwert von 5pg/ml (0,06 U/ml) wurde zu keinem Zeitpunkt überschritten

3.2. Durchflußzytometrie MRC 5-Zellen

3.2.1. Apoptose

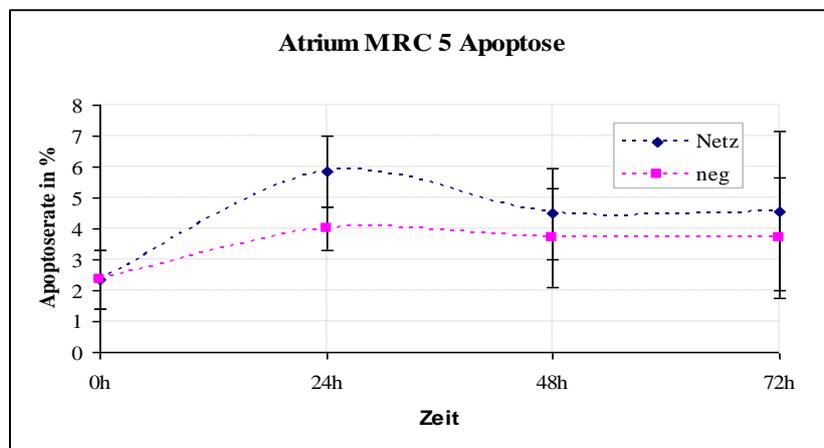
3.2.1.1. Atrium® ProLite nicht resterilisiert

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	2,37	0,95	2,37	0,95
24h	4,00	0,69	5,87	1,19
48h	3,69	1,59	4,48	1,49
72h	3,71	1,96	4,65	2,57

Tab. 1: MRC 5 Apoptose Atrium® ProLite nicht resterilisiert

Signifikante Unterschiede:

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,001$



Graphik. 5: Darstellung der in Tabelle 1 dargestellten Messwerte

In der Gruppe der MRC 5-Zellen, die mit Atrium® ProLite-Netzen inkubiert wurden, kam es bereits nach 24 Std. zu einem Anstieg der Apoptoserate von 2,37 % auf 5,78 %. Auch in der Kontrollgruppe stieg die Apoptoserate in der gleichen Zeit auf 4 %. Zum Ende der Versuche nach 72 Std. lag in der Gruppe der mit Atrium® ProLite-Netzen inkubierten Zellen die Apoptose mit 4,56 % nur wenig über der Apoptoserate der Zellen aus der

Kontrollgruppe (3,71%). Die Apoptoserate in der Netzgruppe nach 24 Std. ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

3.2.1.2. Atrium® ProLite reesterilisiert

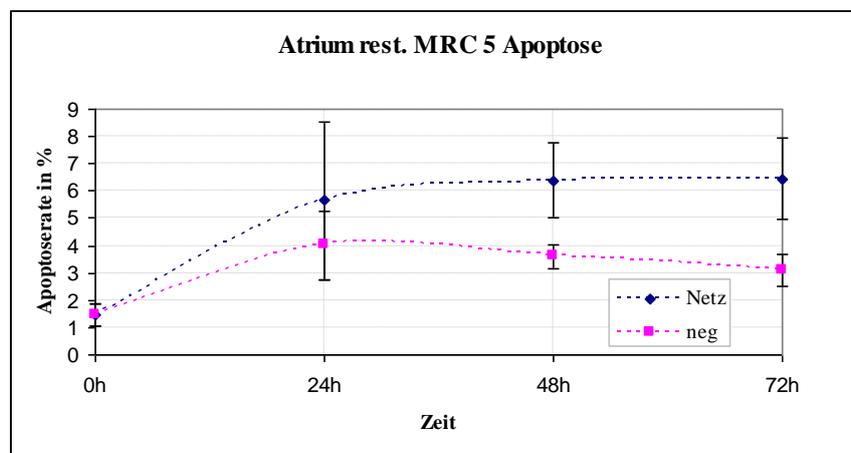
	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	1,47	0,42	1,47	0,42
24h	4,01	1,26	5,65	2,91
48h	3,6	3,50	6,39	6,48
72h	3,11	3,04	6,45	6,95

Tab. 2: MRC 5 Apoptose Atrium® ProLite reesterilisiert

Signifikante Unterschiede:

ohne Netz (48 Std.) / mit Netz (48 Std.) $p=0,001$

ohne Netz (72 Std.) / mit Netz (72 Std.) $p=0,0001$



Graphik. 6: Darstellung der in Tabelle 2 dargestellten Messwerte

Ausgehend von einer Apoptoserate von 1,47 % zum Zeitpunkt 0 Std. steigt die Absterberate der Netzgruppe schon nach 24 Std. auf 5,65 % an. Nach 48 Std. sind bereits 6,39 % apoptotisch, woran sich nach 72 Std. aber nicht viel (6,45 % Apoptose) änderte. Auch in der Kontrollgruppe kommt es zunächst zu einem Anstieg der Apoptose auf 4,01 %. Nach 48 Std. sinkt sie aber auf 3,6 % und liegt zum Ende der Versuche bei 3,11 %. Insgesamt zeigt sich hier die Apoptoserate in der Netzgruppe nach 48 und 72 Std. im Vergleich zur Kontrollgruppe im gleichen Zeitraum signifikant erhöht.

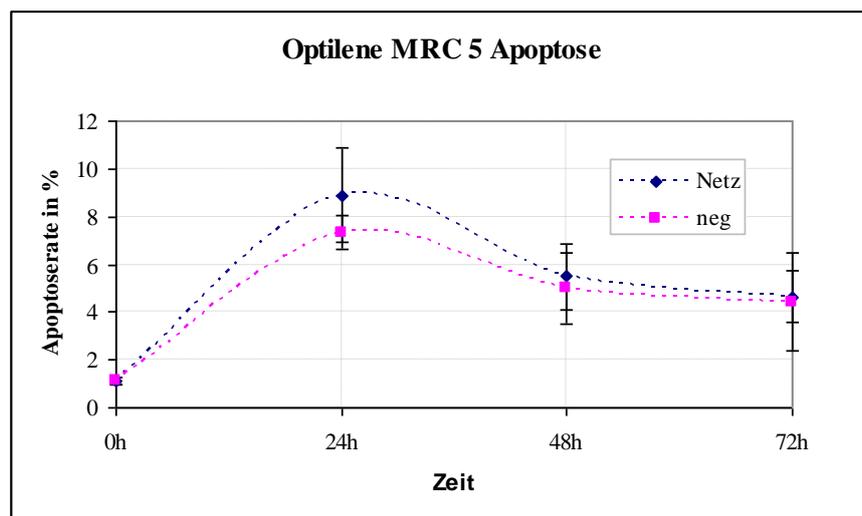
3.2.1.3. Optilene® Mesh LP

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	1,14	0,14	1,14	0,14
24h	7,34	1,38	8,89	1,98
48h	4,98	1,50	5,51	1,50
72h	4,43	2,07	4,65	1,08

Tab. 3: MRC 5 Apoptose Optilene® Mesh LP resterilisiert

Signifikante Unterschiede

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,024$



Graphik. 7: Darstellung der in Tabelle 3 dargestellten Messwerte

Auch bei den MRC 5-Zellen kommt es zunächst zu einem starken Anstieg der Apoptoseraten in der Netzgruppe (von 1,14 % auf 8,89 %) und der Kontrollgruppe (von 1,14 % auf 7,34 %). Zum Zeitpunkt 72 Std. hin fallen die Absterberaten aber wieder auf Werte von 4,65 % in der Netzgruppe und 4,43 % in der Kontrollgruppe ab. Zusammengefasst zeigen sich in der Netzgruppe zum Messzeitpunkt 24 Std. signifikant höhere Apoptoseraten als bei den Kontrollenansätzen im selben Zeitraum.

3.2.1.4. Premilene® Mesh LP

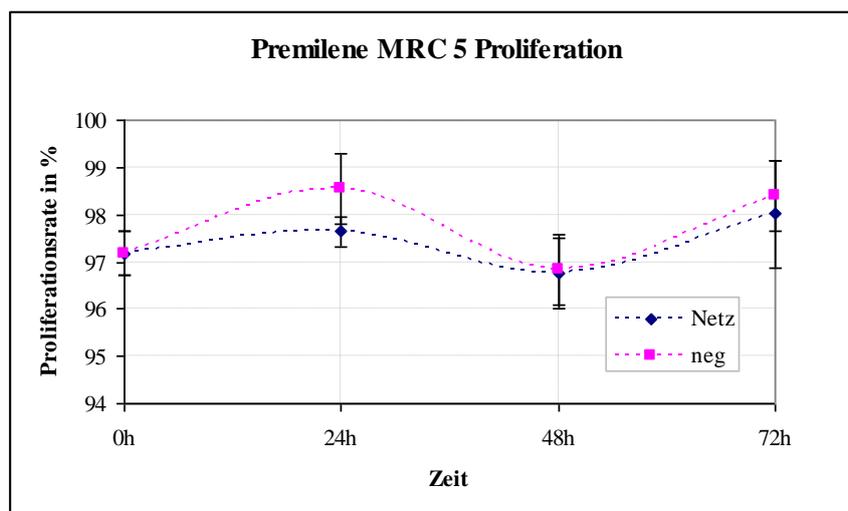
	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	2,07	1,69	2,07	1,69
24h	3,23	1,15	4,37	1,91
48h	1,66	0,62	2,63	0,76
72h	1,38	0,85	3,44	1,49

Tab. 4: MRC 5 Apoptose Premilene® Mesh LP reesterilisiert

Signifikante Unterschiede

ohne Netz (48 Std.) / mit Netz (48Std.) p=0,012

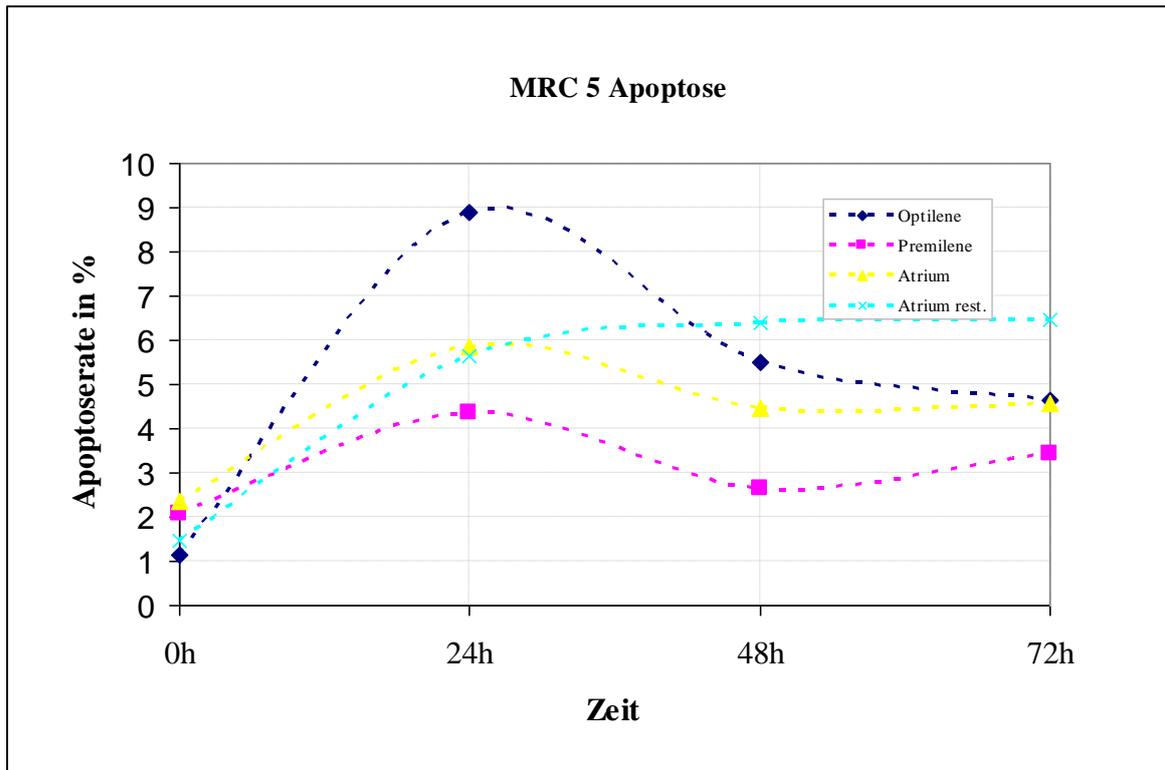
ohne Netz (72 Std.) / mit Netz (72 Std.) p=0,004



Graphik. 8: Darstellung der in Tabelle 4 dargestellten Messwerte

Ähnlich wie bei den HeLa Zellen steigt auch in der MRC 5 - Gruppe, in der die Zellen auch mit Premilene® Mesh LP-Netzen inkubiert wurden, die Apoptoserate nach 24 Std. stärker an als in der Kontrolle zum gleichen Versuchszeitpunkt. Nach einem Abfall der Apoptose in der Netzgruppe steigt die Absterberate zum Ende der Versuche im Vergleich zu den Negativkontrollen wieder an und erreicht 3,44 %. In der Kontrollgruppe fällt die Apoptoserate dagegen stetig ab und liegt nach 72 Std. bei 1,38 %.

3.2.1.5. Zusammenfassung Apoptose MRC 5



Graphik. 9: Vergleich der Apoptosewerte der MRC 5 Zellen die mit den verschiedenen Netzen inkubiert wurden

Betrachtet man nun das Übersichtsdiagramm der Netze, die mit MRC 5-Zellen inkubiert wurden, so fällt ein durchweg ähnlicher Kurvenverlauf auf. In jedem Fall liegt die Apoptoserate der Zellen meist auch über der Kontrolle aus den Ansätzen ohne Netz. In den ersten 24 Stunden, in denen die Zellen mit den Kunststoffnetzen inkubiert wurden, war die apoptotische Aktivität durchweg am größten. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei den Optilene® Mesh LP-Netzen zu beobachten. Misst man die Apoptoserate der Zellen nach 48 Stunden, so fällt auf, dass der Scheitelpunkt der apoptotischen Aktivität bereits überschritten ist. Bei dem Premilene® Mesh LP kommt es noch einmal zu einem Anstieg der Apoptoserate. Die einzige Ausnahme bildet das resterilisierte Atrium® ProLite. Während hier in den Kontrollmessungen, so wie bei den anderen Netzen auch, der typische Knick nach einem initialen Anstieg, und dann stetigem Abfall der apoptotischen Aktivität sichtbar ist, zeigt sich in der Netzgruppe mit einem stetigen Anstieg der Messwerte ein anderes Apoptoseverhalten.

3.2.2. Proliferation

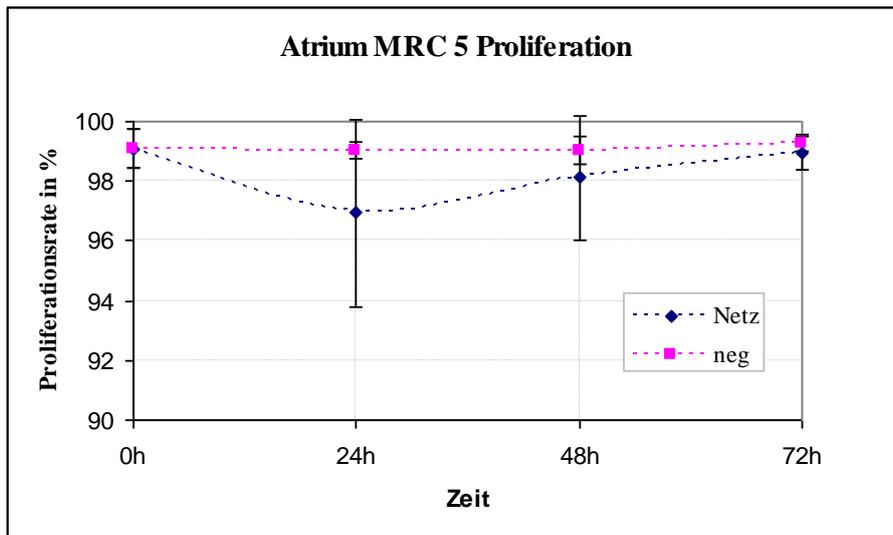
3.2.2.1. Atrium® ProLite nicht resterilisiert

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	99,08	0,65	99,08	0,65
24h	99,02	0,28	96,93	3,15
48h	99,02	0,47	98,11	2,07
72h	99,28	0,26	98,95	0,55

Tab. 5: MRC 5 Proliferation Atrium® ProLite nicht resterilisiert

Signifikante Unterschiede

keine



Graphik. 10: Darstellung der in Tabelle 5 dargestellten Messwerte

Ausgehend von einer 99,08 % igen Wachstumsrate am Beginn der Versuchsreihe, kommt es nach 24 Std. in der Netzgruppe zu einem Abfall der Proliferation auf 96,93 %, wobei diese in der Kontrollgruppe mit 99,02 % kaum sinkt. Im weiteren Verlauf steigt die Wachstumsrate nach 72 Std. auf 98,95 % an und liegt damit knapp unter der Proliferationsrate der Kontrollansätze (99,28 %) ohne Netze. Grafik 10 gibt einen Überblick über den Wachstumsverlauf beider Gruppen.

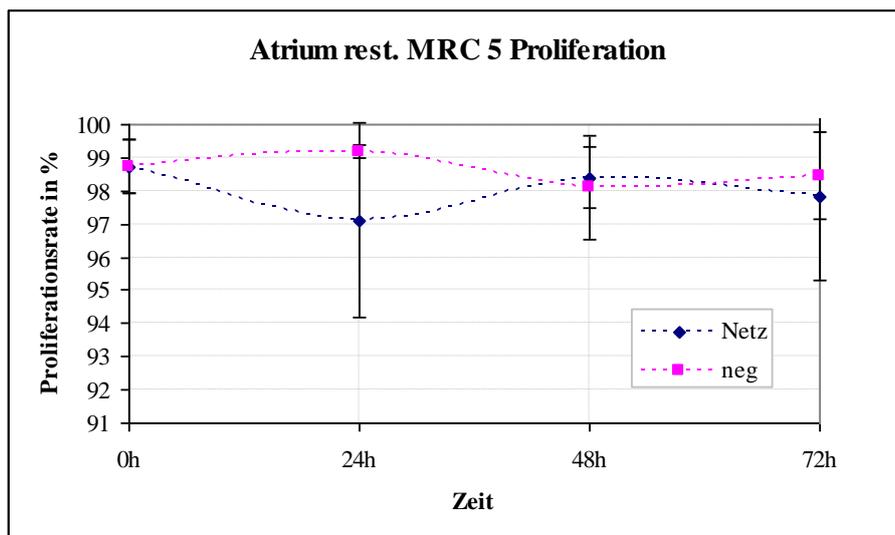
3.2.2.2. Atrium® ProLite resterilisiert

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	98,74	0,80	98,74	0,80
24h	99,18	0,20	97,11	2,93
48h	98,11	1,57	98,40	0,91
72h	98,46	1,29	97,81	2,52

Tab. 6: MRC 5 Proliferation Atrium® ProLite resterilisiert

Signifikante Unterschiede

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,013$



Graphik. 11: Darstellung der in Tabelle 6 dargestellten Messwerte

Kurz nach Beginn des Versuches kommt es in der Netzgruppe zu einem leichten Abfall der Proliferationsrate von 98,74 % auf 97,11 %. In der Kontrollgruppe steigt die Wachstumsrate dagegen auf 99,18 %. Nach 48 Std. nähern sich die Proliferationsraten wieder an (siehe Tabelle 6). Bei Abschluss der Versuchsreihe unterscheiden sich die Werte der beiden Gruppen nur um knapp 0,6 %, was keine eindeutigen Schlüsse bezüglich des Einflusses des resterilisierten Atrium Netzes auf die MRC 5 Zellkulturen zulässt.

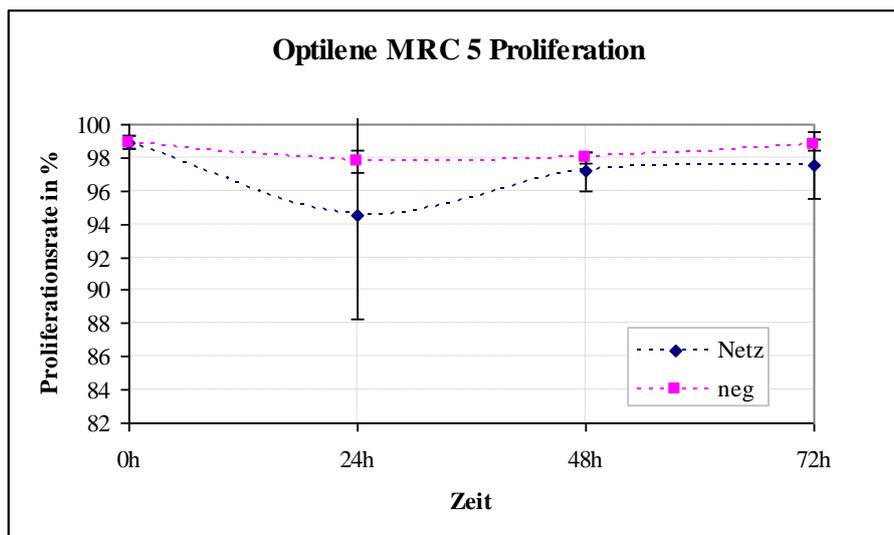
3.2.2.3. Optilene® Mesh LP

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	98,93	0,40	98,93	0,40
24h	97,79	0,69	94,53	6,26
48h	97,95	0,33	97,16	1,20
72h	98,74	0,33	97,54	1,97

Tab. 7: MRC 5 Proliferation Optilene® Mesh LP

Signifikante Unterschiede

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,005$



Graphik. 12: Darstellung der in Tabelle 7 dargestellten Messwerte

Der größte Effekt dieser Versuchsreihe lässt sich bereits nach 24 Stunden beobachten. In der Netzgruppe fällt die Proliferationsrate von 98,93 % auf 94,53 %. Im Vergleich dazu kommt es in der Kontrollgruppe nur zu einem Abfall auf 97,79 %. Im weiteren Verlauf steigt die Wachstumsrate der Netzgruppe wieder an, bleibt jedoch über den gesamten Zeitraum unter den Proliferationswerten in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 7 und Grafik 12)

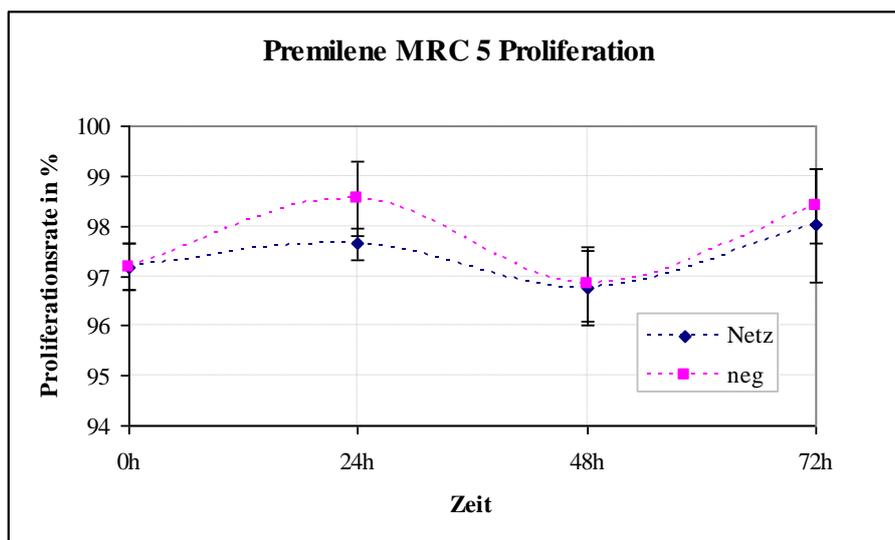
3.2.2.4. Premilene® Mesh LP

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	97,18	0,46	97,18	0,46
24h	98,55	0,32	97,64	0,76
48h	96,83	0,76	96,76	0,74
72h	98,40	1,13	98,01	0,73

Tab. 8: MRC 5 Proliferation Premilene® Mesh LP

Signifikante Unterschiede

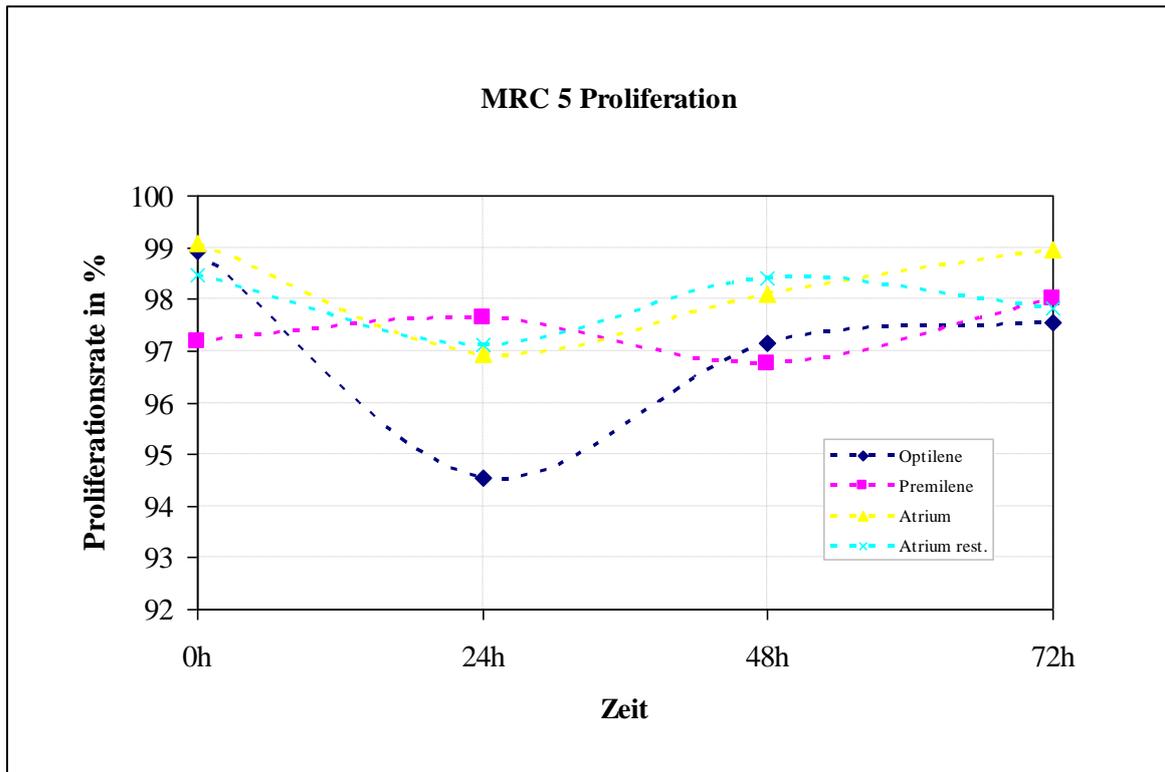
ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,012$



Graphik 13: Darstellung der in Tabelle 8 dargestellten Messwerte

Bereits 24 Std. nach Beginn der Versuchsreihe lässt sich ein deutlicher Anstieg der Proliferationsraten in der Netzgruppe und den Kontrollen feststellen, welcher im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Netz signifikant ist. In der Netzgruppe befinden sich mit 97,64 % etwas weniger Zellen in der Wachstumsphase als in der Kontrolle. Hier liegt die Wachstumsrate bei 98,55 %. Nach 48 Std. fällt die Proliferationsrate in beiden Gruppen ab. Auch hier liegt die Wachstumsrate der Zellen in der Netzgruppe unter den Werten der Kontrolle. Dies ändert sich auch nach 72 Std., dem Ende der Versuchsreihe nicht.

3.2.2.5. Zusammenfassung MRC 5 – Zellen Proliferation



Graphik. 14: Vergleich der Proliferationsrate der MRC 5 Zellen die mit den verschiedenen Netzen inkubiert wurden

Betrachtet man die Ergebnisdiagramme der Proliferationsraten von MRC 5-Zellen, die mit den unterschiedlichen Netzen inkubiert wurden, dann fällt zunächst auf, dass die Wachstumsraten der Zellen aus den Kontrollversuchen durchweg höher sind, als in den Netzgruppen. In den ersten 24 Stunden scheint die proliferative Aktivität der Zellen im Vergleich zur restlichen Inkubationszeit erniedrigt zu sein. Einschränkend wird jedoch darauf hingewiesen, dass diese Beobachtung zumindest beim nativen und resterilisierten Atrium® ProLite-Netz einer statistischen Signifikanz entbehrt.

Beim Premilene® Mesh LP-Netz kommt es zum Beginn des Versuches, und hier im Gegensatz zu den anderen Netzen, zunächst zu einem Anstieg der proliferativen Aktivität. Erst zum Zeitpunkt 48 Std. beobachtet man einen Abfall der Proliferationsrate. Da sich die MRC 5-Zellen bezüglich ihres Wachstumverhaltens jedoch in Kontroll- und Netzgruppe ähnlich verhalten, scheint dieser Effekt eher nicht von den Netzen ausgelöst zu werden.

3.3. Durchflusszytometrie HeLa – Zellen

3.3.1. Apoptose

3.3.1.1. Atrium® ProLite nicht resterilisiert

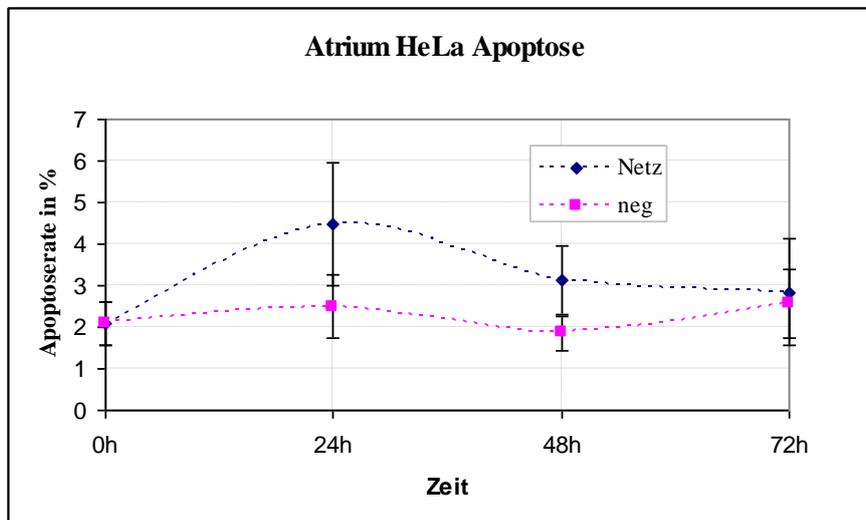
	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	2,11	0,53	2,10	0,53
24h	2,50	0,77	4,49	1,48
48h	1,85	0,41	3,13	0,82
72h	2,57	0,81	2,83	1,28

Tab. 9: HeLa Apoptose Atrium® ProLite nicht resterilisiert

Signifikante Unterschiede

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,003$

ohne Netz (48 Std.) / mit Netz (48 Std.) $p=0,004$



Graphik. 15: Darstellung der in Tabelle 9 dargestellten Messwerte

Die Apoptoseraten der HeLa-Zellen, die mit Atrium® ProLite-Netzen inkubiert wurden, unterscheiden sich durch einen minimalen Anstieg von 2,1 % auf 2,83 % nach 72 Std. kaum von denen des Kontrollansatzes ohne Netz. In der Gruppe der HeLa- Zellen, die mit Atrium® ProLite-Netzen inkubiert wurden, kommt es nach 24 Std. zu einem im Vergleich zu den Negativansätzen deutlichen Anstieg der Apoptoserate von 2,1 % auf

4,49 % und nach weiteren 24 Std. auf 3,13 %. In der Kontrollgruppe fällt die Apoptoserate nach 24 Std. von 2,5 % auf 1,85 % und steigt dann wieder auf 2,57 % nach 72 Std.

3.3.1.2. Atrium® ProLite restertilisiert

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	2,70	0,60	2,70	0,60
24h	1,74	0,44	3,68	1,91
48h	1,88	0,48	3,81	1,28
72h	2,75	1,28	4,70	0,95

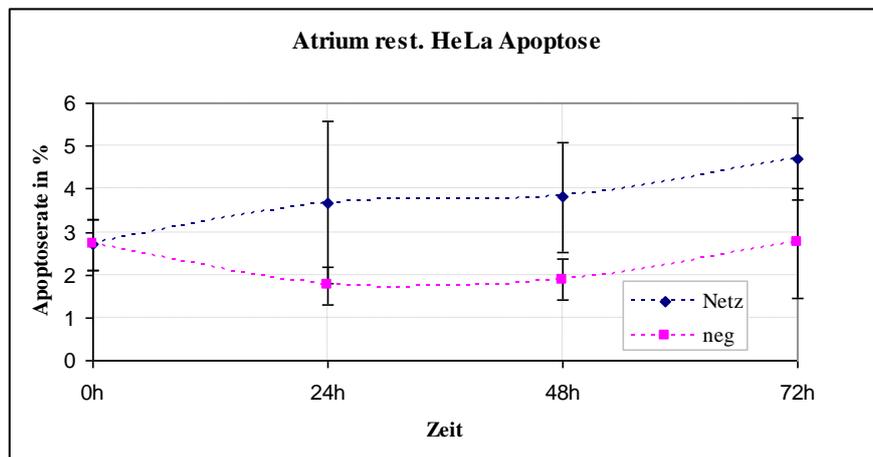
Tab. 10: HeLa Apoptose Atrium® ProLite restertilisiert

Signifikante Unterschiede

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,003$

ohne Netz (48 Std.) / mit Netz (48 Std.) $p=0,0001$

ohne Netz (72 Std.) / mit Netz (72 Std.) $p=0,009$



Graphik. 16: Darstellung der in Tabelle 10 dargestellten Messwerte

In der Gruppe der mit restertilisierten Atrium® ProLite-Netzen inkubierten HeLa-Zellen kam es schon nach 24 Std. zu einem Anstieg der Apoptoserate von 2,7 % auf 3,68 %. Demgegenüber stand ein Abfall der Apoptose bei den Kontrollen ohne Netz auf 1,74 %. Dieser Trend setzte sich fort, so dass nach 72 Std. die Absterberate in der Netzgruppe mit 4,7 % über der Apoptoserate der Kontrolle (2,75 %) lag. Graphik 16 verdeutlicht den

Versuchsverlauf. Somit unterscheidet sich die Apoptoserate in der Netzgruppe zu allen Zeitpunkten signifikant zu denen in der Kontrollgruppe.

3.3.1.3. Optilene® Mesh LP

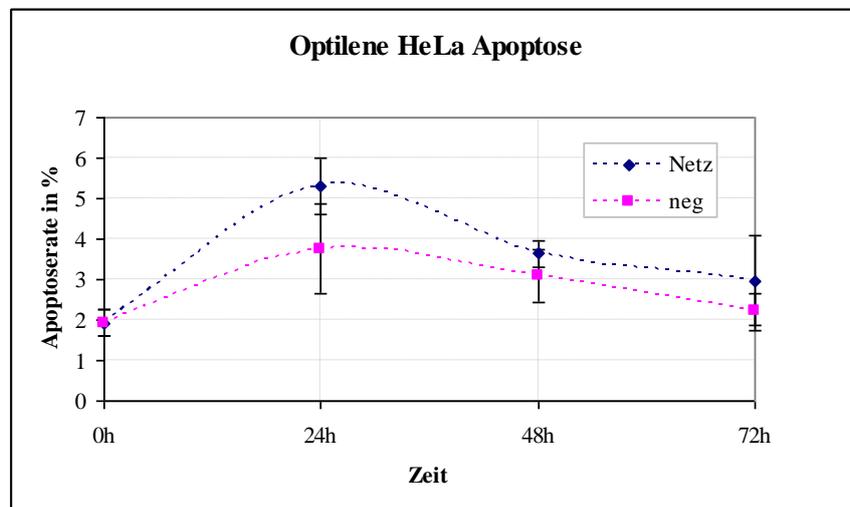
	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	1,93	0,34	1,93	0,34
24h	3,76	1,12	5,3	0,69
48h	3,07	0,65	3,64	0,32
72h	2,21	1,45	2,97	1,12

Tab. 11: HeLa Apoptose Optilene® Mesh LP resterilisiert

Signifikanzen:

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,007$

ohne Netz (48 Std.) / mit Netz (48 Std.) $p=0,047$



Graphik. 17: Darstellung der in Tabelle 11 dargestellten Messwerte

Wie in Graphik 17 sichtbar wird, steigt die Apoptoserate der Netzgruppe bereits nach 24 Std. von 1,93 % auf 5,3 % an. Im gleichen Zeitraum kommt es auch in der Kontrollgruppe zu einem Apoptoseanstieg, der mit 3,76 % aber niedriger ausfällt. Im weiteren Verlauf sinkt die Absterberate in beiden Gruppen und beträgt nach 72 Std. 2,97 % in der Netzgruppe und lediglich 2,21 % in der Kontrollgruppe.

3.3.1.4. Premilene® Mesh LP

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	2,23	0,26	2,23	0,26
24h	2,82	0,84	4,89	2,51
48h	2,02	0,30	3,08	0,88
72h	1,18	0,28	2,18	1,54

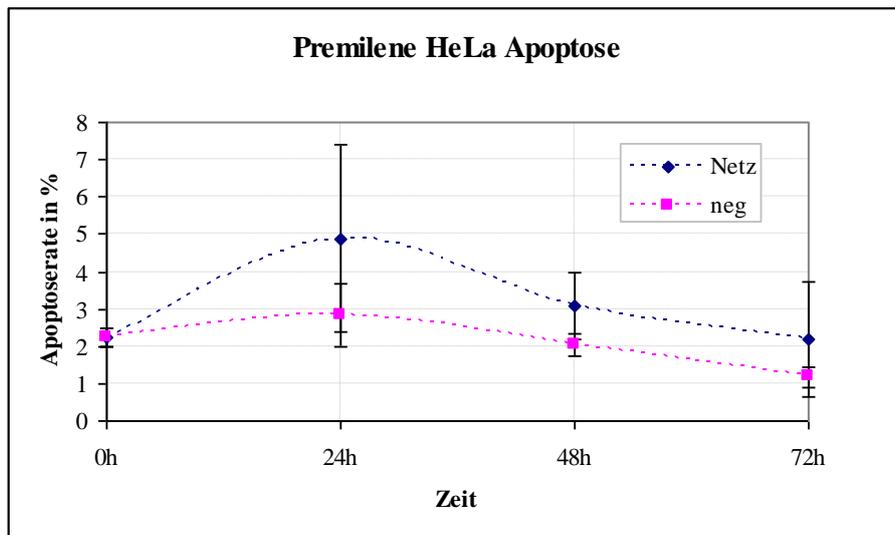
Tab. 12: HeLa Apoptose Premilene® Mesh LP reesterilisiert

Signifikante Unterschiede

ohne Netz (24 Std.) / mit Netz (24 Std.) $p=0,047$

ohne Netz (48 Std.) / mit Netz (48 Std.) $p=0,004$

ohne Netz (72 Std.) / mit Netz (72 Std.) $p=0,034$

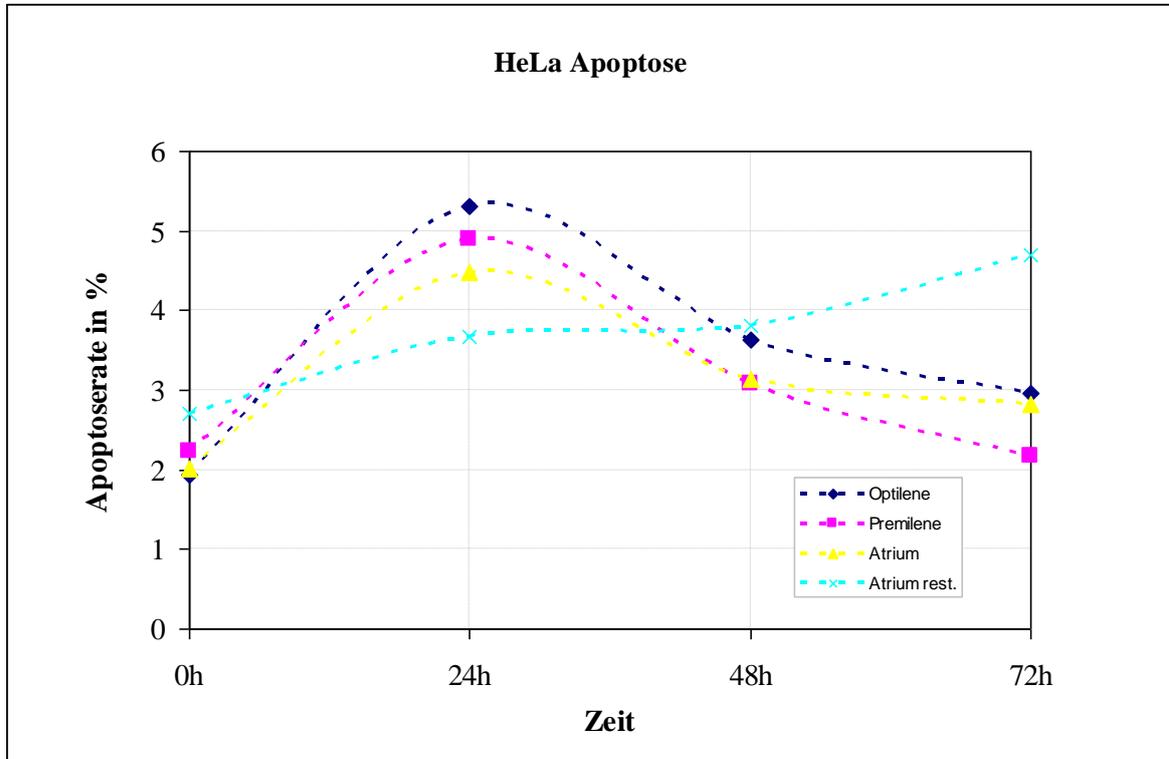


Graphik. 18: Darstellung der in Tabelle 12 dargestellten Messwerte

Auch in der Premilene® Mesh LP-Gruppe kommt es nach 24 Std. zu einem Anstieg der Apoptoserate von 2,23 % auf 4,89 %. Im Vergleich dazu steigt im gleichen Zeitraum die Apoptose in der Kontrollgruppe nur auf 2,82 %. Danach fällt die Absterberate wie bei den Atrium® ProLite- und Optilene® Mesh LP - Netzen wieder ab und erreicht nach 72 Std. in der Netzgruppe 2,18 % und in der Kontrollgruppe 1,18 %. Auch beim Premilene®

Mesh LP zeigt sich die Apoptoserate zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den Messwerten der Negativansätze signifikant erhöht.

3.3.1.5. Zusammenfassung HeLa – Zellen Apoptose



Graphik. 19: Vergleich der Apoptosewerte der HeLa Zellen die mit den verschiedenen Netzen inkubiert wurden

HeLa-Zellen verhalten sich ähnlich wie MRC 5-Zellen, wenn man sie mit Kunststoffnetzen aus Polypropylen inkubiert. Die erste Messung nach 24 Stunden zeigt einen Anstieg der Apoptoserate bei allen untersuchten Netzen. In den Kontrollgruppen steigt die apoptotische Aktivität im gleichen Zeitraum zwar auch leicht an, sie bleibt aber deutlich hinter den Werten in der Netzgruppe zurück. Im weiteren Verlauf sinkt die Apoptoserate wieder auf Werte ab, die mit der anfänglichen Apoptoserate vergleichbar sind. Eine Ausnahme bildet wieder das resterilisierte Atrium® ProLite. Die Apoptoserate steigt über den gesamten Versuchszeitraum hin an. Es ist nicht zu erkennen, ob mit Ende der Versuchsreihe die maximale apoptotische Aktivität erreicht ist.

3.3.2. Proliferation

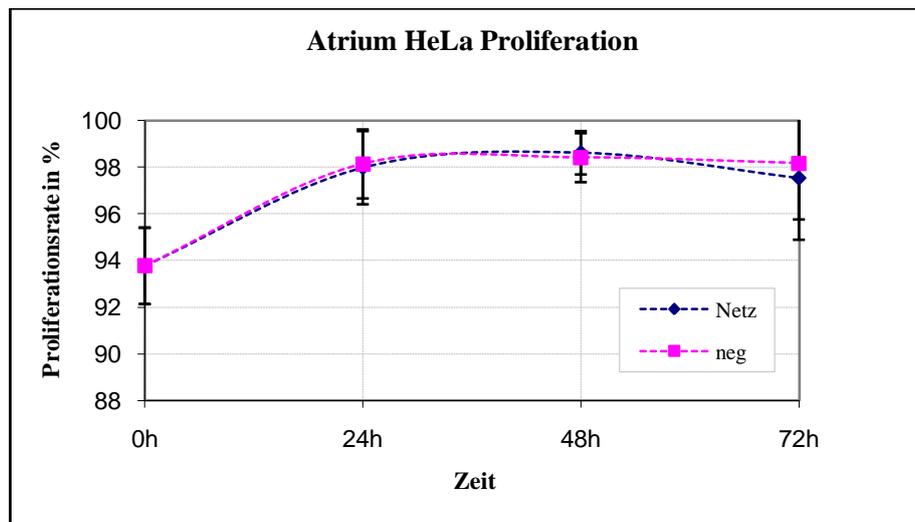
3.3.2.1. Atrium® ProLite nicht resterilisiert

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	93,78	1,64	93,78	1,64
24h	98,15	1,48	97,99	1,57
48h	98,42	1,05	98,63	0,93
72h	98,18	2,41	97,54	2,64

Tab.13: HeLa Proliferation Atrium® ProLite nicht resterilisiert

Signifikante Unterschiede

keine



Graphik. 20: Darstellung der in Tabelle 13 dargestellten Messwerte

Hier zeigten die Zellkulturen durchaus ähnliche Wachstumsverläufe. Bereits nach 24 Std. stieg die Proliferationsrate der Zellen der Atrium® ProLite- Gruppe von 93,78 % auf 97,99 %. Ein ähnliches Wachstumsverhalten ließ sich in der Kontrollgruppe beobachten (siehe Tabelle 13). Nach 72 Std. unterschieden sich die Proliferationsraten der beiden Gruppen um knapp 0,5 %, wobei die Wachstumsrate der Kontrollgruppe nur 98,18 % beträgt. Die Ähnlichkeit im Verhalten der beiden Gruppen veranschaulicht die Grafik (Graphik 20).

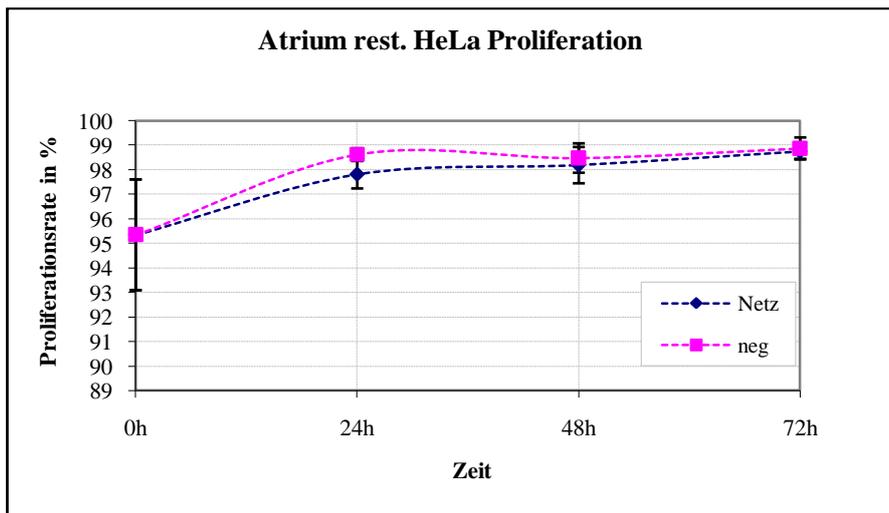
3.3.2.2. Atrium® ProLite restерilisiert

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	95,35	2,26	95,35	2,26
24h	98,62	0,26	97,81	0,57
48h	98,48	0,60	98,19	0,74
72h	98,87	0,45	98,74	0,29

Tab.14: HeLa Proliferation Atrium® ProLite restерilisiert

Signifikante Unterschiede

keine



Graphik. 21: Darstellung der in Tabelle 14 dargestellten Messwerte

Tabelle 14 verdeutlicht, dass bei allen Messungen der Proliferationsraten zu den einzelnen Zeitpunkten die Unterschiede zwischen Netzgruppe und Kontrollgruppe zwar ähnlich, aber um eine Beurteilung der Wachstumsunterschiede treffen zu können, nicht aussagekräftig genug sind. Es kommt zunächst zu einem Anstieg der Proliferation in beiden Gruppen. In der Zeit zwischen 24 Std. und dem Ende des Versuches nach 72 Std. ändern sich die Proliferationsraten nur noch minimal.

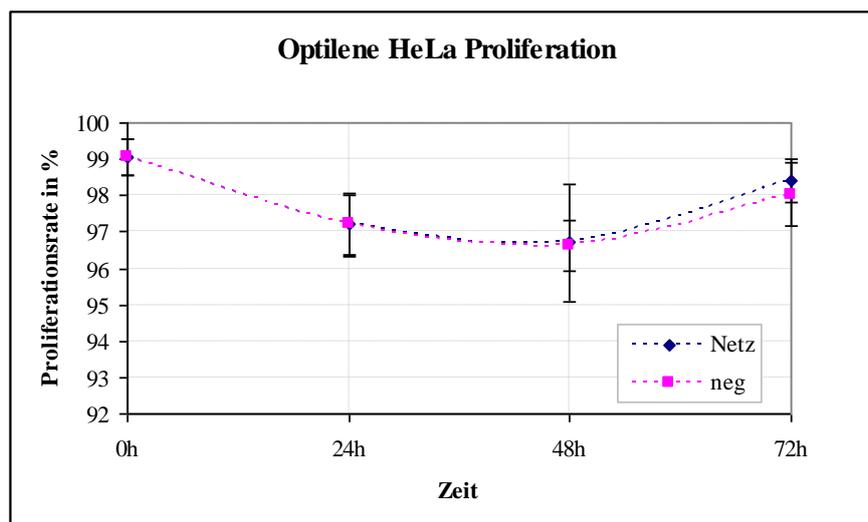
3.3.2.3. Optilene® Mesh LP

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	99,07	0,49	99,07	0,49
24h	97,20	0,83	97,20	0,86
48h	96,62	0,70	96,71	1,62
72h	98,03	0,88	98,42	0,60

Tab.15: HeLa Proliferation Optilene® Mesh LP resterilisiert

Signifikanzen:

keine



Graphik. 22: Darstellung der in Tabelle 15 dargestellten Messwerte

Nach 24 Std. kommt es in beiden Gruppen zu einem Abfall der Proliferationsraten von 99,07 % auf 97,2 %. Bei der nächsten Messung, nach 48 Std., fällt die Wachstumsrate leicht ab. Auch hier finden wir wieder nahezu identische Werte in den beiden Gruppen. Zum Ende der Versuchsreihe steigt die Proliferationsrate auf 98,42 % in der Netzgruppe und 98,03 % in der Kontrollgruppe an. Wie aus Tabelle 15 und Grafik 22 ersichtlich, sind erkennbare Unterschiede bei den Proliferationsraten der Netzgruppe und der Kontrollen nicht zu finden.

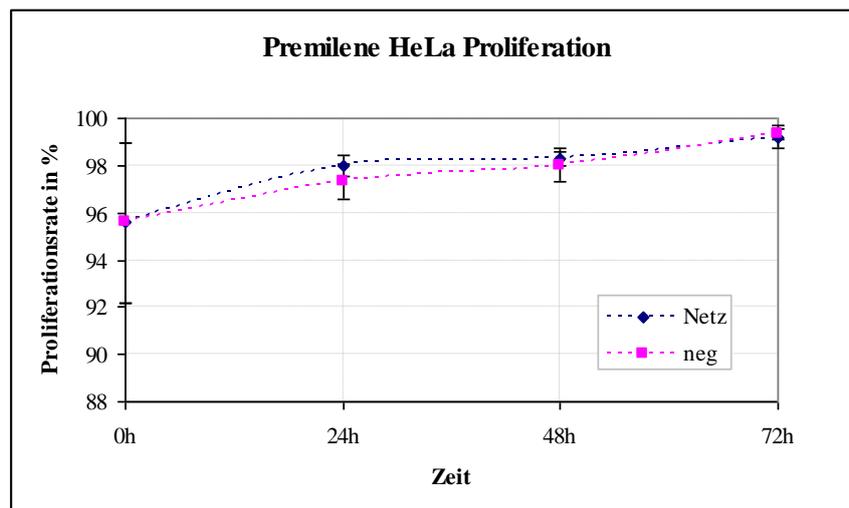
3.3.2.4. Premilene® Mesh LP

	Ohne Netz	SD	Mit Netz	SD
0h	95,57	3,40	95,57	3,40
24h	97,33	0,74	97,98	0,43
48h	98,00	0,70	98,32	0,30
72h	99,36	0,22	99,21	0,50

Tab.16: HeLa Proliferation Premilene® Mesh LP resterilisiert

Signifikante Unterschiede

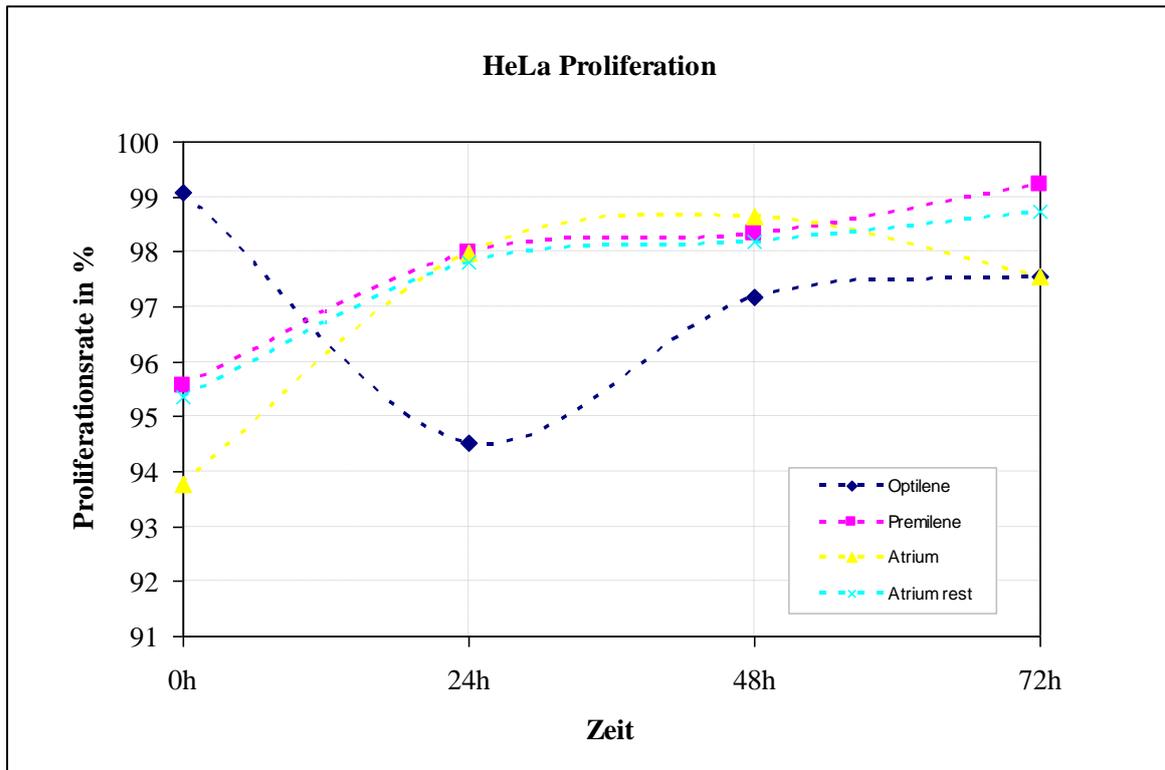
keine



Graphik. 23: Darstellung der in Tabelle 15 dargestellten Messwerte

Ausgehend von einer Proliferationsrate von 95,57 % zum Zeitpunkt 0 Std. entwickeln sich die Wachstumsraten der beiden Gruppen ähnlich. Es kommt zu einem stetigen Anstieg der Werte. Nach 72 Std. unterscheidet sich die Proliferationsrate der Netzgruppe mit 99,21 % nur um wenige Zehntel von der Kontrolle mit 99,36 %. Tabelle 16 und Grafik 23 verdeutlichen den Wachstumsverlauf beider Gruppen.

3.3.2.5. Zusammenfassung HeLa – Zellen Proliferation



Graphik. 24: Vergleich der Proliferationswerte der HeLa Zellen die mit den verschiedenen Netzen inkubiert wurden

Die Proliferationsraten der HeLa-Zellen zu Beginn der Untersuchung sind sehr unterschiedlich. Sie betragen zwischen 94 % bis zu 99 %. Mit Ausnahme des Optilene® Mesh LP steigt die Wachstumsrate im Verlauf der Untersuchung konstant an. Die Werte von Netz - und Kontrollgruppe unterscheiden sich dabei nur minimal.

3.4. Rasterelektronenmikroskopie

Beim Prolene® Herniennetz konnten in vorangegangenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen nach 72stündiger Inkubation mit Kulturmedium und humanen Fibroblasten oberflächliche Beschädigungen in Form schwarzer Punkte nachgewiesen werden. Insbesondere bei resterilisierten Prolene®-Netzen wurden zudem Risse und Spalten unterschiedlicher Tiefe sichtbar.

Neben der genauen Struktur der leichtgewichtigen Polypropylenetze, die in unsere Untersuchungen einbezogen wurden, sollten eventuelle Veränderungen des Materials nach Inkubation mit MRC 5-Zellen dokumentiert werden. Außerdem interessierten uns

die Auswirkungen des Resterilisierens auf die filamentäre Struktur des Atrium® ProLite-Netzes. Dazu wurden die Netze wie im Absatz „Aufbereitung der Netze“ beschrieben aufbereitet und den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zugeführt.

3.4.1. Atrium® ProLite

3.4.1.1. Atrium® ProLite steril

Die rasterelektronische Darstellung des steril der Packung entnommenen Atrium® ProLite Netzes (Abb.6) lässt die monofilamentäre Webstruktur gut erkennen. Die Oberfläche erscheint glatt und es lassen sich bei dieser Vergrößerung keine Beschädigungen erkennen. Der Detailausschnitt zeigt in Abb.6c an der der Verknüpfungsstelle abgewandten Seite die typischen zur Längsachse der Filamente verlaufenden Rillenstrukturen, die bei allen von uns untersuchten Netzen zu beobachten sind. An den Berührungspunkten der Filamente, wo es zu einer besonderen Stauchung kommt, erscheint die Oberfläche wellig und unregelmäßig. Bei maximaler Vergrößerung (Abb.6d) zeigen sich seitlich am Beginn der Stauchungszone mehrere nur wenige μm große Risse.

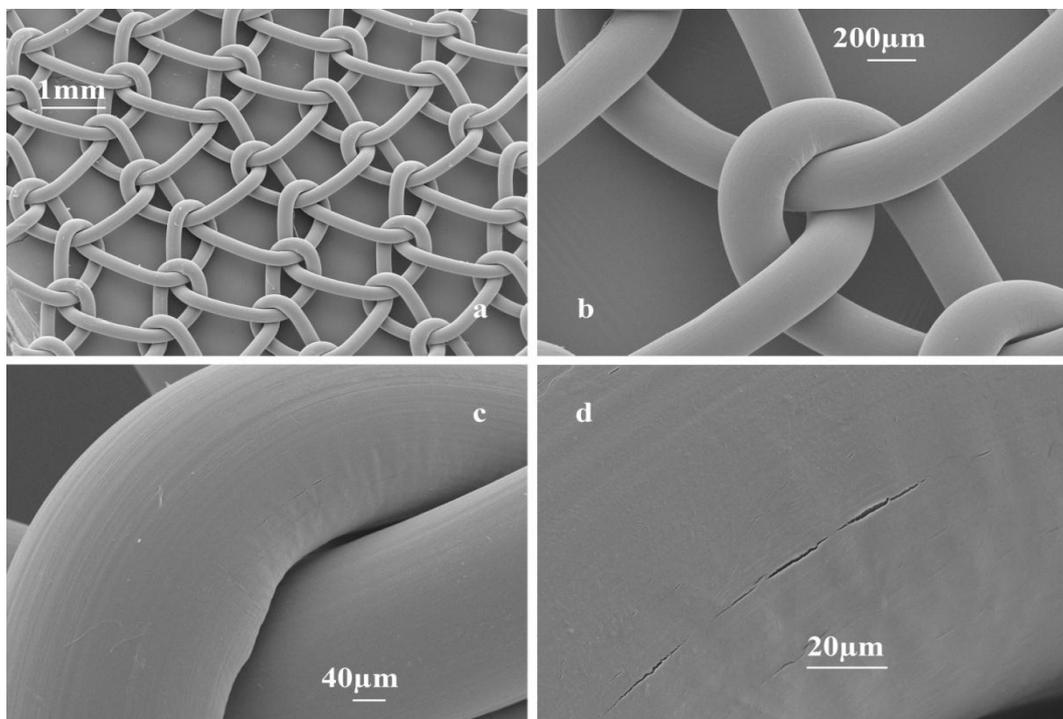


Abb. 6 - Elektronenmikroskopische Darstellung der sterilen Atrium® ProLite Netze

a: im Original 20fache Vergrößerung; **b:** im Original 84fache Vergrößerung;
c: im Original 312fache Vergrößerung; **d:** im Original 1250fache Vergrößerung

3.4.1.2. Atrium® ProLite nach Inkubation mit MRC 5-Zellen in Kulturmedium

Das Übersichtsbild (Abb.7a) und der Detailausschnitt (Abb.7b) zeigt Atrium® ProLite nach 72stündiger Inkubation mit Kulturmedium und MRC 5-Zellen. Mit Ausnahme von auskristallisierten Kulturmedium- resten stellt sich die gleiche Morphologie wie bei unbehandeltem Atrium® ProLite dar. Es kam offensichtlich nicht zu Schrumpfungen oder anderen Verformungen. Im Bildausschnitt (Abb.7c) fallen wieder die kristallinen Beläge auf, die vermutlich getrockneten Resten des Kulturmediums entsprechen. Neben der vorherbeschriebenen Rillenstruktur sind nun auch deutliche Längsrisse im unteren Drittel des Filamentes zu sehen. Im Gegensatz zum nativen Atrium® ProLite haben diese Risse eine Länge von deutlich mehr als 100 μm , und sind somit schon bei mittlerer Vergrößerung zu beobachten. Abb.6d zeigt Risse, die hauptsächlich in Längsrichtung parallel zu den Filamentrillen verlaufen, aber auch kleine schräge Risse, die von der Rillenstruktur abweichen. Zusätzlich werden bei 1250facher Vergrößerung weiße Punkte verschiedener Größe sichtbar.

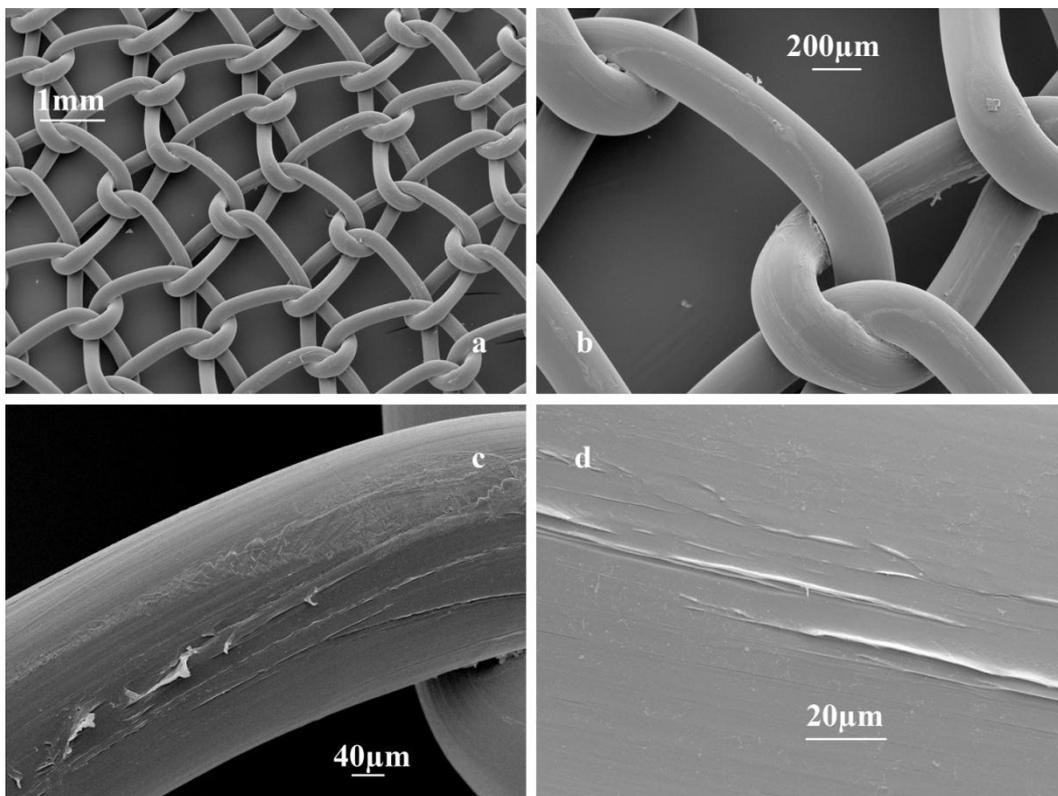


Abb. 7 – Elektronenmikroskopische Darstellung der Atrium® ProLite Netze nach Inkubation mit MRC 5 Zellen in Kulturmedium

a: im Original 20fache Vergrößerung; **b:** im Original 84fache Vergrößerung;
c: im Original 312fache Vergrößerung; **d:** im Original 1250fache Vergrößerung

3.4.2. Atrium® ProLite resterilisiert

3.4.2.1. Resterilisiertes Atrium® ProLite ohne Kontakt zu MRC 5-Zellen und Medium

Das Übersichtsbild (Abb. 8a) zeigt ein Atrium® ProLite-Netz nach erfolgter Resterilisation. In dieser Vergrößerung sind keine Beschädigungen der Netzstruktur zu erkennen. Auf Grund des ungünstigen Bildausschnittes imponiert im direkten Vergleich mit dem nativen, nicht sterilisierten Atrium® ProLite eine gewisse Inhomogenität. In Abb.8c stellen sich neben Unebenheiten der Filamentoberfläche, die wie kleine Bläschen erscheinen, auch Risse dar. Diese verlaufen nicht mehr parallel zu den Rillen in den Filamenten, sondern eher ungerichtet. Abb.8d zeigt noch einmal die Risse und Bläschen in 1250facher Vergrößerung. Insgesamt scheint sich die Oberflächenstruktur der Netze nach der Resterilisation verändert zu haben.

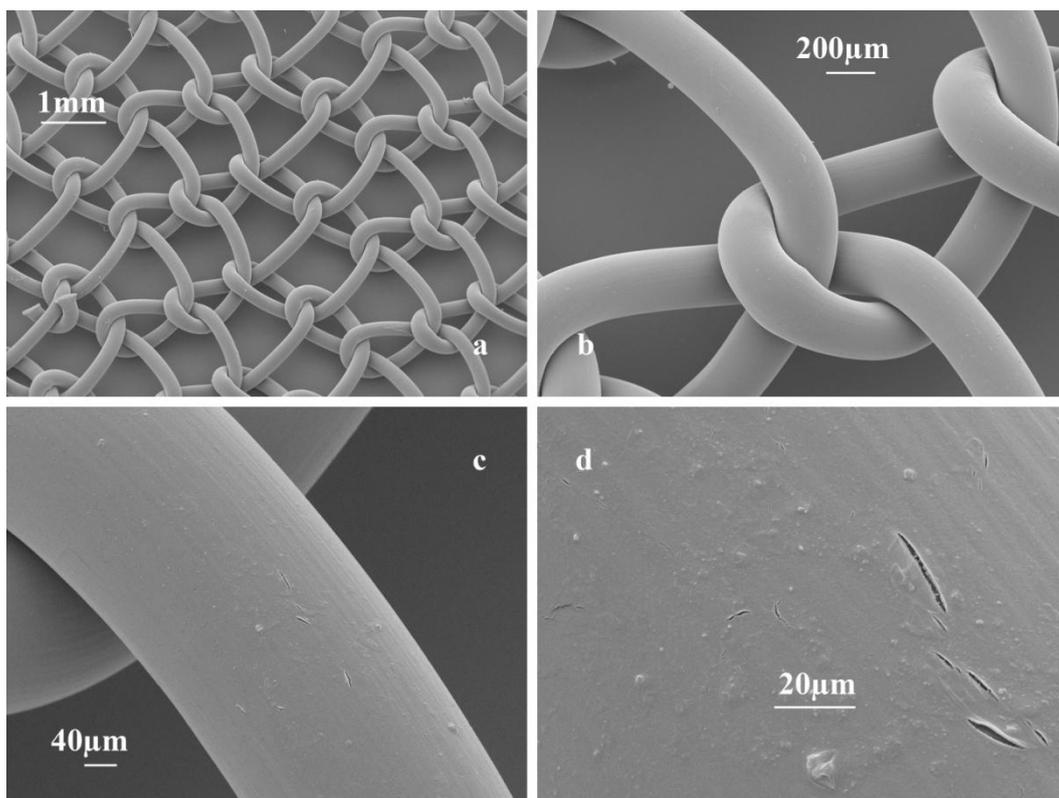


Abb.8 - Elektronenmikroskopische Darstellung der resterilisierten Atrium® ProLite ohne Kontakt zu MRC5 Zellen und Medium

a: im Original 20fache Vergrößerung; **b:** im Original 84fache Vergrößerung;
c: im Original 312fache Vergrößerung; **d:** im Original 1250fache Vergrößerung

3.4.2.2. Resterilisiertes Atrium® ProLite nach Inkubation mit MRC 5-Zellen in Kulturmedium

Auch nach Inkubation der resterilisierten Atrium® ProLite-Netze mit MRC 5-Zellen kam es nicht zu einer Veränderung der Maschenstruktur (Abb.9a). Der Detailausschnitt in Abb.9c zeigt eine längliche zipfelig auslaufende Erscheinung. Möglicherweise hat sich das Filament an dieser Stelle thermisch oder chemisch verformt. Bei 1250facher Vergrößerung (Abb.9d) wird sichtbar, dass die in Längsrichtung verlaufenden Rillen einer groben, scholligen Grundstruktur gewichen sind. Auskristallisationen des verwendeten Mediums sind nicht zu beobachten. Außerdem treten multiple wenige μm große Risse hervor.

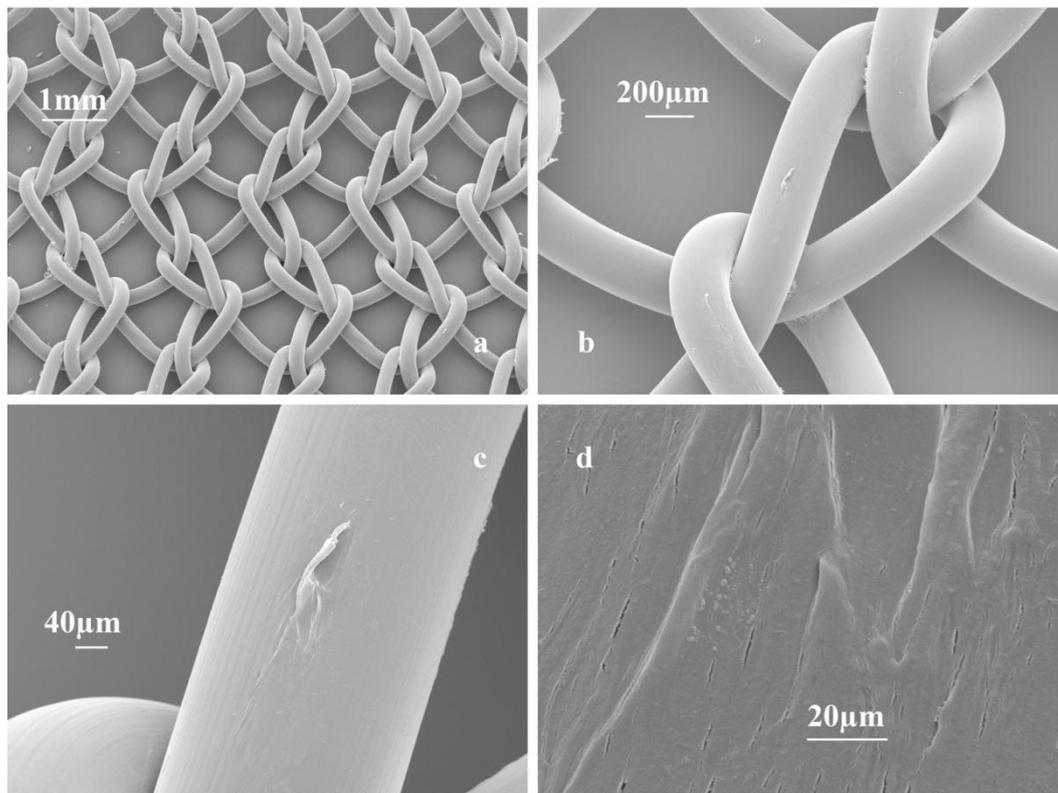


Abb.9 - Elektronenmikroskopische Darstellung von resterilisiertem Atrium® ProLite nach Inkubation mit MRC5 Zellen in Kulturmedium

a: im Original 20fache Vergrößerung; **b:** im Original 84fache Vergrößerung;
c: im Original 312fache Vergrößerung; **d:** im Original 1250fache Vergrößerung

3.4.3. Optilene® Mesh LP

3.4.3.1. Optilene® Mesh LP steril

In der Übersichtsdarstellung (Abb.10a) lässt sich die aufwändige Webstruktur des Optilene® Mesh LP erkennen. Die groben Maschen haben einem ungefähren Durchmesser von 3,5 mm. Abb.10b und c zeigen noch einmal die komplizierte Verknotung des Netzes im Detail. Bei dieser Vergrößerung werden schollige Strukturen sichtbar, welche die längsachsenparallele Rillenanordnung des Filamentes unterbrechen. Bei 312facher Vergrößerung (Abb.10c) zeigen sich neben der homogenen Rillenstruktur am linken Bildrand diverse Verformungen und Spalten. In Abb.10d kann man Polypropylenstränge beobachten, die nicht in das Netzfilament mit eingebunden sind. Darin haben sich ca. 15 µm durchmessende kugelförmige Gebilde verfangen, die sich dem Netz nicht zuordnen lassen.

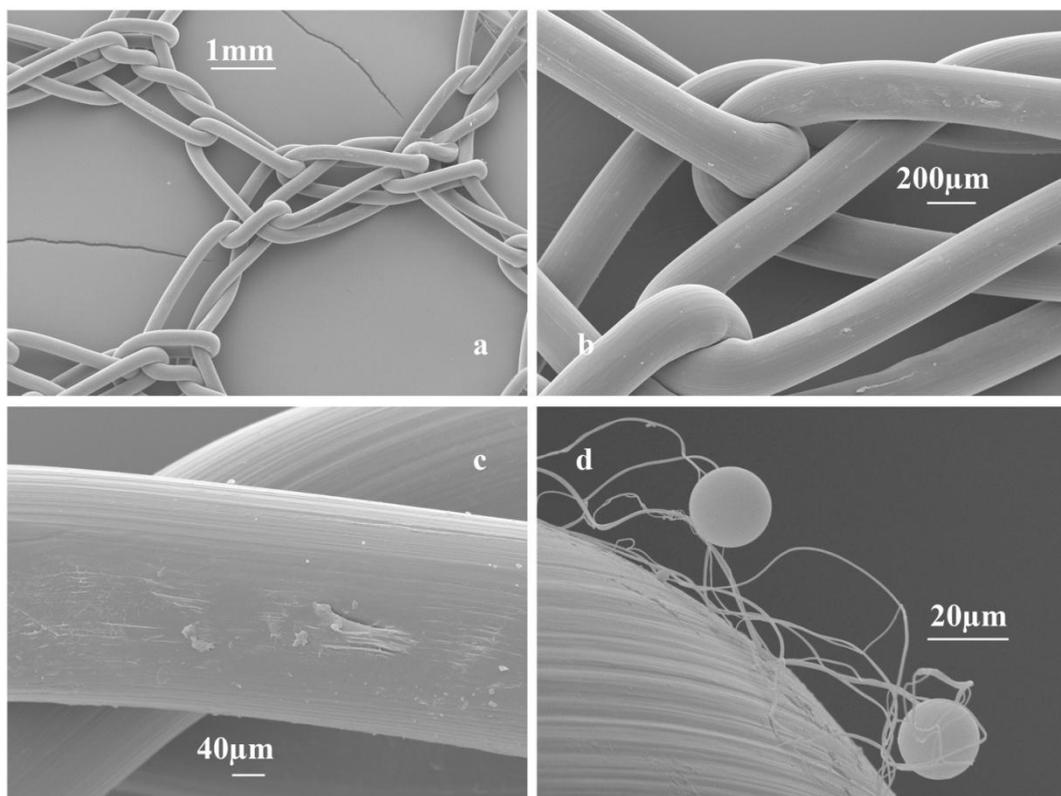


Abb.10 - Elektronenmikroskopische Darstellung des sterilen Optilene® Mesh LP

a: im Original 20fache Vergrößerung; **b:** im Original 84fache Vergrößerung;
c: im Original 312fache Vergrößerung; **d:** im Original 1250fache Vergrößerung

3.4.3.2. Optilene® Mesh LP nach Inkubation mit MRC 5-Zellen in Kulturmedium

Die Übersichtsdarstellung (Abb. 11a) des mit MRC 5-Zellen inkubierten Optilene® Mesh LP-Netz lässt weder Verformungen noch Schrumpfungsprozesse erkennen. Der Detailausschnitt in Abb.11c zeigt die auch schon vor der Inkubation sichtbaren Inkontinuitäten in der Rillenstruktur der Polypropylenfilamente. Abb.11d lässt schollige Auflagerungen erkennen, bei denen es sich vermutlich um Rückstände des Kulturmediums der MRC 5-Zellen handelt. Außerdem werden kleine Risse sichtbar, die parallel zu den Längsrillen der Filamente verlaufen.

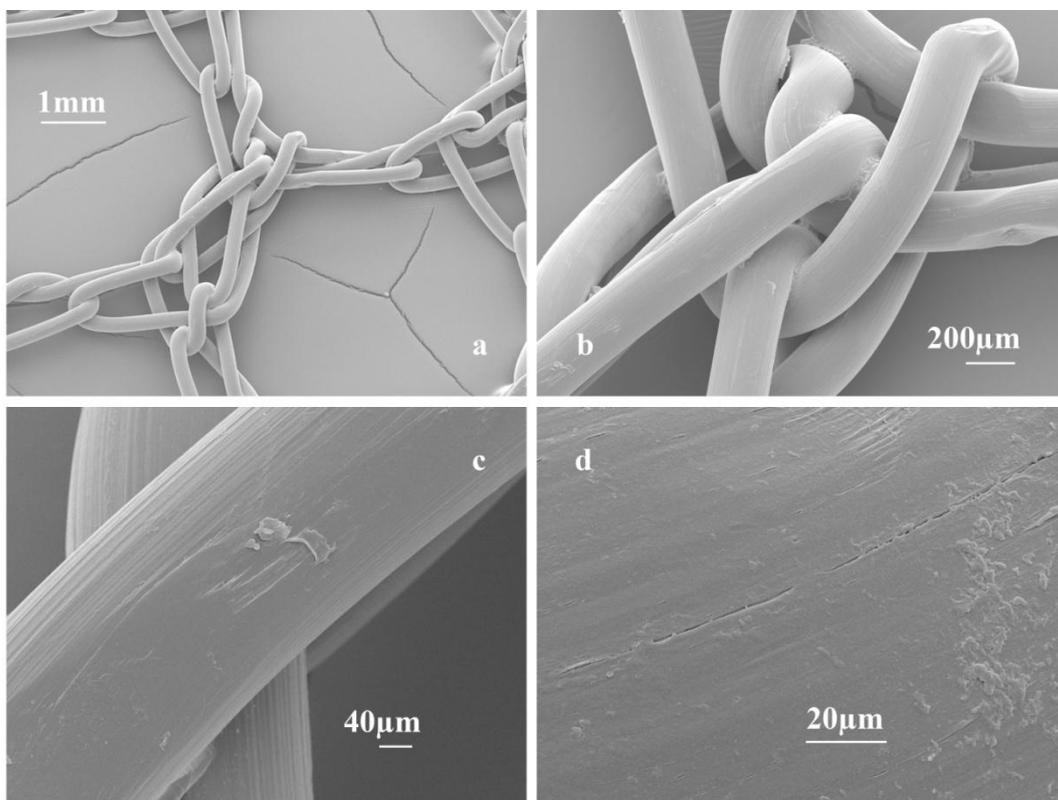


Abb.11 - Elektronenmikroskopische Darstellung des sterilen Optilene® nach Inkubation mit MRC 5-Zellen in Kulturmedium

a: im Original 20fache Vergrößerung; **b:** im Original 84fache Vergrößerung;
c: im Original 312fache Vergrößerung; **d:** im Original 1250fache Vergrößerung

4. Diskussion

Die Verwendung von Kunststoffnetzen zum Verschluss von Bruchlücken hat sich heute zu einer Standardmethode in der Hernienchirurgie entwickelt. Die Indikationsstellung zur Implantation von Herniennetzen erfolgt dabei immer großzügiger. (Luijendijk et al., 2000) In besonderem Maße finden Netze aus Polypropylen als alleinigen Kunststoff oder in Kombination mit anderen Materialien Anwendung. Durch die Verwendung der Herniennetze konnte das Hauptproblem der konventionellen Hernienchirurgie, nämlich die Entstehung von Rezidivhernien, deutlich reduziert werden. (Amid et al., 1992, Lichtenstein et al., 1993) Nach der Einführung von Kunststoffnetzen tauchte mit der eingeschränkten Biokompatibilität aber ein in der Hernienchirurgie bisher nicht gekanntes Problem auf. Neben der Beschreibung von diversen Früh- und Spätkomplikationen ist bis heute auch die Frage nach der Malignomentstehung durch Biomaterialien nicht befriedigend geklärt worden. Diese Problematik erhält dadurch zusätzliche Brisanz, da jährlich weltweit eine siebenstellige Zahl an Herniennetzen implantiert wird. Außerdem erhöht sich die Verweildauer der Biomaterialien im menschlichen Körper, weil immer jüngere Patienten ein Herniennetz zur Bruchversorgung erhalten. Bei einer angenommenen Netzimplantation im vierzigsten Lebensjahr und einer Lebenserwartung von 80 Jahren ergeben sich bei komplikationslosem Verlauf entsprechend lange Implantationszeiten.

Das Problem der eingeschränkten Biokompatibilität von Herniennetzen wurde auch von den Medizinprodukteherstellern erkannt. Seit einiger Zeit sind daher unter anderem materialreduzierte Herniennetze aus Polypropylen erhältlich. Diese unterscheiden sich vor allem durch ein geringeres Gewicht in g/m^2 und größere Maschendurchmesser von den traditionellen „schwergewichtigen“ Polypropylenetzen.

Einige Hersteller von Herniennetzen aus Polypropylen, unter anderem die Firma Ethicon, bieten in ihren Produktbeschreibungen die Möglichkeit an, die Netze nach erstmaligem Öffnen der Verpackung wieder zu resterilisieren. Danach kann man sie ohne Einschränkung zum Verschluss von Bruchlücken verwenden. (Broll et al, 2002)

Dies wird in medizinischen Schwellenländern bereits praktiziert, ohne dass nachteilige Effekte bezüglich der Biokompatibilität beobachtet wurden. (Serbetci et al, 2007). Vor einiger Zeit gelang es allerdings in einem in vitro Modell unter anderem nachzuweisen, dass resterilisierte Prolene[®]-Netze die apoptotische Aktivität und Proliferationsrate von humanen Fibroblasten ungünstig beeinflussen. Zudem wirken sich Resterilisation und

Inkubation der Netze nachteilig auf deren Materialbeschaffenheit aus. (Broll et al 2002)
Es ist bisher nicht geklärt, ob es sich dabei um Eigenarten des Prolene[®]-Netzes handelt, und ob diese Ergebnisse auch auf die heute häufiger verwendeten leichtgewichtigen Polypropylenetze anderer Hersteller übertragbar sind.

4.1. Das in vitro Modell

Bereits im Jahre 2002 wurde im chirurgischen Forschungslabor der Uniklinik Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. med. Rainer Broll mit einem in vitro Modell das Wachstums- und Apoptoseverhalten von menschlichen Zellen nach Inkubation mit einem Polypropylenetz der Firma Ethicon (Prolene[®]) untersucht. Es zeigte sich nach 48stündiger Inkubation von humanen Fibroblasten bzw. HeLa-Zellen eine im wesentlichen unbeeinflusste Proliferationsrate, im Gegensatz dazu aber eine deutliche Zunahme der Apoptoserate. (Duchrow et al., 2002) In weiteren in vitro Versuchen gelang es nachzuweisen, dass sich dieser Effekt bei Prolene[®]-Netzen, die den Angaben des Herstellers entsprechend resterilisiert wurden, noch verstärken lässt. (Broll et al 2002)

Humane Fibroblasten erschienen bei diesen Versuchen als Primärzellen sinnvoll, da sie eine große Rolle bei der Bildung einer Narbenplatte und beim Durchwachsen der Netzmaschen spielen. Außerdem stehen sie unter in vivo Bedingungen in direktem Kontakt zu den Fremdmaterialien. HeLa-Zellen sind bereits transformierte humane Zellen, die den Cervix - Epithelien entstammen. Sie wurden als Primärzellen gewählt, um das Wachstums- und Apoptoseverhalten transformierter Zellen nach Fremdkörperkontakt zu untersuchen. Dies erfolgte vor allem im Hinblick auf eine noch nicht geklärte Tumorinduktion von Biomaterialien.

Da sich die bisherigen Versuche nur auf ein Polypropylenetzmodell eines Herstellers konzentrierten, und sich mittlerweile eine Vielzahl von modernen Herniennetzen auf dem Markt befindet, haben wir es uns zum Ziel gesetzt, in einem in vitro Modell mit bewusst einfach gehaltenem Versuchsaufbau, 3 gängige leichtgewichtige Herniennetze aus Polypropylen, im Hinblick auf ihren Einfluss bezüglich des Wachstums- und Apoptoseverhaltens von HeLa- und MRC 5 (fibroblast like) - Zellen zu untersuchen. Da noch keine allgemeingültigen Standards für diese Art von Versuchen existieren, wählten wir Inkubationszeiten von 0, 24, 48 und 72 Stunden zur Verlaufsbeobachtung. Außerdem sollte untersucht werden, ob resterilisierte Atrium[®]-Netze das Wachstum und

Apoptoseverhalten unserer Primärzellen ebenso beeinflussen, wie es bei resterilisierten Prolene[®] Netzen beobachtet wurde.

Für die Bestimmung von Proliferationsindex und Apoptoserate wählten wir die Durchflusszytometrie. In vorherigen Untersuchungen hat sie sich als praktikabelste Untersuchungsmethode bewährt. Mit Hilfe des Antiköpers gegen Annexin V und das Ki-67 Protein lassen sich schnell quantitative Messungen von Proliferationsindex und Apoptoserate nach den entsprechenden Inkubationszeiten durchführen. Direkt nach der Ernte der jeweiligen Zellpopulationen erfolgte die „Färbung“ und im Anschluss daran bereits die durchflußzytometrische Untersuchung mit nachfolgender Datenverarbeitung.

4.2. Vergleich der unterschiedlichen Netze

Im Sinne der Aufgabenstellung entstehen je untersuchtem Netz 2 Gruppen. Eine Gruppe beinhaltet MRC 5-Zellen, die auch als „fibroblast like“ bezeichnet werden und modellhaft für menschliche Fibroblasten stehen. Diese Zellen verleihen dem implantierten Netz postoperativ durch Ausbildung einer Narbenplatte besondere Stabilität. Der Vergleich von Apoptoserate und Proliferationsindex innerhalb dieser Gruppe zeigt den Einfluss von ausgewählten leichtgewichtigen Polypropylnetzen auf MRC 5-Zellen nach den verschiedenen Inkubationszeiten. Die zweite Gruppe schließt den Teil der Netze ein, die mit HeLa-Zellen inkubiert wurde. Da HeLa-Zellen transformierte menschliche Zellen sind, sollen sie anhand ihres Proliferations- und Apoptoseverhaltens nach Kontakt mit den Herniennetzen einen möglichen Einfluss auf das Wachstum bzw. Absterben isolierter maligner menschlicher Zellen verdeutlichen.

4.2.1. MRC 5-Zellen

Das Apoptoseverhalten von MRC 5-Zellen, die mit den unterschiedlichen Herniennetzen inkubiert wurden, ist durchaus miteinander vergleichbar. Die Graphen der Ergebnisdigramme zeigen ähnliche Verläufe. Die insgesamt relativ niedrige apoptotische Aktivität der Zellen könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei den untersuchten Netzen um materialreduzierte leichtgewichtige Herniennetze handelt. Die maximale apoptotische Aktivität der mit den resterilisierten Atrium[®] ProLite-Netzen inkubierten MRC 5-Zellen fällt mit knapp 6,5 % zwar etwas geringer aus als beim Optilene[®] Mesh LP, welches nicht resterilisiert wurde. Interessant ist hier aber der

Zeitpunkt, an dem die maximalen Apoptosewerte gemessen wurden. Bei den resterilisierten Netzen konnten zum Ende des Untersuchungszeitraumes, also nach 72 Stunden, die höchsten Werte beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war bei den nativen Netzen, und hier ganz besonders beim Optilene[®] Mesh LP, zu Beginn der Messreihe, also schon nach 24 Stunden, der Scheitelpunkt der apoptotischen Aktivität erreicht. Bei den untersuchten Premilene[®] Mesh LP - Netzen zeigte sich dieser Effekt etwas diskreter.

Resterilisiertes Prolene[®] verhielt sich in einem früheren in vitro Versuch analog dem resterilisierten Atrium[®] ProLite in unserer Studie. Mit 20 % fielen die Apoptosewerte der damals mit dem resterilisierten Prolene[®] inkubierten Fibroblasten aber bedeutend höher aus. (Broll et al, 2002) In weiteren Studien, in denen die Apoptoserate immunhistochemisch mittels TUNEL – Technik nach Langzeitimplantation von Herniennetzen bestimmt wurde, zeigten sich sogar Apoptoseraten von 26 %. (Klosterhalfen et al., 2000)

Eine mögliche Ursache dafür könnte neben der Materialreduktion zum einen die unterschiedliche Fertigung der Atrium[®] ProLite-Netze sein. Denkbar wäre aber auch, dass MRC 5-Zellen etwas robuster, und somit toxischen Stoffen gegenüber unempfindlicher als Fibroblasten sind. Letztendlich weisen die Ergebnisse der verschiedenen Versuche in dieselbe Richtung. Bei unterschiedlichen Methoden und Primärzellen sind sie jedoch nicht ohne weiters direkt miteinander vergleichbar.

Der Verlauf der Proliferationsraten der MRC 5-Zellen ist bei allen untersuchten nativen Netzen ähnlich. Die Messwerte von Netz- und Kontrollgruppe liegen meist dicht beieinander. Es fällt auf, dass der Abfall der proliferativen Aktivität zu Beginn der Untersuchung zeitlich mit der ansteigenden Apoptoserate korreliert. Dieses deutet darauf hin, dass die in unsere Untersuchung mit eingeschlossenen Kunststoffnetze in den ersten 24 Stunden, in denen sie mit MRC 5-Zellen inkubiert wurden den größten Einfluss auf diese Zellen haben.

Resterilisierte Atrium[®] ProLite-Netze haben, anders als dies bei den Prolene[®]-Netzen der Fall ist, keinen besonderen Einfluss auf die proliferative Aktivität von MRC 5-Zellen. Auch wenn dies nicht durch statistische Signifikanz belegt werden kann, so setzt sich hier doch ein Trend fort, der auch bei den nativen Netzen beobachtet werden konnte.

Insofern ähneln sich unsere Ergebnisse mit denen vorheriger in vitro Untersuchungen. Hier zeigte sich eine im Wesentlichen unbeeinflusste proliferative Aktivität von HeLa-

Zellen und Fibroblasten, die mit Prolene[®]-Netzen inkubiert wurden. (Duchrow et al., 2002)

4.2.2. HeLa-Zellen

HeLa-Zellen verhalten sich nach Inkubation mit den nativen Netzen im wesentlichen so, wie wir es schon bei den MRC 5-Zellen beobachten konnten. Bereits nach 24 Stunden ist die maximale apoptotische Aktivität erreicht. Danach fallen die Werte auf mit dem Ausgangswert vergleichbare Zahlen zurück. Es gibt also auch hier ein klares Apoptosemaximum, ca. 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Da die erste Messung der Apoptoserate nach 24 Stunden stattfand, ist nicht sicher, ob vor oder nach diesem Zeitpunkt noch höhere Apoptosewerte messbar gewesen wären. Bei den 48 Stunden-Messungen ist die Apoptoserate bereits deutlich rückläufig. Die relativ niedrige apoptotische Aktivität könnte, wie schon bei der Betrachtung des Apoptoseverhaltens der MRC 5-Zellen vermutet, mit der speziellen Konstruktion dieser materialreduzierten Kunststoffnetze zusammenhängen. Native leichtgewichtige Herniennetze aus Polypropylen beeinflussen das Apoptoseverhalten von transformierten Zellen also offensichtlich ähnlich wie das von intakten menschlichen Zellen.

HeLa- und MRC 5-Zellen zeigen ein ähnliches Apoptoseverhalten, inkubiert man sie mit resterilisiertem Atrium[®] ProLite-Netz. Das Maximum der apoptotischen Aktivität ist zwar nach 72 Stunden, und damit wesentlich später als bei den unbehandelten Netzen, erreicht. Allerdings enden die Versuche auch nach 72 Stunden. Damit bleibt unklar, ob zu einem späteren Zeitpunkt noch höhere Werte messbar gewesen wären.

Die Proliferationsraten der HeLa-Zellen scheinen von den Kunststoffnetzen weitestgehend unbeeinflusst geblieben zu sein. Dies verdeutlichen eng beieinander liegende Werte von Netz – und Kontrollgruppe.

Auffällig sind die starken Schwankungen der Proliferationsraten zu Beginn der Versuchsreihen. HeLa-Zellen gelten auf Grund ihrer genetischen Transformation als biologisch unsterblich. Da sie sich also theoretisch und im Gegensatz zu den MRC 5-Zellen unendlich oft teilen können, nahmen wir auch keine Rücksicht auf ihr Alter und konservierten sie nach Ende der jeweiligen Versuche, um sie später für neue Ansätze zu reaktivieren (siehe Abschnitt Kryokonservierung der Zellen). In der Annahme der prinzipiellen Gleichheit der Zellpopulationen verwendeten wir HeLa-Zellen ohne

Rücksicht darauf, wie oft sich diese schon geteilt hatten. Mehrmaliges vorschriftsmäßiges Einfrieren und Auftauen könnte sich aber dennoch nachteilig auf die Zellen ausgewirkt haben, und somit zu gewissen Inhomogenitäten bezüglich ihrer Teilungsfreudigkeit geführt haben.

4.3. Elektronenmikroskopie

Unser Versuchsaufbau bedingte, dass nur ein geringer Teil der HeLa- und MRC 5 - Zellen, die sich auf Grund der allgemeinen Schwerkraft auf dem Boden der für die Untersuchungen verwendeten 12 Well-Platten befanden, tatsächlich mit den Kunststoffnetzen in direkten Kontakt kamen. Bedenkt man nun, dass Polypropylnetze eine Dichte von ungefähr $0,91 \text{ g/cm}^3$ haben, und in dem wässrigen Medium einen gewissen Auftrieb besitzen, hat unter Umständen keine der Zellen die Netze direkt berührt. Trotzdem zeigen sich im Vergleich von Netz- und Kontrollgruppen zum Teil deutliche Unterschiede bezüglich des Apoptose- und Wachstumsverhaltens der jeweiligen Primärzellen. Es wäre durchaus möglich, dass toxische oder zumindest die Zellen beeinflussende Substanzen die Netze verlassen haben könnten. Entsprechende Substanzen könnten sich z.B. als Rückstände des Herstellungsvorganges auf der Oberfläche der Netze befinden. Möglich wäre aber auch, dass zum einen der Inkubationsvorgang und zum anderen das Resterilisieren sowie beides in Kombination die Oberflächen- und Materialeigenschaften derart verändern, so dass von ihnen ein schädigendes Potential ausgeht. In vorherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Oberflächenstruktur steril der Packung entnommener Prolene[®]-Netze nach 48 stündiger Inkubationszeit mit Fibroblasten zum Teil stark verändert wurde. Bei resterilisierten Prolene[®]-Netzen sind neben den Oberflächenveränderungen sogar Strangbrüche beschrieben worden. (Broll et al, 2002)

Auf Grund dieser Beobachtungen führten wir eine Auswahl der durchflußzytometrisch untersuchten Netze auch der elektronenmikroskopischen Untersuchung zu. Zum besseren Vergleich wurde zum einen steril der Packung entnommenes Netzmaterial und zum anderen für 72 Stunden mit Kulturmedium und MRC 5-Zellen inkubiertes Netz unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich bei den steril der Packung entnommenen Netzen diverse Auffälligkeiten beschreiben lassen. Während sich beim Atrium[®] ProLite einige, nur wenige μm große Risse beobachten

ließen, zeigten sich bei dem Optilene® Netz zum Teil grobschollige und inhomogene Filamentstrukturen.

In diesen haben sich vermutlich fertigungsbedingt ca. 15 µm große kugelförmige Gebilde verfangen. Die Oberflächen der Netze entsprechen also nicht unbedingt der Idealvorstellung einer glatten regelmäßigen Hülle, die man von einem inerten Biomaterial erwarten sollte.

Nach dem Vorgang des Resterilisierens, welches für 20 min bei 121 °C in einem gewöhnlichen Dampfautoklaven erfolgte, zeigten sich auf der Oberfläche des Atrium® ProLite-Netzes längliche zipfelig auslaufende Erscheinungen. Die typischerweise in Längsrichtung verlaufenden Rillen wichen einer vergrößerten scholligen Grundstruktur. Es sieht so aus, als ob die parallelen Filamentstrukturen durch den Vorgang des Erhitzens miteinander verschmolzen sind. Außerdem wurden die schon bei den nativen Atrium® ProLite Netzen aufgefallenen kleinen Risse jetzt in größerer Anzahl sichtbar. Es ist bekannt, dass sich Polypropylen kurzfristig auf Temperaturen von 140 °C erhitzen lässt. Der Schmelzpunkt liegt mit 160 °C knapp 40 Kelvin oberhalb der in unserem Dampfautoklaven herrschenden Temperatur. Die 121 °C und das feuchte Milieu in dem Dampfautoklaven reichen anscheinend aus, um die beschriebenen Veränderungen der Oberflächenstruktur herbeizuführen. Dieser Umstand wirkt sich offensichtlich nachteilig auf die Biokompatibilität der Netze aus. Bei HeLa- und MRC-5 Zellen lässt sich nach Inkubation mit resterilisierten Atrium® ProLite-Netzen, zumindest bezüglich ihrer apoptotischen Aktivität, ein völlig anderes Verhalten beobachten als nach Inkubation mit nativen Netzen. Dies entspricht im Wesentlichen auch den Ergebnissen vorheriger in vitro Untersuchungen. (Broll et al, 2002)

Darüber hinaus gab es in den letzten Jahren immer wieder Beschreibungen von verhärteten und geschrumpften Netzen, die zum Teil jahrelang in menschlichen Körpern implantiert waren. Eine Studie berichtet über explantierte Netze, bei denen eine Schrumpfung von bis zu 30% beobachtet wurde. (Klosterhalfen et al., 2002) Diese Schrumpfungstendenz der Herniennetze könnte z.B. durch die Straffung des Bindegewebes, welches das Netz im Laufe der Zeit umgibt und für zusätzliche Stabilität sorgen soll, erklärt werden. Eine im Jahre 2003 veröffentlichte Studie zeigte jedoch, dass es bei Polyester- und Polypropylenetzen auch zu teilweise erheblichen Schrumpfungsbzw. Ausdehnungsprozessen kommt, wenn Kunststoffnetze unter in vitro Bedingungen

mit verschiedenen Milieus in Verbindung gebracht werden. Die anschließende elektronenmikroskopische Untersuchung der Netze, die zum Teil in Aqua dest. oder Blut inkubiert wurden, zeigte auch hier deutliche Veränderungen der oberflächlichen Struktur. (Coda et al., 2003)

Es zeigt sich in unserer in vitro Studie, dass ein wässriges Medium und zumindest theoretisch auch MRC 5 – Zellen, schon nach 72 Std. elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderungen an den leichtgewichtigen Polypropylenetzen verursachen. Die Oberflächenstruktur des Atrium® ProLite-Netzes erscheint nach dem Vorgang des Resterilisierens leichtgradig und nach zusätzlicher Inkubation mit Nährmedium und MRC 5-Zellen erheblich verändert. Dies spiegelt sich auch in einem völlig anderen Apoptoseverhalten der mit resterilisiertem Atrium® ProLite-Netz inkubierten Primärzellen wieder. Da sich Apoptose- und Wachstumsverhalten der Zellen bei den nicht resterilisierten Netzen ähneln, scheint der Vorgang des Resterilisierens zumindest für die prolongiert erhöhte Apoptoserate verantwortlich zu sein. Dass die maximale Apoptoserate mit knapp 6,5 % nur einem Drittel der von Bethge beschriebenen apoptotischen Aktivität der Fibroblasten nach Inkubation mit resterilisiertem Prolene®-Netz entspricht, könnte mit der Materialreduktion des leichtgewichtigen Atrium® ProLite-Netzes zusammenhängen. Das Atrium® ProLite Netz ist mit 85 g/m² zwar nur 23,5 g leichter als das Prolene®- Netz, ausschlaggebend ist hier aber sicher nicht das Gesamtgewicht, sondern die Oberfläche der Netze.

5. Zusammenfassung

Mit einer überschaubaren gut nachzuvollziehenden Versuchsanordnung haben wir den Einfluss von leichtgewichtigen Herniennetzen aus Polypropylen auf MRC 5- und HeLa-Zellen untersucht. Die zusammen mit den Kunststoffnetzen inkubierten menschlichen Zellen lassen außerzufällige, d.h. statistisch signifikante Unterschiede im Apoptoseverhalten erkennen, wenn man sie mit einer Kontrolle vergleicht, bei der die MRC 5- und HeLa-Zellen ohne Netzmaterial inkubiert wurden. Die gefundenen Unterschiede betreffen sowohl die Intensität als auch das zeitliche Ausmaß der Apoptose.

In besonderem Maße trifft dieses auf das Optilene[®] Mesh LP zu, das unter den definierten Bedingungen eine beträchtliche Apoptoserate zeigt. Resterilisiertes Atrium ProLite wiederum löst einen prolongierten nachhaltigen Apoptoseverlauf aus. Die apoptotische Aktivität liegt dabei erheblich unterhalb der bei traditionellen schwergewichtigen Polypropylnetzen gemessenen Werte. Auch wenn es noch nicht gelungen ist, den apoptoseauslösenden Faktor zu benennen, so scheint mit der Materialreduktion der Herniennetze, der richtige Weg bezüglich einer verbesserten Biokompatibilität eingeschlagen worden zu sein. (Weyhe et al., 2007)

Das Resterilisieren von einmalig der Packung entnommenen Polypropylnetzen stellt im Hinblick auf die Kostenminimierung bei immer größer werdendem Kostendruck in der Medizin einen eleganten Lösungsansatz dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen aber, dass sowohl Apoptose- und Wachstumsverhalten der Zellen, als auch die morphologischen Eigenschaften der Netze durch die Prozedur des Autoklavierens negativ beeinflusst werden. Im Hinblick auf die zu erwartenden langen Implantationszeiten der Netze im menschlichen Körper sollte das Resterilisieren der Netze generell kritisch überdacht werden.

In diesem in vitro Versuch verhalten sich HeLa-Zellen, die modellhaft für maligne menschliche Zellen stehen, nicht anders als intakte Zellen. Dies zeigt zumindest, dass leichtgewichtige Herniennetze aus Polypropylen in vitro keinen besonderen Einfluss auf transformierte Zellen haben, was zu den Beobachtungen der letzten 60 Jahre passt. Daher ist die Zurückhaltung bei der Indikationsstellung für die Anwendung von Herniennetzen bezüglich z.B. sarkomartiger Gewebealteration nicht gerechtfertigt.

Es ist möglich, in einem *in vitro* Versuch mit relativ einfach gehaltenem Aufbau, die Wechselwirkungen zwischen Biomaterialien und humanen Zellen zu verdeutlichen und daraus wichtige Schlüsse zu ziehen. Die verwendeten Netze und Primärzellen sind im Prinzip austauschbar. So lassen sich z.B. auch Wechselwirkungen zwischen Gefäßprothesen und Epithelzellen in einem solchen *in vitro* Modell untersuchen. Die Versuche sind standardisierbar, liefern schnell Resultate. Sie eignen sich z.B., um Wechselwirkungen zwischen neu entwickelten Biomaterialien und menschlichen Zellen, welche erwartungsgemäß mit diesen Werkstoffen interagieren werden, zu dokumentieren, oder verschiedene Materialien miteinander zu vergleichen. Da die *in vitro* ablaufenden Vorgänge auch im menschlichen Körper stattfinden, sind die Ergebnisse dieser Arbeit prinzipiell auch auf den Menschen übertragbar.

6. Literaturverzeichnis

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

Ann Diag Pathol 7:35-46 (2003)

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

Hernia 7:13-16 (2003)

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

Chirurgie 118:551-8 (1992)

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

Langenbecks Arch Chir 379:168-71 (1994)

Bassini E:

40. Band *Archiv für Klinische Chirurgie* (1890)

Bellon JM, Bujan J, Contreras La, Hernando A: Integration of biomaterials implanted into abdominal wall: process of scar formation and macrophage response.

Biomaterials 16:381-7 (1995)

Bethge T: In-vitro Untersuchungen zur Interaktion implantierbarer Kunststoffnetze aus Polypropylen mit humanen Fibroblastenkulturen

Med Diss. (2004)

Broll R, Bethge T, Windhövel U, Schwandner O, Markert U, Bruch HP,

Duchrow M: Influence of reesterilized polypropylene meshes on growth of human fibroblasts – an experimental in vitro study

Zentralbl Chir 127:589-593 (2002)

Coda A, Bendavid R, Botta-Micca F, Bossotti M, Bona A: Structural alterations of prosthetic meshes in humans.

Hernia 7:29-34 (2003)

Darzynkiewicz Z, Juan G, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F: Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death.

Cytometry 27:1-20 (1997)

DeBord JR: The historical developments of prosthetics in hernia surgery.

Clin North Am 78:973-1006 (1998)

DeGuzman LJ, Nyhus LM, Yared G, Schlesinger PK: Colocutaneous fistula formation following polypropylene mesh placement for repair of a ventral hernia. diagnosis by colonoscopy.

Endoscopy 27:459-461(1995)

Deligiannidis N, Papavasiliou I, Sapolidis K, Kesisoglou I, Papavramidis S, Gamvros O: The use of three different mesh materials in the treatment of abdominal wall defects.

Hernia 6:51-55 (2002)

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

Chirurg 73:154-160 (2002)

Endl E, Hollmann C, Gerdes J: Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis.

Meth Cell Biol 63:399-418 (2001)

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

J Immunology 133:1710-15 (1984)

Gray MR, Curtis JM Elkington JS: Colovesical fistula after laparoscopic inguinal hernia repair.

Br. J Surgery 81:1213-1214 (1994)

Hart H, Craine LE, Hart DJ, Hadad CM: Organische Chemie

3.Auflage Kapitel 14, S. 525-526 (2007) Wiley – VCH Verlag Weinheim

Hermanns B, Klinge U, Alfer J, Rosch R, Junge K, Klosterhalfen B: Pro oncogenesis and surgical meshes.

Viszeralchirurgie 39:42-47 (2004)

Hume RH, Bour J: Mesh migration following laparoscopic inguinal hernia repair.

J Laparaendosc Surg 6:333 (1996)

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

World J.Surg 26:1472-80 (2002)

Klein P, Konzen G, Schmidt O, Hohenberger W: Die Rekonstruktion von Narbenhernien- Intraoperative Tensiometrie zur Objektivierung der Verfahrenswahl.

Chirurg 67:1020 (1996)

Klinge U, Conze J, Klosterhalfen B, Limberg W, Obolenski B, Öttinger AP, Schumpelick V: Veränderung der Bauchwandmechanik nach Mesh-Implantation.

Langenbeck Arch Chir 381:323-332 (1996)

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

Biomaterials 20:613-623 (1999)

Klosterghalfen B, Junge K, Hermanns B, Klinge U: Influence of implantation interval on the long-term biocompatibility of surgical mesh.

Br J Surg 89:1043-1048 (2002)

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

Chirurg 71: 43-51 (2000)

Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V: Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair.

Biomaterials 19:2235-2246 (1998)

Korenkov M, Sauerland S, Paul A, Neugebauer E: Die deutsche Narbenhernienchirurgie im Umbruch. Ein Vergleich zweier Kliniksumfragen 1995 und 2001.

Zentralbl Chir 127:700-705 (2002)

Köhler A: Geschichtliches über unser Nahtmaterial.

Deutsche Medizinische Wochenschrift (1901)

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

Chirurg 74:638-645 (2003)

Langer I, Herzog U, Shuppisser JP, Ackermann C, Tondelli P: Die präperitoneale Netzeinlage zur operativen Versorgung der Rezidivleistenhernie.

Chirurg 67:994-402 (1996)

Langer S, Christiansen J: Long term results after incisional hernia repair.

Acta Chir Scand 151: 217-219 (1985)

Lau WY: History Treatment of Groin Hernia.

World J Surg 26:748-759 (2002)

Liakakos T, Karanikas I, Panagotidis H, Dendrinis S: Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia.

Br J Surg 81:248-249 (1994)

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

Surg clin north am 73:529 (1993)

Lichtenstein IL, Schulman Ag, Amid PK, Montlor MM: The tension-free hernioplasty.

Am J Surg 157:188 (1989)

Losanoff JE, Richman BW, Jones JW: Entero-colocutaneous fistula: A late consequence of polypropylene mesh abdominal wall repair: Case report and review of the literature.

Hernia 6:144-147 (2002)

Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP: A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia.

N Engl J Med 343:392-98 (2000)

Mayo WJ: An operation for the radical cure of umbilical hernia.

Ann Surg 34:276-280 (1901)

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

Zentralbl Chir 122:859- 861 (1997)

Peiper C, Klinge U, Junge K, Schumpelick V: Netze in der Leistenhernienchirurgie.

Zentralbl Chir 127: 573-577 (2002)

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

Biomaterials 6:346-351 (1985)

Schardey HM, Schopf S, Rudert W, Knappich P, Hernandez-Richter T: Titanised polypropylene meshes: First clinical experience with the implantation in TAPP technique and the results of a survey in 22 German surgical departments

Zentralbl Chir 125(5):363-8 (2004)

Schiebler T, Schmidt W, Zilles K: Anatomie

8.Auflage, Kapitel 10 S. 247 (1999) Springer Verlag Berlin Heidelberg

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

Chirurg 67:419-424 (1996)

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

Chirurg 68:1297-1300 (1997)

Schumpelick V, Conze I, Klinge U: Die präperitoneale Netzplastik in der RepARATION der Narbenhernie.

Chirurg 67:1028 (1996)

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

Chirurg 70:422-430 (1999)

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

J Immunol Meth 90:65-70 (1986)

Serbetci K, Kulacoglu H, Devay AO, Hasirci N: Effects of reesterilization on mechanical properties of polypropylene meshes

Am J Surg: 194(3):375-9 (2007)

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

Arch Surg 125:529 (1996)

Tang L, Jennings TA, Eaton JW: Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials.

Proc Natl Acad Sci USA 95:8841-8846 (1998)

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

J Lab Clin Med 122 (3):292-300 (1993)

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

Zentralbl. Chir 122:879-884 (1997)

Usher FC, Cannon JP: A new plastic mesh for replacing tissue defects, experimental study

Arch Surg 78:131 (1959)

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

Cytometry 31 (1):1-9 (1998)

Vestweber KH, Lepique F, Haaf F, Horatz M, Rink A: Netzplastiken bei Bauchwand-Rezidivhernien-Ergebnisse.

Zentralbl. Chir 122:885-888 (1997)

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

J Immunol Meth 184:39-51 (1994)

Westendorf W: Papyrus Edwin Smith. Ein medizinisches Lehrbuch aus dem alten Ägypten.

Bern Stuttgart: Verlag Hans Huber, 8 (1966)*

Weyhe D, Belyaev O, Muller C, Meurer K, Bauer KH, Papapostolou G, Uhl W: Improving outcomes in hernia repair by the use of light meshes--a comparison of different implant constructions based on a critical appraisal of the literature.

World J Surg.31(1):234-44 (2007)

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
°C	Grad Celsius
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleidacid
EU/ml	Energieumsatz pro Milliliter
FACS	Fluoreszens-aktiviertes-Laser-Durchflusszytometer
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
g/m ²	Gramm pro Quadratmeter
HEPES	4-(2-Hydroxymethyl)-1Piperazineethansulfonsäure
kV	Kilovolt
LAL	Lymulus Amöbozyten Lysat
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
MW	Mittelwert
Nr.	Nummer
NRS	nicht resterilisiert
PBS	Phosphate buffered saline
pg/ml	Pikogramm pro ml
PI	Propidiumiodid
pNA	Para-Nitro-Anilin
PTFE	Polytetraflourethylene
RS	resterilisiert
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
SD	Standardabweichung

Std	Stunde
Tab.	Tabelle
TAPP	Transabdominelle präperitoneale Prothese
TIPP	Transinguinale präperitoneale Prothese
TEP	Total extraperitoneale Prothese
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
U/min	Umdrehung pro Minute
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

8.1. Nähr- und Kulturmedien

8.1.1. Einfriermedium

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

8.1.2. FKS (Fötale Kälberserum)

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

8.1.3. MRC 5 Kulturmedium

450 ml Minimal Essential Medium Eagle (Sigma Aldrich, Deisenhofen), 50 ml FKS (Gibco BRL, Berlin), 5 ml Glutamin (Gibco BRL, Berlin), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL, Berlin), 5 ml Non Essential Amino Acid (Gibco BRL, Berlin)

8.1.4. HeLa Kulturmedium

450 ml DMEM low glucose (PAA Laboratories, Coelbe), 50 ml FKS (Gibco BRL, Berlin), 5 ml Glucose (Gibco BRL, Berlin), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL, Berlin), 3 ml HEPES Buffer Solution (Gibco BRL, Berlin)

8.2. Lösungen

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

8.2.1. Phosphate buffered saline (PBS, Gibco BRL, Berlin)

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

8.2.2. 0,25 % (v/v) Triton-x 100 Lösung

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

8.2.3. Paraformaldehyd-Lösung

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

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

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

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

50 µg PI/ml PBS

8.3. Antikörper und Färbemethoden

Annexin V-FITC

Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen, Heidelberg)

Monoclonal Mouse Anti Human KI-67 Antigen

(Nr. F0788, Dako, Dänemark)

FITC-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins

(Nr. F0313, Dako, Dänemark)

8.4. Geräte

Brutschränke

Fa. Heraeus, Osterode

Durchflusszytometer

FACScan, Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Mikroskop

ZEISS Axioplan, Fa. Carl Zeiss,
Oberkochen

Rasterelektronenmikroskop

SEM 505, Fa. Philips, Eindhoven

Sterile Werkbank

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

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

Zentrifuge

Rotanta/TR Hettich, Fa. Andreas
Hettich, Tuttlingen

Sterilisator

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

9. Einzelwerte der durchflusszytometrischen Untersuchung

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	3,68	5,29	2,64	4,61	3,99	6,17	4,87
	3,93	8,19	3,55	4,25	5,45	7,73	6,55
	3,18	6,10	4,43	1,96	3,52	9,41	7,05
	2,16	6,00	4,95	5,74	1,90	3,66	2,37
	1,70	4,96	3,62	7,38	1,59	3,30	2,07
	1,91	4,18	4,56	3,86	6,65	2,88	2,32
	1,57	5,94	4,42	4,59	3,23	2,49	2,31
	1,63	6,76	3,92	4,48	3,74	2,50	2,41
	1,60	5,37	3,97	3,49	3,12	2,87	3,48
SD	0,95	1,19	0,69	1,49	1,59	2,57	1,96
Datenbereich	1,57- 3,93	3,93- 8,19	2,64- 4,95	1,96- 7,38	1,90- 6,65	2,49- 9,41	2,07- 7,05
Median	1,91	5,94	3,97	4,48	3,52	3,30	2,41

Tabelle 17 Atrium Apoptose MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	1,93	3,68	2,34	7,40	3,50	9,00	2,48
	2,04	3,09	2,70	3,94	4,11	4,54	3,43
	1,53	3,62	2,88	5,09	3,82	6,35	4,12
	1,14	5,57	5,40	5,57	3,39	4,27	3,69
	0,80	5,04	3,80	7,97	3,32	6,07	3,04
	0,99	5,12	3,95	7,86	4,41	7,43	2,51
	1,57	12,82	3,84	6,48	3,25	5,92	2,83
	1,63	5,20	5,54	7,27	3,50	7,21	3,48
	1,60	6,72	5,64	5,93	3,13	7,24	2,43
SD	0,42	2,91	1,26	6,48	3,50	6,35	3,04
Datenbereich	0,80- 2,04	3,09- 12,82	2,34- 5,64	3,94- 7,97	3,13- 4,41	4,27- 9,00	2,43- 4,12
Median	1,57	5,12	3,84	1,37	0,43	1,48	0,60

Tabelle 18 Atrium rest. Apoptose MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	0,92	10,84	7,18	5,97	7,05	6,73	5,47
	1,10	8,37	7,28	2,91	4,98	3,77	8,50
	1,09	7,90	6,08	5,59	6,80	3,47	6,95
	1,04	9,68	7,18	4,80	5,30	6,00	3,26
	1,20	9,22	7,06	6,75	6,24	4,67	3,53
	1,21	11,51	8,18	7,60	4,37	3,68	3,18
	1,32	4,93	8,11	4,85	3,84	4,31	3,25
	1,35	7,57	6,76	4,73	2,93	4,52	2,96
	1,02	9,99	8,27	6,40	3,27	4,74	2,68
SD	0,14	1,98	1,38	1,50	1,50	1,08	2,07
Datenbereich	0,92- 1,35	4,93- 11,51	6,08- 8,27	2,91- 6,75	2,93- 7,05	3,47- 6,73	2,68- 8,50
Median	1,10	9,22	7,18	5,59	4,98	4,52	3,26

Tabelle 19 Optilene Apoptose MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	4,32	6,52	5,86	3,30	2,05	4,37	3,17
	4,19	4,81	3,82	3,23	2,36	2,76	2,09
	4,45	7,88	3,84	3,87	2,67	3,06	1,90
	1,04	4,22	2,62	1,73	1,63	1,83	1,03
	1,03	4,93	2,89	1,74	1,51	6,58	1,25
	0,94	3,45	2,42	2,62	1,36	1,56	0,85
	0,72	2,81	2,36	2,96	1,10	3,28	0,98
	0,95	2,85	2,99	1,97	1,60	3,76	0,62
	1,00	1,88	2,28	2,24	0,66	3,80	0,55
SD	1,69	1,91	1,15	0,76	0,62	1,49	0,85
Datenbereich	0,72- 4,45	1,88- 7,88	2,28- 5,86	1,73- 3,87	0,66- 2,67	1,83- 6,58	0,55- 3,17
Median	1,03	4,22	2,89	2,62	1,60	3,28	1,03

Tabelle 20 Premilene Apoptose MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	99,72	99,02	99,11	97,68	98,75	98,30	99,15
	99,62	99,13	98,97	98,12	98,49	98,04	98,87
	99,08	98,79	98,67	97,94	98,43	98,56	98,93
	98,20	98,97	99,24	99,22	98,73	98,76	99,60
	98,37	98,94	99,06	99,11	99,04	99,14	99,39
	98,27	99,22	99,52	98,91	99,01	99,54	99,59
	99,72	93,31	98,60	92,92	99,62	99,42	99,37
	99,62	92,85	98,98	99,57	99,75	99,38	99,39
	99,08	92,10	99,02	99,56	99,33	99,42	99,21
SD	0,65	3,15	0,28	2,07	0,47	0,55	0,26
Datenbereich	98,20- 99,72	92,10- 99,22	98,60- 99,52	92,92- 99,57	98,43- 99,75	98,04- 99,54	98,93- 99,60
Median	99,08	98,94	99,02	98,91	99,01	99,14	99,37

Tabelle 21 Atrium Proliferation MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	99,62	98,84	99,46	97,05	99,31	99,44	99,36
	99,40	99,00	99,09	98,50	99,06	99,18	99,29
	97,29	98,25	98,85	98,91	98,51	99,45	99,10
	98,98	99,09	99,03	99,24	99,40	99,27	99,35
	99,01	99,14	99,37	99,36	99,47	98,61	99,41
	99,21	99,13	99,03	99,42	99,02	99,15	99,37
	99,16	93,42	99,33	97,66	96,50	97,34	96,94
	98,32	91,35	99,18	98,14	95,89	96,06	96,94
	97,66	95,77	99,29	97,26	95,81	91,84	96,39
SD	0,80	2,93	0,20	0,91	1,57	2,52	1,29
Datenberich	97,29- 99,62	91,35- 99,14	98,85- 99,46	97,05- 99,42	95,81- 99,47	91,84- 99,45	96,39- 99,41
Median	99,01	98,84	99,18	98,5	99,02	99,15	99,29

Tabelle 22 Atrium rest. Proliferation MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	98,86	96,57	97,06	95,82	98,08	98,58	98,45
	98,93	96,62	98,42	96,58	97,51	98,68	98,46
	98,94	97,29	97,65	95,76	97,63	98,44	98,24
	98,38	95,53	96,47	96,52	98,04	94,30	98,90
	98,52	97,01	97,81	96,96	98,01	96,61	98,85
	98,57	95,58	98,14	96,81	97,50	94,32	98,51
	99,47	96,46	98,58	98,48	98,33	98,98	99,22
	99,49	77,94	98,35	98,97	97,99	98,84	99,07
	99,18	97,78	97,66	98,51	98,42	99,12	98,95
SD	0,40	6,26	0,69	1,20	0,33	1,97	0,33
Datenberich	98,38- 99,47	77,94- 97,78	96,47- 98,58	95,76- 98,51	97,50- 98,42	94,30- 99,12	98,24- 99,22
Median	98,93	96,57	97,81	96,81	98,01	98,58	98,85

Tabelle 23 Optilene Proliferation MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	98,18	98,74	98,63	97,51	96,97	98,32	99,95
	97,13	98,03	98,32	96,51	97,43	98,73	99,44
	96,83	97,51	98,80	97,11	97,52	98,54	99,36
	98,17	98,76	98,45	97,51	96,97	98,18	98,56
	97,99	97,25	99,12	96,51	97,43	98,60	98,49
	97,99	96,94	98,80	97,11	97,52	98,51	98,31
	97,70	96,91	98,53	96,87	96,11	97,21	97,64
	97,76	96,77	98,18	96,58	95,93	97,30	97,58
	97,81	97,81	98,13	95,09	95,59	96,73	96,27
SD	0,46	0,76	0,32	0,74	0,76	0,73	1,13
Datenberich	96,83- 98,18	96,77- 98,76	98,13- 99,12	95,09- 97,51	95,59- 97,52	96,73- 98,73	96,27- 99,95
Median	97,81	97,51	98,53	96,87	96,97	98,32	98,49

Tabelle 24 Premilene Proliferation MRC 5

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	0,89	2,99	3,16	3,89	2,31	3,40	1,79
	2,30	5,95	2,10	3,94	1,37	3,46	2,27
	2,20	5,66	3,99	4,15	1,27	2,73	4,47
	2,37	5,90	1,22	2,05	1,49	5,38	1,79
	2,83	6,16	2,52	3,19	2,14	0,67	2,22
	1,80	4,76	2,15	2,12	1,67	2,35	2,81
	2,01	2,74	2,45	3,61	1,96	3,07	2,70
	2,11	3,22	2,21	2,83	2,33	1,94	2,79
	2,29	3,00	2,70	2,36	2,12	2,49	2,31
SD	0,53	1,48	0,77	0,82	0,41	1,28	0,81
Datenbereich	0,89- 2,83	2,99- 6,16	1,22- 3,16	2,05- 4,15	1,27- 2,33	0,67- 5,38	1,79- 4,47
Median	2,20	4,76	2,45	3,19	1,96	2,73	2,31

Tabelle 25 Atrium Apoptose HeLa

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	1,85	6,27	2,26	4,18	1,55	4,97	3,73
	2,68	5,21	1,29	4,85	1,10	3,95	4,60
	1,63	6,86	1,99	6,66	1,48	5,86	4,76
	2,80	2,87	1,70	2,47	2,05	6,23	2,14
	2,65	1,79	1,17	3,34	2,62	3,99	2,38
	2,95	2,76	1,38	2,86	1,61	3,52	2,28
	3,08	2,35	1,93	3,06	2,31	4,10	1,67
	3,26	2,10	1,50	3,52	1,95	4,29	1,71
	3,37	2,93	2,42	3,33	2,24	5,36	1,48
SD	0,60	1,91	0,44	1,28	0,48	0,95	1,28
Datenbereich	1,63- 3,37	1,79- 6,86	1,17- 2,42	2,47- 6,66	1,10- 2,62	3,52- 6,23	1,48- 4,76
Median	2,80	2,87	1,70	3,34	1,95	4,29	2,28

Tabelle 26 Atrium rest. Apoptose HeLa

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	1,94	5,90	4,70	3,52	3,65	3,23	2,64
	1,67	4,97	4,84	3,76	4,11	1,72	3,17
	1,72	5,81	5,32	4,21	3,71	2,12	1,99
	1,80	5,58	1,73	3,83	2,80	3,69	1,74
	1,52	4,21	2,97	3,01	2,11	5,53	2,19
	1,69	4,55	3,55	3,53	2,51	2,46	1,83
	2,25	6,18	3,30	3,65	2,62	2,84	2,32
	2,42	5,77	4,27	3,48	3,01	2,67	1,90
	2,38	4,77	3,15	3,77	3,00	2,49	2,09
SD	0,34	0,69	1,12	0,32	0,65	1,12	0,45
Datenbereich	1,52- 2,42	4,21- 6,18	1,73- 5,32	3,01- 4,21	2,11- 4,11	1,72- 5,53	1,74- 3,17
Median	1,80	5,58	3,55	3,65	3,00	2,67	2,09

Tabelle 27 Optilene Apoptose HeLa

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	1,97	3,29	3,12	1,98	1,51	1,39	1,64
	2,44	4,03	2,66	2,17	1,73	1,20	1,47
	2,25	2,97	2,60	2,58	1,90	2,28	1,17
	2,45	2,65	2,17	3,48	1,85	1,11	1,25
	2,48	9,67	1,81	2,51	1,96	1,27	1,27
	2,52	2,30	1,91	3,64	2,34	1,37	0,91
	1,95	5,30	4,35	4,79	2,19	3,26	1,19
	1,85	6,31	3,71	3,08	2,29	5,85	0,73
	2,14	7,46	3,03	3,53	2,37	1,88	1,01
SD	0,26	2,51	0,84	0,88	0,30	1,54	0,28
Datenbereich	1,85- 2,52	2,30- 7,46	1,81- 4,35	1,98- 4,79	1,51- 2,37	1,11- 5,85	0,73- 1,64
Median	2,25	4,03	2,66	3,08	1,96	1,39	1,19

Tabelle 28 Premilene Apoptose HeLa

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	93,54	99,00	99,04	99,30	99,54	97,68	91,87
	93,48	98,53	99,49	99,50	99,21	90,70	99,01
	96,54	99,46	99,33	99,38	99,04	97,72	98,80
	95,73	98,97	99,24	99,22	98,73	98,76	99,60
	94,24	98,94	99,06	99,11	99,04	99,14	99,39
	93,12	99,22	98,56	98,91	99,01	99,54	99,59
	93,24	95,72	96,01	97,13	97,14	97,96	98,44
	90,80	95,94	96,47	97,43	96,70	98,09	98,29
	93,31	96,11	96,19	97,70	97,39	98,29	98,60
SD	1,64	1,57	1,48	0,93	1,05	2,64	2,41
Datenbereich	90,80- 96,54	95,72- 99,00	96,01- 99,49	97,13- 99,50	97,14- 99,54	90,70- 99,54	91,87- 99,59
Median	93,48	98,94	99,04	99,11	99,01	98,09	98,8

Tabelle 29 Atrium Proliferation HeLa

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	97,14	98,33	98,43	98,39	98,90	98,84	99,14
	96,94	96,46	98,14	98,90	98,73	99,08	99,46
	97,31	97,78	98,33	98,73	98,99	98,45	99,25
	96,38	97,89	97,75	99,06	99,12	98,91	99,13
	96,35	97,65	98,07	98,68	98,93	98,63	97,95
	96,38	97,67	97,98	98,15	98,26	99,19	98,78
	93,54	98,34	98,00	97,43	98,02	98,70	98,71
	93,31	98,23	98,29	97,08	97,32	98,38	98,77
	90,80	97,94	98,62	97,32	98,09	98,45	98,60
SD	2,26	0,57	0,26	0,74	0,60	0,29	0,45
Datenbereich	90,80- 97,31	96,46- 98,34	97,75- 98,62	97,08- 99,06	97,32- 99,12	98,38- 99,19	97,95- 99,46
Median	96,38	97,89	98,14	98,39	98,73	98,7	98,78

Tabelle 30 Atrium rest. Proliferation HeLa

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	99,41	96,83	96,57	97,60	95,62	98,84	98,59
	99,44	96,86	96,66	98,14	96,15	99,02	98,75
	99,36	96,81	95,61	98,69	96,06	98,39	98,77
	99,13	96,52	96,91	95,76	96,51	98,22	96,78
	97,95	95,96	97,82	97,27	97,73	97,19	96,61
	98,78	97,09	97,94	97,25	97,31	97,93	97,71
	98,83	98,51	97,36	95,90	96,72	99,07	99,10
	99,34	98,07	98,13	93,24	97,30	98,34	97,86
	99,44	98,18	97,83	96,52	96,21	98,77	98,10
SD	0,49	0,86	0,83	1,62	0,70	0,60	0,88
Datenberich	97,95- 99,44	95,96- 98,51	95,61- 98,13	93,24- 98,69	95,62- 97,73	97,19- 99,07	96,61- 99,10
Median	99,34	96,86	97,36	97,25	96,51	98,39	98,1

Tabelle 31 Optilene Proliferation HeLa

	0 Messung	24h	neg	48h	neg	72h	neg
	94,10	98,60	96,41	98,81	98,11	98,52	99,61
	91,68	98,00	97,61	97,90	98,16	98,40	99,29
	91,87	98,37	97,95	98,51	98,37	99,68	99,68
	96,82	97,81	97,29	98,49	97,95	99,16	99,48
	93,37	97,82	97,95	98,37	98,71	99,81	99,38
	93,36	98,29	98,48	98,42	99,11	99,66	99,41
	99,47	97,28	97,00	97,86	97,26	99,06	99,03
	99,77	98,21	97,11	98,41	97,10	99,23	99,27
	99,71	97,46	96,21	98,18	97,21	99,40	99,05
SD	3,40	0,43	0,74	0,30	0,70	0,50	0,22
Datenberich	91,68- 99,77	97,28- 98,60	96,21- 98,48	97,86- 98,81	97,10- 99,11	98,40- 99,68	99,03- 99,68
Median	94,10	98,00	97,29	98,41	98,11	99,23	99,38

Tabelle 32 Premilene Proliferation HeLa

10. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. habil. Michael Duchrow (†), der leider viel zu früh gehen musste und dem ich die Überlassung des Themas, sowie die unermüdliche Unterstützung bei dessen Umsetzung verdanke. PD Dr. med. habil. S. Farke danke ich für die sehr gute Betreuung und stets hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie der Materialien im chirurgischen Forschungslabor danke ich besonders Herrn Prof. Dr. H.-P. Bruch, Direktor der Chirurgischen Klinik der Universität zu Lübeck. Herrn Prof. Dr. J. Westermann, Direktor des Anatomischen Institutes der Universität zu Lübeck sowie PD Dr. Thilo Wedel danke ich für die Bereitstellung und Hilfe bei der Nutzung des Rasterelektronenmikroskops im Anatomischen Institut der Universität Lübeck. Claudia Kilaitis danke ich für die freundliche Hilfestellung bei der statistischen Aufarbeitung der durchflusszytometrischen Messergebnisse.

Regina Kaatz, Vera Grobleben, Gisela Grosser-Pape, Elke Gheribi und Annemarie Aumüller danke ich für die sehr gute Betreuung während des experimentellen Abschnittes und das stets nette Arbeitsklima, welches mir die oft langen Tage im Chirurgischen Forschungslabor versüßt hat.

Meiner Familie danke ich für ihre Geduld, mit der sie mir die Fertigstellung der Promotionsschrift möglich machte. Meinen Eltern und Großeltern danke ich dafür, dass sie mir immer wieder den nötigen Antrieb dafür gaben, die Fertigstellung diese Arbeit voranzutreiben. Besonderer Dank gilt meinem Vater Dr. med dipl. Umw.-Wiss. Manfred Friedrich M.Sc. sowie meiner Ehefrau Stephanie, die sich als gewissenhafte Lektoren zur Verfügung stellten.

11. Lebenslauf

Persönliches

Name: Friedrich
Vorname: Matthias
Geburtsdatum: 12.08.1973
Geburtsort: Schwerin/Meckl
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familie: Ehefrau: Stephanie Friedrich geb.Heinrich
Kinder: Wendelin Maximilian Friedrich
Julius Valentin Friedrich
Wohnort: Mönkhofer Weg 145
23562 Lübeck

Schule/Praktika/ Ausbildung/Studium

seit 06/2007 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie und Notfallmedizin am Klinikum Neustadt/Holstein unter der Leitung von Dr. Klaus Dalke
06/2006 bis 05/2007 Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des DRK Krankenhauses in Ratzeburg unter der Leitung von Dr. Roland Preuss
seit 05/2006 Fertigstellung der Promotionsschrift
04/2006 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Erlangung der vollen ärztlichen Approbation
04/2005 bis 03/2006 Praktisches Jahr
Anästhesie: Universität Lübeck
Chirurgie: Sana Kliniken Lübeck GmbH
Innere: Sana Kliniken Lübeck GmbH
03/2005 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12/2003	Beginn der Dissertations-Arbeit im Chirurgischen Forschungslabor unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Broll
03/2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2002	Ärztliche Vorprüfung
10/1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin am Universitätsklinikum Lübeck
10/1996 bis 09/1999	Ausbildung zum Krankenpfleger am Diakonissenkrankenhaus Stift Bethlehem Ludwigslust Abschluss: staatlich examinierter Krankenpfleger
12/1995 bis 07/1996	Trockenbaumonteur bei der Firma Baumontagen Hirt GbR
10/1993 bis 12/1995	Studium an der TU Dresden im Studiengang Wasserwirtschaft
01/1993 bis 05/1993	Praktikum am Staatlichen Amt für Umwelt und Natur Schwerin
09/1992 bis 12/1993	Krankenträger im Zentral-OP des Klinikums Schwerin
09/1990 bis 07/1992	Goethe-Gymnasium Schwerin Abschluss: Allgemeine Hochschulreife