

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

---

**Der Einfluss von alloplastischen Herniennetzen auf  
das Proliferations- und Apoptoseverhalten von humanen  
Zellkulturen  
- Eine in vitro-Untersuchung -**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Sektion Medizin -**

vorgelegt von

**Sven Meder**

aus Hannover

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Stefan Farke**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Josef Hoch**

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 04. 2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16. 04. 2013

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation veröffentlicht:

Friedrich M, **Meder S**, Wedel T, Fischer F, Roblick U, Habermann J, Bruch HP, Farke S:  
Effects of Resterilization on the Surface-Structure of Lightweight Polypropylen Hernia  
Meshes – An *in vitro* Study. Res J Med Sci 4, 330-333 (2010)

# Inhalt

<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hernienchirurgie .....	1
1.1.1 Hernien .....	1
1.1.2 Die Entstehung der Hernienchirurgie .....	1
1.1.3 Ausgewählte Methoden zur operativen Versorgung mit Netzverstärkung ....	2
1.1.3.1 Offene Herniotomie nach Lichtenstein.....	2
1.1.3.2 Laparoskopische total extraperitoneale Patchplastik (TEPP).....	2
1.1.3.3 Laparoskopische transabdominale präperitoneale Patchplastik (TAPP).2	
1.1.3.4 Intraperitoneale Onlay-Mesh-Technik (IPOM).....	3
1.2 Herniennetze .....	3
1.2.1 Biofunktionalität und Biokompatibilität.....	3
1.2.2 Problematiken der modernen Hernienchirurgie .....	4
1.2.3 Fremdkörperreaktion und Biokompatibilität.....	5
1.3 Proliferation und Apoptose als Faktoren der zellulären Vitalität.....	5
1.3.1 Der monoklonale Antikörper Ki-67 - Ein Marker der Zellproliferation .....	5
1.3.2 Bestimmung der Apoptoserate durch Annexin V.....	6
1.4 Aufgabenstellung.....	7
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Zellen .....	9
2.1.1 Verwendete Zellen.....	9
2.1.2 Kultivierung der Zellen .....	9
2.1.2.1 Kulturmedium.....	9
2.1.2.2 Mediumwechsel.....	10
2.1.2.3 Passagieren der Zellen.....	10
2.1.2.4 Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung.....	10
2.1.2.5 Kryokonservierung der Zellen.....	11
2.2 Endotoxintest .....	11

2.3 Herniennetze.....	12
2.3.1 Verwendete Herniennetze.....	12
2.3.1.1 TiMESH extralight® .....	12
2.3.1.2 ULTRAPRO® .....	12
2.3.1.3 VICRYL® .....	13
2.3.1.4 VYPRO® II .....	13
2.3.2 Vorbereitung der Netze .....	14
2.4 Zellbiologische Methoden .....	14
2.4.1 Versuchsaufbau .....	14
2.4.2 Annexin V-Färbung.....	15
2.3.4 Ki-67-Färbung .....	15
2.4.4 Durchflusszytometrie.....	16
2.5 Rasterelektronenmikroskopie .....	16
2.5.1 Versuchsaufbau .....	16
2.5.2 Aufbereitung der Netze .....	17
2.5.3 Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie .....	17
2.6 Herstellung der Lyophilisate .....	17
2.7 Massenspektrometrie .....	18
2.8 Statistik .....	18
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>19</b>
3.1 Vitalitätsprüfung und Endotoxintest.....	19
3.1.1 Vitalitätsprüfung.....	19
3.1.2 Endotoxin-Test .....	19
3.2 Durchflusszytometrie.....	19
3.2.1 Apoptoserate HeLa-Zellen .....	20
3.2.1.1 TiMESH extralight® .....	20
3.2.1.2 ULTRAPRO® .....	21
3.2.1.3 VICRYL® .....	22

3.2.1.4 VYPRO® II .....	23
3.2.1.5 Zusammenfassung der Apoptose bei HeLa-Zellen .....	24
3.2.2 Proliferationsindex HeLa-Zellen .....	25
3.2.2.1 TiMESH extralight® .....	25
3.2.2.2 ULTRAPRO® .....	26
3.2.2.3 VICRYL® .....	27
3.2.2.4 VYPRO® II .....	28
3.2.2.5 Zusammenfassung: Proliferation HeLa-Zellen .....	29
3.2.3 Apoptoserate MRC-5-Zellen .....	30
3.2.3.1 TiMESH extralight® .....	30
3.2.3.2 ULTRAPRO® .....	31
3.2.3.3 VICRYL® .....	32
3.2.3.4 VYPRO® II .....	33
3.2.3.5 Zusammenfassung: Apoptoserate MRC-5-Zellen .....	34
3.2.4 Proliferationsindex MRC-5-Zellen .....	35
3.2.4.1 TiMESH extralight® .....	35
3.2.4.2 ULTRAPRO® .....	36
3.2.4.3 VICRYL® .....	37
3.2.4.4 VYPRO® II .....	38
3.2.4.5 Zusammenfassung: Proliferationsindex MRC-5-Zellen .....	39
3.3 Rasterelektronenmikroskopie .....	40
3.3.1 TiMESH extralight® nativ .....	40
3.3.2 TiMESH extralight® nach Inkubation mit MRC-5-Zellen .....	41
3.3.3 ULTRAPRO® nativ .....	42
3.3.4 ULTRAPRO® nach Inkubation mit MRC-5-Zellen .....	43
3.5 Massenspektrometrische Analyse der Lyophilisate .....	44
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1 Das in vitro-Modell .....	49

4.2 Einfluss der Netze auf die MRC-5-Zellen .....	52
4.2.1 MRC-5: Proliferation.....	52
4.2.2 MRC-5: Apoptose.....	53
4.3 Einfluss der Netze auf die HeLa-Zellen .....	55
4.3.1 HeLa: Proliferation .....	55
4.3.2 HeLa: Apoptose.....	55
4.4 Rasterelektronenmikroskopie der Netze.....	57
4.5 Massenspektrometrie .....	58
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>7 Abkürzungen.....</b>	<b>68</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>70</b>
8.1 Einfriermedium.....	70
8.2 Lösungen .....	70
8.3 Antikörper und Färbemethoden.....	71
8.4 Geräte.....	71
8.5 Tabellen aller Einzelmesswerte der Durchflusszytometrie .....	73
8.5.1 HeLa: TiMESH extralight <sup>®</sup> .....	73
8.5.2 HeLa: ULTRAPRO <sup>®</sup> .....	74
8.5.3 HeLa: VICRYL <sup>®</sup> .....	75
8.5.4 HeLa: VYPRO <sup>®</sup> II .....	76
8.5.5 MRC-5: TiMESH extralight <sup>®</sup> .....	77
8.5.6 MRC-5: ULTRAPRO <sup>®</sup> .....	78
8.5.7 MRC-5: VICRYL <sup>®</sup> .....	79
8.5.8 MRC-5: VYPRO <sup>®</sup> II .....	80
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>81</b>
<b>10 Lebenslauf .....</b>	<b>82</b>

# Einleitung

## 1.1 Hernienchirurgie

### *1.1.1 Hernien*

Hernien (oder zu deutsch „Brüche der Bauchwand“), zählen zu den häufigsten Erkrankungen, die heutzutage einer operativen Therapie bedürfen. Per Definition ist eine Hernie eine Lücke in der Bauchwand, durch die sich das Bauchfell ausstülpt. Die zugrundeliegende Lücke kann angeboren oder erworben sein. Äußerlich sichtbare Vorwölbungen bezeichnet man als äußere Hernien, im Unterschiede zu den inneren Hernien (Schumpelick, 1996).

Die häufigsten Lokalisationen von Hernien sind in der Leiste und am Nabel, wo sie in Bereichen natürlicher Schwachstellen auftreten. Leistenhernien sind bei Männern anatomisch bedingt deutlich häufiger als bei Frauen. Je nach Eintrittsstelle des Bruchsackes in den Leistenkanal in Beziehung zu den epigastrischen Gefäßen unterscheidet man zwischen lateralen und medialen Leistenhernien.

### *1.1.2 Die Entstehung der Hernienchirurgie*

Die Hernienchirurgie wird bereits seit dem Mittelalter durchgeführt, ohne dass zu dieser Zeit jedoch eine systematische, erfolgversprechende Versorgung gegeben war. Erst Eduardo Bassini gelang es mit der Entwicklung seiner OP-Technik eine Versorgung mit gutem Erfolg und geringen Risiken zu erzielen. Der Operation nach Bassini liegt als grundsätzliche Idee die Resektion des Bruchsackes und die stabile Rekonstruktion der Leistenkanalhinterwand durch Nähte zugrunde (Bassini, 1890). Verschiedene Autoren beschrieben in den folgenden Jahrzehnten eine Modifikationen der Technik (Lotheissen, McVay, Kirschner). Die Einführung der Methode nach Shouldice mit modifizierter Nahttechnik in mehreren Schichten konnte die Ergebnisse weiter verbessern (Schumpelick, 1996). Allen offenen Nahtverfahren immanent ist ein recht hohes Rezidivrisiko (Schott et al., 2002).

Erst durch die Entwicklung und den Einsatz von alloplastischen Materialien zur Verstärkung der rekonstruierten Leistenkanalhinterwand wurde eine substantielle Senkung der Rezidivraten möglich (Simons et al., 2009). Insbesondere für die modernen minimal-invasiven Operationstechniken war dieser Schritt eine notwendige Grundlage.

### 1.1.3 Ausgewählte Methoden zur operativen Versorgung mit Netzverstärkung

#### 1.1.3.1 Offene Herniotomie nach Lichtenstein

Bei der weit verbreiteten Operation nach Lichtenstein wird die Leistenkanalhinterwand über einen offenen Zugang mit einem Netz verstärkt. Das Netz wird dabei zwischen Externusaponeurose und Interusmuskulatur platziert. Das lateral geschlitzte Netz wird dann fortlaufend am Leistenband fixiert. Kranial wird es mit Einzelknopfnähten auf der Aponeurose des *M. obliquus internus* befestigt. Durch die Vereinigung der beiden lateralen Netzschenkel um den Samenstrang wird ein neuer innerer Leistenring geschaffen. Bei diesem Verfahren werden häufig teilresorbierbare Netze (z.B. ULTRAPRO<sup>®</sup> oder VYPRO<sup>®</sup> II) verwendet.

#### 1.1.3.2 Laparoskopische total extraperitoneale Patchplastik (TEPP)

Bei der TEPP erfolgt die minimal invasive Operation im präperitonealem Raum ohne die Eröffnung der Bauchhöhle. Mit einem Ballondissektor wird erst der benötigte Platz zwischen hinterem Blatt der Rektusscheide und Bauchfell geschaffen, der Bruchsack dann vom Samenstrang abpräpariert und nach dorsal verlagert. Als Rekonstruktion wird ein alloplastisches Netz eingelegt und so platziert, dass die potentiellen Bruchpforten zu allen Seiten ausreichend überdeckt sind.

#### 1.1.3.3 Laparoskopische transabdominale präperitoneale Patchplastik (TAPP)

Bei der TAPP wird die Leistenhernie minimal-invasiv transabdominell versorgt. Die Operation erfolgt wie bei der TEPP über einen Optiktrokar am Nabel und zwei Arbeitstrokare rechts und links lateral im Mittelbauch. Nach Inzision des Peritoneums über der Leistenregion wird der Raum zur Aufnahme des Netzes freipräpariert. Dabei wird der Bruchsack vom Samenstrang abgelöst. Nach dem Schaffen eines ausreichend großen Raumes wird ein Netz in ausreichender Größe zur Überdeckung der potentiellen Bruchpforten eingelegt. In der Anfangszeit wurden diese Netze mit Metallspiralen fixiert. Heute findet meist ein Fibrinkleber Anwendung oder auf eine Fixierung wird analog zur TEPP ganz verzichtet. Zum Abschluss des Eingriffs wird die peritoneale Inzision mittels Naht verschlossen.

#### 1.1.3.4 Intraperitoneale Onlay-Mesh-Technik (IPOM)

Bei dieser Technik werden Brüche der ventralen Bauchwand minimal invasiv durch Überdecken der Bruchlücke mit einem speziell modifizierten Netz versorgt. Die Technik eignet sich vor allem für Narben-, Nabel- oder auch epigastrische Hernien.

Neben einem meist weit lateral platzierten Optiktrokar, erfordert die Technik zwei bis drei Arbeitstrokare. Nach dem Lösen von Verwachsungen und dem Freilegen der Hernie sowie der Faszienränder wird ein ausreichend großes Netz zur breiten Überdeckung der Bruchlücke mit spezieller Beschichtung (z.B. PHYSIOMESH<sup>TM</sup> oder DynaMesh<sup>®</sup>) platziert. Das Netz wird meist mit transmuralen Fäden und resorbierbaren Klammern fixiert.

## 1.2 Herniennetze

### 1.2.1 Biofunktionalität und Biokompatibilität

Alloplastische Materialien sind in der modernen Medizin inzwischen unverzichtbar geworden. Dadurch sind die Begriffe Biofunktionalität und Biokompatibilität von großer Bedeutung. In seinen Arbeiten hat sich Pizzoferrato als einer der ersten mit deren Definition beschäftigt. Durch diese Begriffe können Eigenschaften von alloplastischen Materialien für den medizinischen Gebrauch klassifiziert werden. *Biofunktionalität* beschreibt die Funktion und die Lebensdauer eines Implantates. Neben einer möglichst hohen Biofunktionalität ist auch die *Biokompatibilität* eines Implantates relevant. Sie beschreibt die Wechselwirkung zwischen dem Material und Strukturen sowie Geweben, mit denen es in Kontakt steht (Pizzoferrato et al., 1985). Aus diesen Überlegungen heraus sollten implantierbare, alloplastische Materialien beide Eigenschaften im Idealfall höchstmöglich erfüllen.

Theoretisch würde sich ein ideales Implantat wie folgt darstellen:

- chemisch inert
- nicht allergen
- nicht kanzerogen
- geringer Einfluss des Gewebes auf das Implantat
- lange Haltbarkeit
- der zu ersetzenden Struktur funktionell mindestens gleichwertig.

Durch die Testung von implantierbaren Biomaterialien im Hinblick auf ihre Biofunktionalität und Biokompatibilität in Zellkultur- oder Tierversuchen kann die

Eignung zur permanenten Implantation beim Menschen untersucht werden. (Jenkins et al., 1983; Schumpelick, 1999; Deligiannidis et al., 2002).

Zellbiologische Untersuchungen stellen heutzutage eine zu bevorzugende Alternative zum Tierversuch dar. Allerdings sind die Ergebnisse aus zellulären *in vitro*-Versuchen nur bedingt auf die tatsächliche Situation im menschlichen Körper zu übertragen. Viele der komplexen *in vivo*-Abläufe an einem Implantat fehlen in der Zellkultur, ebenso wie die mechanische Beanspruchung. Daher bedürfen Ergebnisse aus *in vitro*-Versuchen zur endgültigen Beurteilung eines Implantates unbedingt der Ergänzung durch *in vivo*-Untersuchungen. Durch *in vitro*-Untersuchungen ist auf Grund der hohen Sensitivität für toxische Stoffe eine sehr geringe Menge solcher Noxen nachweisbar. Heute haben sich Zellkulturversuche für Aussagen über die Zytotoxizität von Biomaterialien etabliert (Pizzoferrato et al., 1985).

### *1.2.2 Problematiken der modernen Hernienchirurgie*

Heute ist die moderne Hernienchirurgie ohne alloplastische Materialien undenkbar, denn die überwiegend eingesetzten Verfahren (Lichtenstein-Operation, TEPP, TAPP) sind nur mit alloplastischen Netzen durchführbar. Nachdem Usher 1959 die Netze für die operative Versorgung von Hernien eingeführt hatte (Usher 1959, 1961, 1962), sind alloplastische Materialien aus der Hernienchirurgie nicht mehr wegzudenken.

Durch den Einsatz von Netzen konnten die anfänglichen Rezidivraten von 50% (Langer et al., 1985; Langer et al., 2003) auf unter 10% gesenkt werden (Amid et al., 1992; Lichtenstein et al., 1993). Demgegenüber steht jedoch auch eine Zunahme von bei den klassischen Verfahren bisher unbekanntem Früh- und Spät komplikationen. Während geringe lokale Beschwerden im Sinne von postoperativen Seromen oder Dysästhesien meist akzeptabel sind, haben einige, seit der Mitte der 1990er-Jahre beobachtete, schwere Komplikationen nach Implantation von schwergewichtigen Polypropylen-Netze, für die offensichtlich mangelnde Biokompatibilität sensibilisiert (Sanchez-Bustos et al., 1998; Silich et al., 1996; Avtan et al., 1997; Barth et al., 1998). Dies ist insbesondere bedeutsam, da zunehmend auch bei jüngeren Patienten unter 40 Jahren die Indikation zur Netzimplantation gestellt wird (Luijendijk et al., 2000) und die implantierten Netze somit mehrere Jahrzehnte im Körper verbleiben.

Ein Zusammenhang zwischen Biomaterialien und Tumorentstehung konnte bisher nicht belegt werden. Trotzdem wird immer wieder kontrovers über das Tumorinduktionspotential von alloplastischen Materialien diskutiert, insbesondere nachdem Weichteilsarkome nach tierexperimenteller Implantation von Herniennetzen

beschrieben wurden (Herrmanns et al., 2004; Adams et al., 2003). Dies spricht für eine prinzipiell karzinogene Potenz von alloplastischen Materialien.

### *1.2.3 Fremdkörperreaktion und Biokompatibilität*

Die zurzeit in der Chirurgie eingesetzten Biomaterialien gelten als chemisch und physikalisch inert und nicht toxisch. Biologisch gesehen sind viele dieser Materialien jedoch nicht inert (Bittner et al., 2011). Im Kontext der Implantation lassen sich auch schwerwiegendere Komplikationen finden, da die Materialien z.B. Infektionen und Fibrosierungen im Gewebe induzieren. Dies deutet insgesamt auf Defizite in der Biokompatibilität hin.

Eine entscheidende Rolle in der Biokompatibilität spielt die Fremdkörperreaktion als chronische Entzündung, charakterisiert durch eine schnelle Akkumulation von phagozytierenden Abwehrzellen, wie z.B. Makrophagen und Monozyten (Klosterhalfen et al., 1998; Junge et al., 2002). Die Auslösung dieser Entzündungsreaktion durch physikalisch und chemisch inerte Biomaterialien ist bis heute nicht vollständig geklärt. Die Proteinadsorption stellt jedoch eine akzeptierte These dar. Hierbei wird das Biomaterial mit einer Proteinmembran versehen, um den Fremdkörper so vom Implantationsgewebe zu isolieren. Die Proteinschicht wird von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberfläche des Fremdkörpers bestimmt. Dadurch ist die von einem Biomaterial hervorgerufene Fremdkörperreaktion materialspezifisch (Junge et al., 2002).

Durch die Interaktion von Phagozyten mit der Proteinschicht wird die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Einwanderung von Granulozyten, T-Zellen, Plasmazellen und Fibrozyten ausgelöst (Bhardwaj et al., 1997). Dies führt zu einer Bildung von Frühgranulomen mit den typischen Fremdkörperriesenzellen in der äußeren Fibroseschicht. Dagegen sind die noch lange nach der Implantation nachweisbaren Spätgranulome Ausdruck chronischer Wunden mit erhöhtem Zellumsatz. Monozyten und Makrophagen an der Oberfläche des Biomaterials treten in die Apoptose ein und werden dann durch periphere Zellen ersetzt (Anderson et al., 1984; Bernatchez et al., 1996).

## **1.3 Proliferation und Apoptose als Faktoren der zellulären Vitalität**

### *1.3.1 Der monoklonale Antikörper Ki-67 - Ein Marker der Zellproliferation*

Ki-67 ist ein monoklonaler Antikörper und dient zur Bestimmung der Proliferationsrate einer Zellkultur. Der Antikörper bindet an das in der G1-, S-, G2- und in der M-Phase exprimierte humane Antigen pKi-67. Zellen in der G0-Phase exprimieren das Ki-67 Antigen nicht (Gerdes et al., 1984).

Die Färbung mit Ki-67 ist einer der am häufigsten benutzten Marker zur Ermittlung der Proliferationsrate von Zellen aus Zellkulturen, in soliden Tumoren oder in Geweben und stellt eine Standardmethode dar. Dabei wird die Proliferationsrate der Zellen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ki-67 mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Grundsätzlich ist eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen Voraussetzung für die durchflusszytometrische Proliferationsbestimmung, denn nur so kann der monoklonale Ki-67 Antikörper in die Zellkerne gelangen (Schwartz et al., 1985). Es existieren verschiedene Methoden zur Fixierung der jeweiligen Zellen. Die in dieser Arbeit verwendete Methode mit Triton<sup>®</sup> X-100-Lösung und Paraformaldehyd hat sich aufgrund guter Ergebnisse etabliert (Endl et al., 2001).

### *1.3.2 Bestimmung der Apoptoserate durch Annexin V*

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod und durch spezifische Merkmale charakterisiert:

- Schrumpfung des Zytoplasmas
- die Aggregation des Chromatins an der Kernmembran
- die Fragmentierung der DNS

Dazu gehört auch eine spezielle Veränderung der Zellmembran, welche aus einer Lipiddoppelschicht mit asymmetrisch verteilten Phospholipiden besteht. Als Teil dieser negativ geladene Phospholipide kommen Phosphatidylserine bei einer gesunden Zelle—im Gegensatz zu anderen Phospholipiden wie z.B. Phosphatidylcholin—nur auf der Innenseite der Zellmembran vor. Die Apoptose führt unabhängig vom Zelltyp zu einer Translokation des Phosphatidylserins von der zytoplasmatischen Seite auf die Außenseite der Doppelmembran. Dieser Vorgang spielt sich in der Frühphase der Apoptose ab, in der die Zellmembran noch intakt ist (Darzynkiewicz et al., 1997; van Engeland et al., 1998)

Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, an negativ geladene Phospholipide bindendes Protein mit einer sehr hohen Affinität für Phosphatidylserin. Daher ist Annexin V ein Marker für die Frühphase der Apoptose. Durch die Kombination mit fluorochromen Farbstoffen, wie z.B. Propidiumjodid, können so nekrotische von apoptotischen Zellen unterschieden werden, da Propidiumjodid nur durch defekte Zellmembranen in die Zelle gelangt, um dort die DNA zu färben. Zellen in der frühen Phase der Apoptose besitzen eine intakte Membran und sind somit Annexin V positiv, aber Propidiumjodid negativ angefärbt (Vermees et al., 1995).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Apoptoserate einer Zellkultur bestimmt werden. Mit Fluorescein (FITC)-konjugiertem Annexin V lassen sich so in einer Suspension diejenigen Zellen bestimmen, die sich in der Frühphase der Apoptose befinden.

#### **1.4 Aufgabenstellung**

Durch *in vitro*-Untersuchungen an Zellkulturen kann unter standardisierten Bedingungen die Gewebeverträglichkeit von Biomaterialien in einem experimentellen Ansatz getestet werden. Zellreaktionen, Toxizitäten und die Wechselwirkungen mit Fremdmaterialien können auf diese Weise untersucht werden. (Pizzoferrato et al., 1985).

Durch die Zunahme der verfügbaren Herniennetze gibt es aktuell unzählige Varianten von modernen Herniennetzen, die sich teilweise durch eine Reduktion des Gewichtes und die Vergrößerung der Poren auszeichnen. Auch titanbeschichte Netze zur Verbesserung der Biokompatibilität werden angeboten. Ein weiteres Kriterium der Netze ist der verschieden große Anteil an unterschiedlichen Copolymeren.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von Herniennetzen auf die Apoptoserate und den Proliferationsindex von verschiedenen Zellen *in vitro* untersucht. Vorangegangene Untersuchungen mit schwergewichtigen Herniennetzen aus Polypropylen zeigten nach Inkubation mit MRC-5-Zellen einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate (Broll et al., 2002; Bethge, 2004).

Im hier gewählten Ansatz sollen nun verschiedene Netze aus unterschiedlichen Materialien untersucht und verglichen werden. Dies erforderte die Modifikation eines bereits erprobten *in vitro*-Modells. Durch den Versuchsaufbau ist es möglich, gezielt unterschiedliche Materialien in Bezug auf ihren Einfluss auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten zweier Zelllinien zu untersuchen. Folgende in Deutschland gängige und auf dem Markt befindliche Netze wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

- ULTRAPRO<sup>®</sup> (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- TiMESH extralight<sup>®</sup> (GfE, Nürnberg, Deutschland)
- VYPRO<sup>®</sup> II (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- VICRYL<sup>®</sup> (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)

Für die Versuche wurden zwei verschiedene Zellreihen ausgewählt:

- *Fibroblasten*: Fibroblasten haben *in vivo* durch ihre Migration einen wesentlichen Einfluss auf die postoperative Stabilität der Netze. Daher wurde für die Versuche die humane, fetale Zelllinien MRC-5 verwendet. Ihre Morphologie wird als *fibroblast like* bezeichnet (d.h. dieser Zelllinie werden

ähnliche Eigenschaften wie die von Fibroblasten zugeschrieben) und sie eignet sich auch für *in vitro*-Tests von Zytotoxizitäten.

- *HeLa-Zellen*: HeLa-Zellen sind Zellen eines humanen Zervixkarzinoms und stellen die erste aus menschlichen Zellen gewonnene permanente Zelllinie dar. Der Name der Zelllinie setzt sich aus den jeweils ersten Buchstaben des Vor- und Nachnamens der Patientin zusammen.
- Um eventuelle Einflüsse der Netze auf das Wachstums- und Apoptoseverhalten von transformierten Zellen zu untersuchen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch maligne HeLa-Zellen verwendet.

Neben den Auswirkungen der unterschiedlichen Netze auf die Zellen wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie auch untersucht, ob Einflüsse der Zellen auf die Netze durch Oberflächenveränderungen nachweisbar sind. Dazu wurden exemplarisch zwei Netze in sterilem Zustand sowie nach 72-stündiger Inkubation mit MRC-5-Zellen durch Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen analysiert und verglichen.

Durch Massenspektrometrie wurde in dieser Arbeit untersucht, ob zytotoxische Substanzen im Überstand der Zellkulturen nachweisbar sind. Bethge (2004) konnte zeigen, dass in den Lyophilisaten von resterilisierten schwergewichtigen Polypropylennetzen polymere Moleküle nachweisbar waren, die nach Inkubation mit Fibroblasten eine erhöhte Apoptoserate hervorriefen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellen**

#### *2.1.1 Verwendete Zellen*

Für die in-vitro Versuche und Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Zellarten verwendet. Dabei handelte es sich um MRC-5-Zellen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sowie HeLa S3-Zellen (DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland).

MRC-5 entstammen einer humanen, fetalen Zelllinie, mit welcher 1966 das erste Mal am Medical Research Council in Großbritannien gearbeitet wurde. Ursprung war hier das Lungengewebe eines 14 Wochen alten männlichen Fötus einer 27-jährigen, psychisch kranken Frau. Das Ungeborene wurde damals aufgrund der psychischen Erkrankung der Mutter abgetrieben.

Bei den so genannten HeLa-Zellen handelt es sich um menschliche Epithelzellen eines Cervix-Karzinoms einer 31-jährigen afroamerikanischen Frau. 1951 wurden diese erstmals am Josh Hopkins Hospital (Baltimore, USA) kultiviert und vermehrt. Seitdem wurden sie vielfach zu unterschiedlichsten Forschungszwecken eingesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HeLa-S3-Zellen sind adhärend wachsende Subklone der ursprünglichen HeLa-Zelllinie aus dem Jahre 1955.

#### *2.1.2 Kultivierung der Zellen*

##### **2.1.2.1 Kulturmedium**

Als Basismedium für die Kultivierung der MRC-5-Zellen wurde Minimal Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Zur Verhinderung eines möglichen Bakterienwachstums wurde Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt. Außerdem wurde das Medium durch inaktiviertes, fetales Kälberserum (FKS), L-Glutamin sowie non-essential amino acid ergänzt (alle Gibco BRL, Berlin, Deutschland). Das Kulturmedium für die HeLa-Zellen bestand aus DMEM low glucose (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland). Das Medium wurde durch inaktivierte FKS, Glukose und HEPES (2-(4-(2 Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure) (alle Gibco BRL, Berlin, Deutschland) ergänzt. Um ein Wachstum von Bakterien zu verhindern wurde ebenfalls Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt.

### 2.1.2.2 Mediumwechsel

Um eine konstante Zellvermehrung zu gewährleisten und den vitalen Zustand der MRC-5- sowie HeLa-Zellen zu erhalten, war ein regelmäßiger Mediumwechsel in 48 h-Intervallen notwendig. Einige Bestandteile des Mediums sowie deren Zusätze zerfielen bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C im Laufe der Zeit oder wurden von den Zellen im Wachstumszyklus metabolisiert bzw. verbraucht. Da beide Zelllinien ein adhärentes Wachstum am Boden der Zellkulturflaschen aufwiesen, konnte das verbrauchte Nährmedium mit Hilfe einer Pipette (Research® Pipette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) entnommen werden. Die Zellen wurden dann mit kalter Phosphate Buffered Saline-Lösung (Dulbeccos PBS, Gibco BRL, Berlin, Deutschland) gewaschen. Im Anschluss an diesen Prozess erfolgte das Wiederauffüllen der Zellkulturflaschen mit frischem Medium einschließlich der oben genannten Additive.

### 2.1.2.3 Passagieren der Zellen

Zur Vorbereitung der Versuche erfolgte die Kultivierung der HeLa- und MRC-5-Zellen in Zellkulturflaschen (Nunc Brand, Roskilde, Dänemark). Nach der Ausbildung eines ausreichenden Monolayers am Flaschengrund (80 % – 90 % Konfluenz) wurde das Nährmedium mittels Pipette entfernt. Es folgte ein Waschen der Zellen mit PBS. Die adhärent wachsenden HeLa- und MRC-5-Zellen wurden danach mit einer 1:250 verdünnten Trypsin-Lösung (Gibco BRL, Berlin, Deutschland) für 5 bis 10 min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit lösten sich durch den Einfluss der Endoprotease die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturflaschen und konnten dann passagiert werden. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml-Röhrchen überführt und in einer Zentrifuge (Rotana /TR, Fa. Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland) erneut bei 4 °C für 5 min. und 1200 U/min mit kaltem PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium und Zusätzen ausgesät.

### 2.1.2.4 Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung

Um die Zellzahlen zu bestimmen und die Vitalität der Zellen überprüfen zu können, wurde die Trypanblau-Färbung genutzt. Dieses Verfahren ermöglicht es, vitale von avitalen Zellen zu unterscheiden. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff und hat die Eigenschaft, die defekte Membran abgestorbener Zellen zu durchdringen. Dort bindet es als Anion an zytosolische Proteine und färbt die Zellen somit blau. Vitale Zellen mit

intakten Membranen erscheinen dagegen farblos, da das Trypanblau nicht in die Zellen gelangen kann.

Hierzu wurden 90 µl Trypanblau (Trypanblue Solution 0,4 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit jeweils 10 µl Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eingebracht, gemischt und anschließend in einer Zählkammer (Typ Neubauer, Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgezählt. Es wurden jeweils die gefärbten und ungefärbten Zellen in Quadranten gezählt. Nach Ermittlung der Mittelwerte konnte so der prozentuale Anteil der vitalen Zellen errechnet werden.

#### 2.1.2.5 Kryokonservierung der Zellen

Um eine langfristige Aufbewahrung der MRC-5- und HeLa-Zellen vornehmen zu können, mussten diese speziell vorbereitet werden. Nach dem Kultivieren und Passagieren erfolgte die Vitalitätsprüfung der trypsinisierten Zellen mittels Trypanblaufärbung. Dann wurden die Zellen in das spezielle Einfriermedium (siehe Anhang) überführt. In den Kryoröhrchen (Nunc Brand, Roskilde, Dänemark) wurden jeweils 1ml des Einfriermediums mit  $1 \times 10^6$  MRC-5- bzw. HeLa-Zellen gemischt.

Um das Risiko von Zellschäden zu minimieren, wurden die Kryoröhrchen über 24 h bei -80 °C im Tiefkühlschrank zunächst schonend eingefroren, um sie anschließend bei -196 °C in flüssigem Stickstoff dauerhaft zu lagern.

## 2.2 Endotoxintest

Da in den standardisierten Versuchen der Einfluss von Herniennetzen auf das Wachstumsverhalten von MRC-5- und HeLa-Zellen untersucht wurde, mussten Störgrößen soweit wie möglich ausgeschlossen werden. Eine bakterielle Kontamination des Versuchsaufbaus hätte zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt, da sie einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum gehabt hätte. Um das zu verhindern wurde an den Nährmedien ein photometrischer Endotoxintest durchgeführt. Hierbei wurde ein Endotoxintest (COATEST® Endotoxin, Chromogenix AB, Mölndal, Schweden) angewandt, der mit Hilfe des Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) arbeitet. Das LAL enthält ein Enzym das aktiviert wird, wenn bakterielle Endotoxine anwesend sind. Das dadurch aktivierte Enzym ist dann in der Lage, aus dem zugeführten chromogenen Substrat S-2423 para-Nitro-Anilin (pNA) herauszulösen und gelb zu färben. Photometrisch kann nun das pNA gemessen werden, so dass eine quantitative Bestimmung der bakteriellen Endotoxine

im flüssigen Nährmedium möglich ist. Aus dem Versuchsaufbau wurde nach entsprechender Inkubation für 24 h, 48 h und 72 h das flüssige Nährmedium ohne Zellen entnommen. Nach Vorinkubation der Nährmediumproben mit dem LAL-Reagenz erfolgte der Zusatz des chromogenen Substrates S-2324. Die Proben wurden dann auf Mikroplatten pipetiert und dort für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte die quantitative Auswertung des Tests unter Zuhilfenahme eines Mikroplattenlesers bei 405 nm und 37 °C.

## **2.3 Herniennetze**

### *2.3.1 Verwendete Herniennetze*

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Herniennetze beschrieben.

#### 2.3.1.1 TiMESH extralight®

TiMESH extralight® (GfE, Nürnberg, Deutschland) ist ein nichtresorbierbares, leichtgewichtiges Herniennetz. Es besteht aus einem monofilen Polypropylenfaden und hat eine Maschengröße von ca. 1mm. Zusätzlich ist der Faden des prothetischen Gewirkes mit einer 30 nm dicken Titanschicht überzogen. Da beide Materialien nicht voneinander getrennt werden können, handelt es sich definitionsgemäß um einen Verbundwerkstoff. Mit einem Gewicht von nur 16 g/m<sup>2</sup> ist es momentan das leichteste auf dem Markt befindliche Herniennetz. Die antistatischen Eigenschaften sowie das hydrophile Verhalten sollen laut Hersteller eine gute Handhabung bewirken und die intraoperative Modellierbarkeit erleichtern. Die Titanschicht soll die Biokompatibilität im Vergleich zu herkömmlichen, nicht resorbierbaren Herniennetzen aus Polypropylen verbessern.

Das Anwendungsgebiet beinhaltet die Versorgung von Narbenbrüchen in Onlay- und Sublay-Technik sowie die offen chirurgische Versorgung von Leistenbrüchen (z.B. Lichtenstein). Auch die Versorgung von direkten und indirekten Leistenhernien in TAPP- und TEPP-Technik ist möglich.

#### 2.3.1.2 ULTRAPRO®

ULTRAPRO® (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) ist ein sogenanntes Hybridnetz. Es handelt sich dabei um ein teilresorbierbares, leichtgewichtiges Herniennetz. Das Gewirk ist monofil gearbeitet und besitzt eine Porengröße von 3-4 mm. Das Netz hat ein Gewicht von ca. 55 g/m<sup>2</sup> und eine Dicke von 0,5 mm. Es besteht zu etwa gleichen Teilen aus

nichtresorbierbarem Polypropylen, welches identisch ist mit dem für Prolene®-Netze (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwandten Material, sowie dem resorbierbaren Poliglecapron. Letzteres wird vom Körper durch Hydrolyse innerhalb von 90-120 Tagen vollständig abgebaut, so dass bei gleicher Netzgröße etwa 65 % weniger Fremdmaterial im Körper verbleibt als bei einem vergleichbaren, nichtresorbierbaren Netz. Durch die Verwendung der Poliglecapronfasern erhält das Netz eine höhere Steifigkeit und soll damit die intraoperative Handhabung sowie Platzierung erleichtern.

Die Anwendungsgebiete des ULTRAPRO® beinhalten die offene chirurgische Versorgung von Leistenbrüchen (z.B. nach Lichtenstein) sowie die laparoskopische Versorgung mittels TEPP- oder TAPP-Technik. Auch die Versorgung von Narbenbrüchen in extraperitonealer Sublay-Technik ist möglich.

#### 2.3.1.3 VICRYL®

Das VICRYL®-Netz (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) besteht aus dem synthetischen, resorbierbaren Copolymer Polyglactin und beinhaltet zu 90 % Glycol, sowie zu 10 % Lactin. Es ist identisch mit dem Copolymer, welches für das VICRYL®-Nahtmaterial verwendet wird. Es wird als inert beschrieben und soll laut Hersteller weder pyrogen noch antigen wirken. Bei der Resorption durch Hydrolyse soll nur eine geringfügige Gewebereaktion hervorgerufen werden. Aufgrund seiner Beschaffenheit erhöht das Material temporär die mechanische Belastbarkeit des neu gebildeten Narbengewebes, indem durch die Netzstruktur das Einwachsen des Gewebes ermöglicht wird. 60-90 Tage nach der Implantation ist das Material vollständig resorbiert. Angewendet wird das Netz z.B. als Verstärkung des körpereigenen Gewebes bei dem Verschluss von Brust- und Bauchwandhernien.

#### 2.3.1.4 VYPRO® II

VYPRO® II (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) ist ein synthetisches, teilresorbierbares Herniennetz und besteht aus einem Gewirk von nichtresorbierbarem Polypropylen sowie resorbierbarem Polyglactin-Multifilamentgarn. Das Polymer des Polypropylen ist dabei identisch mit dem des Prolene®-Nahtmaterials. Das Polyglactingarn ist ein Copolymer aus 90 % Glykoid sowie 10 % Lactid und wird auch für die Herstellung des VICRYL®-Nahtmaterials (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Durch Hydrolyse wird das Nahtmaterial innerhalb von 56-70 Tagen vollständig vom Körper abgebaut. Eine zusätzliche Verstärkung des Netzes wird durch einen rautenförmig über dem Netz

verlaufenden Polypropylen/ Polyglactin-Faden erreicht. Die Porengröße wird mit 3-4 mm angegeben.

Das Einsatzgebiet des VYPRO® II-Netzes liegt in der laparoskopischen Versorgung von Hernien mittels TEPP- und TAPP-Technik, sowie in der offenen chirurgischen Versorgung von Leistenbrüchen (z.B. nach Lichtenstein).

### *2.3.2 Vorbereitung der Netze*

Die kleinste handelsübliche Größe der unterschiedlichen Herniennetze liegt bei  $6 \times 11$  cm. Da sich diese Größe für den standardisierten Versuchsaufbau (siehe 2.4.1) als unpraktisch erwies, erfolgte eine Größenreduktion der Netze. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden die Netze aus der Verpackung entnommen. Durch manuellen Zuschnitt wurden diese dann auf eine Größe von  $1 \times 1$  cm gebracht, wobei bei den Hybridnetzen darauf geachtet wurde, dass ein etwa gleiches Verhältnis zwischen resorbierbarem und nicht resorbierbarem Material bestand. Die entsprechenden Netzstücke wurden dann in sterile Bechergläser überführt und anschließend in den Versuchsaufbau eingebunden.

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### *2.4.1 Versuchsaufbau*

Als Grundlage für den Versuchsaufbau diente eine Standard-12-Loch-Platte (Nunc Brand, Roskilde, Dänemark). In Anschluss an die Kultivierung der Zellen und entsprechender Ausbildung eines Monolayers auf dem Boden der Zellkulturflaschen wurden die Zellkulturen mittels Trypsin vom Boden gelöst und dann geerntet.

Um im Versuchsaufbau die Apoptoserate und den Proliferationsindex der Zellkulturen bestimmen zu können, wurden jeweils HeLa- und MRC-5-Zellen in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  in die Vertiefungen der Platten eingesät und mit entsprechendem Nährmedium versehen. Hinzu kamen die  $1 \times 1$  cm großen Netzproben. Alle Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank (Class II Typ A/B3, NuAire, Plymouth, USA) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte dann für 24 h, 48h und 72 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank (Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland). Nach Ablauf der entsprechenden Zeitintervalle erfolgte dann jeweils die Färbung mit Annexin V und Ki-67 (siehe 2.4.2 und 2.4.3) und anschließend die durchflusszytometrische Bestimmung von Apoptoserate und Proliferationsindex.

Der Versuchsaufbau bestand aus jeweils zwei Ansätzen (siehe Abb. 1) Im ersten Ansatz erfolgte die Inkubation der Zellkulturen mit den jeweiligen Netzproben (drei Stück). Als Kontrollgruppe diente ein zweiter Ansatz mit Zellkulturen ohne Netzproben. Insgesamt wurde jede Versuchsreihe dreimal durchgeführt. Die im Ergebnisteil aufgeführten Auswertungen basieren folglich auf dem arithmetischen Mittel von jeweils neun Einzelmessungen.



Abbildung 1. Versuchsanordnung mit je drei Proben von zwei unterschiedlichen Netzen.

#### 2.4.2 Annexin V-Färbung

Die Markierung der apoptotischen Zellen erfolgte im Versuchsaufbau mit Hilfe des Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Nach Ablauf des entsprechenden Inkubationsintervalls wurden die Netzproben an der sterilen Werkbank entfernt und die Zellen unter Zuhilfenahme der Trypsin-Lösung aus den Standard-12-Loch-Platten geerntet. Es erfolgte dann die Umfüllung in 5 ml-Röhrchen (Falcon<sup>®</sup>, Round-Bottom-Tubes, BD, Heidelberg, Deutschland). In der Zentrifuge wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen (4 °C, 1200 U/min, 5 min). Im Anschluss daran wurden 100µl „Binding-Puffer“ (siehe Anhang), 5 µl Annexin V und 2 µl Propidiumjodid-Lösung (siehe Anhang) hinzupipettiert und für 15 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden zur Zellsuspension nochmals 400 µl des „Binding-Puffers“ zugegeben.

#### 2.3.4 Ki-67-Färbung

Die Vorbereitung der Zellkulturen (Ernten und Passagieren) verlief analog zur Annexin V-Färbung. Es folgte dann die Herstellung einer Suspension durch Zufügen von 500 µl Waschpuffer (siehe Anhang). Die für die Ki-67-Färbung notwendige Fixierung der Zellen wurde mit 500 µl einer 2 %igen Paraformaldehyd-Lösung (siehe Anhang) erreicht. Dazu wurde das Gemisch 10 min auf Eis inkubiert. Im Verlauf der Färbung wurde nun eine 0,25 % (v/v) Triton<sup>®</sup>-X-100-Lösung (siehe Anhang) zugefügt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut mit Waschpuffer in der Zentrifuge behandelt (4 °C, 1200 U/min für 5 min).

Bei Raumtemperatur wurde dann für 45 min eine Inkubation mit dem FITC-konjugierten, monoklonalen Maus-Antikörper gegen das humane Ki-67-Antigen (Verdünnung 1:10, Code Nr.: F 0788, Dako, Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Nach nochmaliger Behandlung mit dem Waschpuffer wurden den Zellen abschließend 500 µl der Diluid Acid free-Lösung (JT Baker, Deventer, Holland) beigelegt und für die Durchflusszytometrie fertig gestellt.

#### *2.4.4 Durchflusszytometrie*

Nach erfolgreicher Färbung mit den speziellen Antikörpern konnte bei den verwendeten Zellen nun die Apoptoserate und der Proliferationsindex mit Hilfe einer Durchflusszytometrie bestimmt werden. Hierfür wurden die entsprechend präparierten Zellproben im Durchflusszytometer (FACScan<sup>®</sup>, BD, Heidelberg, Deutschland) gemessen und die Daten anschließend mit Hilfe des Programmes Cellquest<sup>®</sup> (Version 3.2) ausgewertet.

## **2.5 Rasterelektronenmikroskopie**

### *2.5.1 Versuchsaufbau*

Neben den möglichen Einflüssen der Netzmaterialien auf die Proliferation und die Apoptose der untersuchten Zelllinien war es auch von Interesse, ob und wie die Morphologie und die Struktur der inkubierten Netze durch die Wechselwirkung mit den MRC-5- und HeLa-Zellen beeinflusst wurde. Um dies zu untersuchen wurden exemplarisch das titanbeschichtete Polypropylnetz TiMESH extralight<sup>®</sup> sowie das teilresorbierbare ULTRAPRO<sup>®</sup>-Netz mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

Zwei Gruppen wurden verglichen. Die erste Gruppe enthielt die Herniennetze, welche nach Entnahme aus den sterilen Verpackungen ohne weitere Behandlung unter einem Rasterelektronenmikroskop (SEM 505, Philips, Eindhoven, Holland) untersucht wurden. Die zweite Gruppe wurde von den Netzproben gebildet, die unter dem Einfluss der Zellkulturen gestanden hatten. Zunächst wurden die Zellen dafür entsprechend kultiviert (siehe 2.1.2.1) und nach Ausbildung eines Monolayers geerntet. Wie unter 2.4.1 beschrieben wurden die Netzproben dann für 72 h bei 37 °C mit den Zellkulturen inkubiert. Dafür wurden die Vertiefungen der Standard-12-Loch-Platten mit Netzproben belegt, mit entsprechendem Kulturmedium gefüllt und dann mit Zellen in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  beimpft. Nach Abschluss des 72 h-Intervalls wurden die unterschiedlichen Netzproben unter sterilen Bedingungen aus den Vertiefungen entfernt, getrocknet und der Rasterelektronenmikroskopie unterzogen.

### *2.5.2 Aufbereitung der Netze*

Die Netze wurden vor der Untersuchung unter sterilen Bedingungen in  $1 \times 1$  cm große Stücke geschnitten und dann unverzüglich unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die mit Zellkulturen inkubierten Netzproben hatten die gleiche Größe wie die unbehandelten Netzproben. Unter sterilen Bedingungen wurden sie mit den Zellen in den Standard-12-Loch-Platten inkubiert. Nach Ablauf der 72 h-Intervalls wurden die Netzproben aus dem Nährmedium entfernt, getrocknet und dann mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

### *2.5.3 Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie*

Alle Aufnahmen mit dem REM erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck, unter der Anleitung und mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. med. T. Wedel.

Die Durchführung der Aufnahmen erfolgte bei 10-15 kV. In der Vorbereitung wurden alle Proben mit Hilfe des kritische Punkt-Trocknung vorbereitet. (Critical point dryer E 3000, Quorum Technologies, West Sussex, Großbritannien). Bei dieser Methode wird das in den Proben enthaltene Wasser über Aceton als Zwischenstufe durch flüssiges CO<sub>2</sub> ersetzt. Durch die kritische Punkt-Trocknung werden die Oberflächenkräfte vermieden, die sonst bei der Trocknung auftreten und feine Strukturen beschädigen oder zerstören würden.

Die Proben wurden flach auf eine Aluminiumplatte aufgebracht und mit Platin-Palladium besputtert. Die Bilder wurden dann auf APX 100 Filmen (Agfaphoto, Leverkusen, Deutschland) entwickelt und dann mit Hilfe einer speziellen Software digital bearbeitet.

## **2.6 Herstellung der Lyophilisate**

Um herauszufinden ob die Netzmaterialien selbst den Einfluss auf die Apoptoserate und den Proliferationsindex verursachten oder ob im Laufe der Inkubation möglicherweise Substanzen aus den Materialien herausgelöst wurden, erfolgten weitere Untersuchungen.

Mit Aqua dest. wurde ein Extrakt der möglicherweise löslichen Bestandteile der Materialien hergestellt. Dieses Extrakt wurde in Glasgefäßen hergestellt um eine Kontamination des Aqua dest. durch Kunststoffgefäße auszuschließen. Die unterschiedlichen Netzproben wurden dazu wie unter 2.3.2 beschrieben aufbereitet und für 72 h mit 1 ml Aqua dest. in kleinen sterilen Glasgefäßen (Präparatgläser 35x12 mm, Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Zur Kontrolle diente ein Glasgefäß, welches nur mit Aqua dest. befüllt worden war. Unter

sterilen Bedingungen wurde dann die Flüssigkeit aus den Gefäßen entfernt und die Lösung durch Lyophilisation (Christ L1/ Alpha 1, Fa. Christ, Osterode, Deutschland) konzentriert. Das Prinzip der lyophilen Trocknung beruht auf der schnellen Verdunstung des Aqua dest. im Vakuum und unter sterilen Bedingungen. Anschließend wurden die Gefäße wieder mit 50 µl Aqua dest. befüllt, um von den Proben dann mit Hilfe eines Gaschromatographen ein Massenspektrum anzufertigen.

## **2.7 Massenspektrometrie**

Die angefertigten Lyophilisate (siehe 2.7.1) der löslichen Bestandteile der unterschiedlichen Netzproben, sowie Aqua dest. als Negativkontrolle, wurden mit Hilfe eines Massenspektrometers (*Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*, FT-ICR MS) (Apex II, Bruker-Daltonics, Billerica, USA) analysiert. Das Instrument ist mit einer Elektrospray-Ionenquelle (ESI) ausgerüstet. Im Rahmen der Untersuchungen wurden 10 µl der jeweiligen Proben in 200 µl einer speziellen Elektrospray-Lösung aufgenommen und mit einer Rate von 2 µl/min in das Massenspektrometer gesprüht. Die gemessenen Massenspektren positiver Ionen der verschiedenen Proben wurden unter identischen experimentellen Bedingungen aufgenommen, nachdem das Gerät extern mit Peptiden bekannter Masse geeicht worden war. Die Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biophysik des Forschungszentrums Borstel unter der Anleitung und mit der Unterstützung von Herrn PD Dr. rer. nat. B. Lindner.

## **2.8 Statistik**

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde der nicht-parametrische U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney verwendet. Dieser wird bei einem Gruppenvergleich für unabhängige Stichproben verwendet und setzt keine Normalverteilung der Stichprobenwerte voraus. Der U-Test prüft die Nullhypothese, dass zwei Verteilungen zu derselben Grundgesamtheit gehören. Für die in dieser Arbeit vorgenommenen Tests galt ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  als signifikant. Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS<sup>®</sup> Version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Vitalitätsprüfung und Endotoxintest**

#### *3.1.1 Vitalitätsprüfung*

Trotz einer schonenden Kryokonservierung der verwendeten Zellen kann es zu einer Beschädigung der Kulturen kommen. Dies hätte einen negativen Einfluss auf die Versuchsergebnisse. Um einen reproduzierbaren Versuchsaufbau zu gewährleisten, benötigen die Zellen eine ausreichende Vitalität sowie ein geeignetes Proliferationspotential. Um dies sicherzustellen, wurden die verwendeten Zellen im Laufe der Untersuchungen in regelmäßigen Abständen getestet. Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Vitalität der verwendeten HeLa- und MRC-5-Zellkulturen stets über 98 % lag.

#### *3.1.2 Endotoxin-Test*

Eine bakterielle Kontamination der Netzproben und somit der Versuchsansätze würde einen schädlichen Einfluss auf die verwendeten Zellkulturen darstellen und die Messergebnisse verfälschen. Um auszuschließen, dass die Versuchsansätze bakterielle Endotoxine enthalten, wurde mittels LAL-Test (siehe 2.2) eine quantitative Bestimmung durchgeführt. Alle Messwerte bei 24 h, 48 h und 72 h lagen unterhalb des vom Hersteller angegebenen Grenzwertes von 0,06 EU/ml (5 pg/ml). Ein negativer Einfluss auf die durchflusszytometrische Messung von Zellproliferation und Apoptoserate durch eine bakterielle Kontamination der Netzproben konnte somit ausgeschlossen werden.

### **3.2 Durchflusszytometrie**

Um den möglichen Einfluss der Herniennetze auf die MRC-5- und HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden die Apoptoserate und der Proliferationsindex der Zellkulturen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. So konnten die Zellen in diesem in vitro-Modell untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Nach den einzelnen Inkubationszeiten im Brutschrank (siehe 2.4.1.) erfolgte dann die Aufbereitung der Zellen mit anschließender Färbung mittels Annexin V (für Apoptoserate) bzw. Ki-67 (für Proliferationsrate). Danach wurde die Messung im Durchflusszytometer durchgeführt (siehe 2.4.4.). Die folgenden Diagramme geben einen Überblick über die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung von Proliferationsindex und Apoptoserate.

### 3.2.1 Apoptoserate HeLa-Zellen

#### 3.2.1.1 TiMESH extralight®

Bei den untersuchten HeLa-Zellen, die mit den TiMESH extralight® -Netzen inkubiert wurden, kam es bereits nach 24 h zu einem sichtbaren Anstieg der Apoptoserate von 3,52 % auf 6,73 %. Auch in der Kontrollgruppe ohne Netz kam es zu einem Anstieg auf 5,45 %. Bei der dritten Messung nach 48 h kam es in beiden Fällen wieder zu einem leichten Rückgang der Rate auf 5,94 % in der Netzgruppe bzw. 3,43 % in der Negativkontrolle. Am Endpunkt der Messreihe nach 72 h zeigte sich in der Netzgruppe mit 5,2 % nur eine minimal höhere Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 4,96 %.

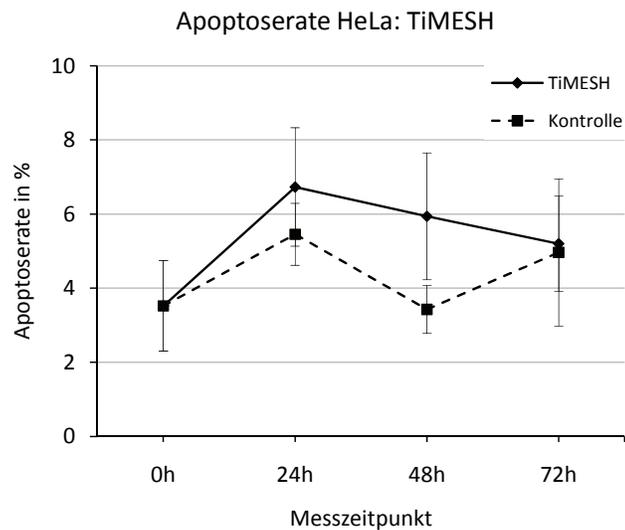


Diagramm 1. Darstellung der Apoptoserate von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie aus der Tabelle 1 zu entnehmen ist, zeigten sich sowohl für die 24 h, als auch für die 48 h Messung signifikante Werte.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	17,0	0,04	ja
48 h	7,0	0,001	ja
72 h	34,0	0,60	nein

Tabelle 1. Statistische Analyse der Apoptoserate von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.1.2 ULTRAPRO®

In der Gruppe der HeLa-Zellen, die mit dem Ultrapro®-Netz inkubiert wurden, kam es ausgehend von einer anfänglichen Apoptoserate von 3,97 % nach 24 h zu einem leichten Rückgang auf 3,72 %. In der Kontrollgruppe war die Abnahme auf 2,74 % etwas deutlicher. Bei der zweiten Messung nach 48 h ergab sich in der Netz-Gruppe mit 3,74 % eine nahezu identische Apoptoserate. In der Kontrollgruppe konnte hingegen ein weiterer Rückgang der apoptotischen Zellen auf 2,1 % gemessen werden. Zum Ende der Versuchsreihe nach 72 h lag die Apoptoserate bei den mit ULTRAPRO®-Netzen inkubierten HeLa-Zellen mit 4,48 % deutlich über der Kontrollgruppe, in welcher sie 2,31 % betrug.

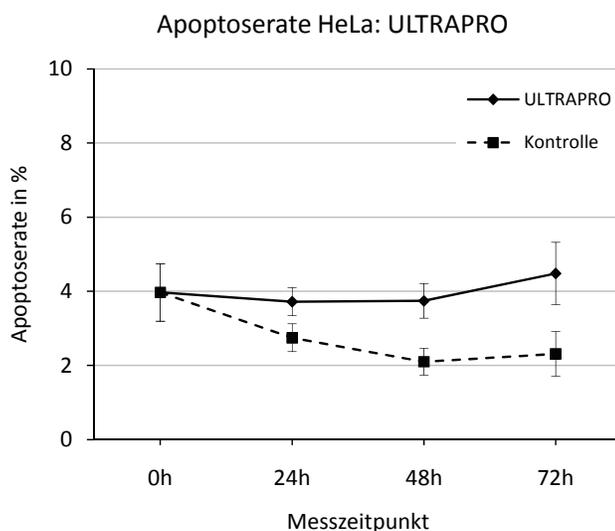


Diagramm 2. Darstellung der Apoptoserate der HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, gab es zu jedem der drei Messzeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen Netz- und Kontrollgruppe.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	0,0	0,00004	ja
48 h	0,0	0,00004	ja
72 h	0,0	0,00004	ja

Tabelle 2. Statistische Analyse der Apoptoserate von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.1.3 VICRYL<sup>®</sup>

Ausgehend von einer anfänglichen Apoptoserate von 4,39 % nahm die Anzahl der sterbenden Zellen nach 24 h in der Netz-Gruppe auf 7,12 % zu. Zum Vergleich blieb die Kontrollgruppe mit 5,1 % nahezu konstant. Bei der dritten Messung nach 48 h zeigte sich für die Netzgruppe ein weiterer Anstieg der Apoptoserate. Sie beträgt 7,43 % und liegt damit höher als die 3,55 % in der Kontrollgruppe. Deutlich ist der Unterschied auch am Ende des Versuches nach 72 h. Hier liegt die Rate der apoptotischen Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL<sup>®</sup>-Netz bei 7,78 %, wohingegen sie in der Kontrollgruppe mit 4,8 % nur wenig über dem Ausgangswert zu Beginn des Versuches liegt.

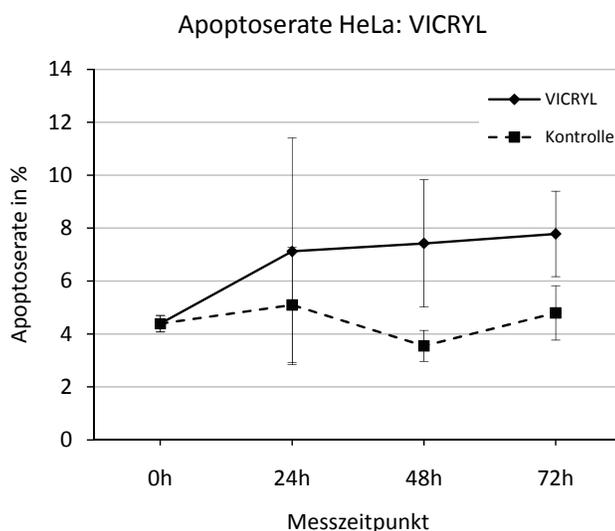


Diagramm 3. Darstellung der Apoptoserate von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL<sup>®</sup>-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

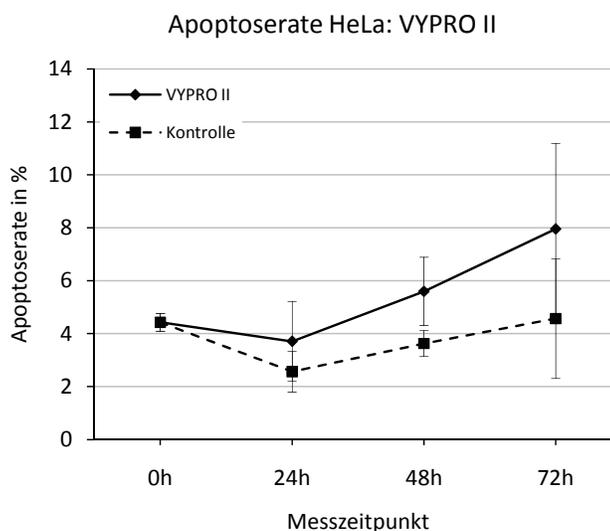
Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, zeigen sich sowohl für die 48 h-Messung, als auch für die 72 h-Messung signifikante Unterschiede.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	28,0	0,30	nein
48 h	1,0	0,00008	ja
72 h	4,0	0,0014	ja

Tabelle 3. Statistische Analyse der Apoptoserate von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL<sup>®</sup>-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.1.4 VYPRO® II

Bei der Bestimmung der Apoptoserate der HeLa-Zellen, die mit dem VYPRO® II-Netz inkubiert wurden, zeigte sich nach 24 h ein Wert von 3,71 %. In der Kontrollgruppe wurde eine Rate von 2,57 % gemessen. In beiden Fällen zeigte sich also ein Rückgang relativ zum Ausgangswert, der 4,43 % betrug. Nach 48 h zeigte sich nun in der Netzgruppe ein Wert von 5,59 %, wobei die Apoptoserate bei der Negativ-Kontrolle mit 3,63 % weiterhin unter dem Ausgangswert lag. Zum Abschluss der Versuchsreihe stieg sie bei den Zellen, die mit dem VYPRO® II-Netz inkubiert wurden, mit 7,95 % noch einmal deutlich an. Im Vergleich dazu lag sie in der Kontrollmessung der Zellen ohne Netz mit 4,57 % nur knapp über dem Ausgangswert.



*Diagramm 4.* Darstellung der Apoptoserate von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, zeigen die Messungen nach 24 h und 48 h signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	20,5	0,08	nein
48 h	4,0	0,00005	ja
72 h	15,0	0,024	ja

*Tabelle 4.* Statistische Analyse der Apoptoserate von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.1.5 Zusammenfassung der Apoptose bei HeLa-Zellen

Betrachtet man Diagramm 5 der Apoptoserate von HeLa-Zellen, die mit unterschiedlichen Netzen inkubiert wurden, so zeigt sich, dass die Apoptoserate nach 72 h Inkubation bei fast allen Netzen deutlich höher ausfällt als im Vergleich zum Nullpunkt. Die einzige Ausnahme bildet hier ULTRAPRO<sup>®</sup>. Dort ist sie nur unwesentlich erhöht. In den ersten 24 h der Inkubation kommt es bei TiMESH extralight<sup>®</sup> und VICRYL<sup>®</sup> zum stärksten Anstieg. Bei ULTRAPRO<sup>®</sup> zeigt sich über den gesamten Versuchszeitraum eine nahezu konstante Apoptoserate. Nach dem steilen Anstieg der Rate bei TiMESH extralight<sup>®</sup> fallen die Werte wieder bei 48 h und 72 h. Die Zellen, die mit VICRYL<sup>®</sup> und VYPRO<sup>®</sup> II inkubiert wurden, haben ihre maximale Apoptoserate am Ende des Versuches, und die gemessenen Werte liegen deutlich über denen von ULTRAPRO<sup>®</sup> und TiMESH extralight<sup>®</sup>.

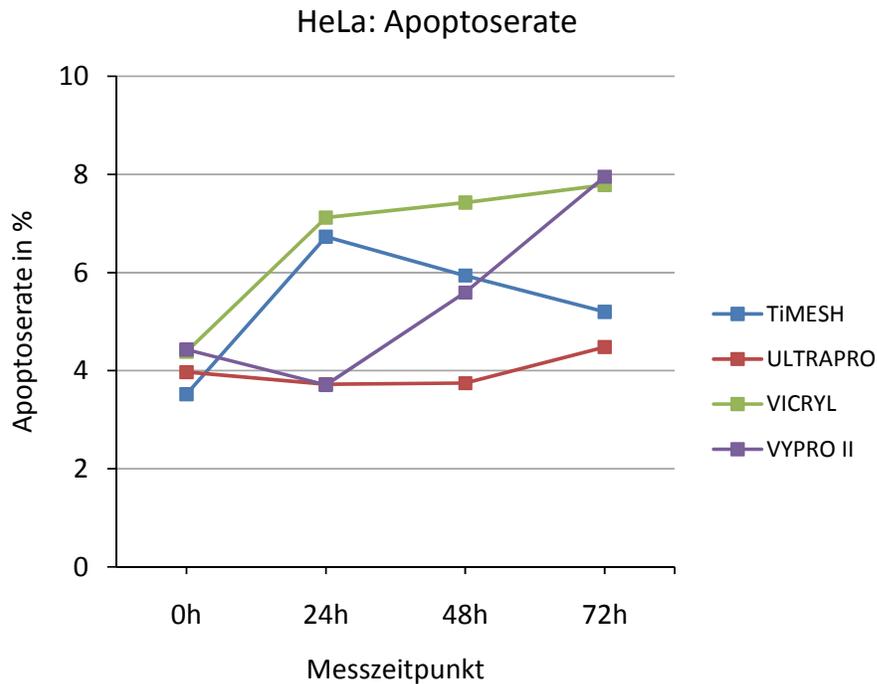


Diagramm 5. Vergleichende Darstellung des netzspezifischen Apoptoseraten der HeLa-Zellen (Mittelwerte).

### 3.2.2 Proliferationsindex HeLa-Zellen

#### 3.2.2.1 TiMESH extralight®

Zum Zeitpunkt der Nullmessung wurde eine Proliferationsrate von 94 % gemessen. Ausgehend davon zeigten sich in beide Gruppen nahezu identische Entwicklungen der Werte bei 24 h und 48 h. Sie lagen in der Netzgruppe mit 98,4 % bei der zweiten Messung und 98,74 % bei der dritten Messung über dem Ausgangswert. In der Kontrollgruppe lag die Rate nach 24 h bei 98,37 %; bei der Bestimmung nach 48 h lag sie mit 98,85 % minimal über der Netzgruppe. Einen deutlichen Unterschied zeigten jedoch die Proliferationsraten am Ende der Versuchsreihe. Während sie in der Netzgruppe abschließend bei 96,86 % lag, kam es in der Kultur des Kontrollansatzes zu einem starken Abfall des Proliferationsindex auf 89,02 %.

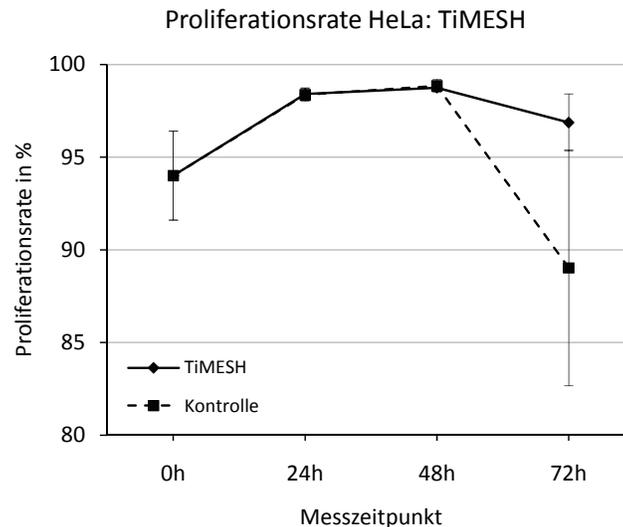


Diagramm 6. Darstellung des Proliferationsindex der HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz und der Kontrollgruppe (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, zeigte sich nur bei der 72 h-Messung ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Bedingungen.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	39,0	0,93	nein
48 h	27,00	0,26	nein
72 h	6,0	0,001	ja

Tabelle 5. Statistische Analyse des Proliferationsindex von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.2.2 ULTRAPRO®

Zu Beginn der Messreihe betrug der Proliferationsindex der HeLa-Zellen 96,16 %. Nach 24 h kam es bei den Zellen, die mit dem ULTRAPRO®-Netz inkubiert wurden zu einer geringfügigen Abnahme auf 95,39 %. Der Unterschied zur Kontrollgruppe, in der sich mit 95,84 % eine etwas höhere Wachstumsrate fand, war also sehr gering. Bei der dritten Messung setzte sich der Aufwärtstrend mit 96,47 % in der Netzgruppe und mit 97,60 % in der Kontrollgruppe fort. Zum Ende der Inkubationszeit stieg der Proliferationsindex in der Netzgruppe auf 97,83 %, während in der Kontrollgruppe wieder ein Rückgang auf 96,64 % zu verzeichnen war.

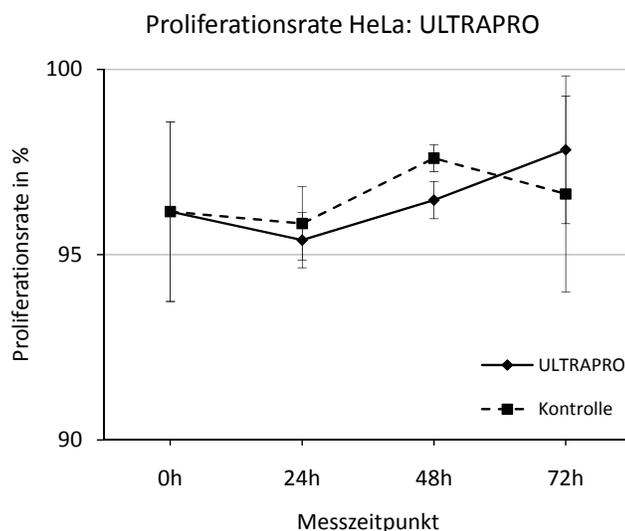


Diagramm 7. Darstellung des Proliferationsindex der HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen nach 48 h (Tabelle 6).

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	28,0	0,30	nein
48 h	2,0	0,00002	ja
72 h	31,0	0,44	nein

Tabelle 6. Statistische Analyse des Proliferationsindex von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.2.3 VICRYL®

Nach einem Ausgangswert von 83,05 % zu Beginn der Versuches, kam es nach 24 h bei den mit VICRYL®-Netzen inkubierten Zellen zu einer deutlichen Zunahme des Proliferationsindex auf 87,02 %. In der Kontrollgruppe stieg der Wert hingegen noch deutlicher auf 92,53 % an. Bei der dritten Messung nach 48 h zeigte sich in der Netzgruppe mit 95,97 % ein höherer Wert als bei den Zellen ohne Netz. Hier betrug der gemessene Proliferationsindex 93,49 %. Zum Ende der Messreihe nach 72 h war der Proliferationsindex in der Netzgruppe wieder leicht auf 94,4 % gefallen, wohingegen der Index in der Kontrollgruppe mit 96,12 % höher ausfiel.

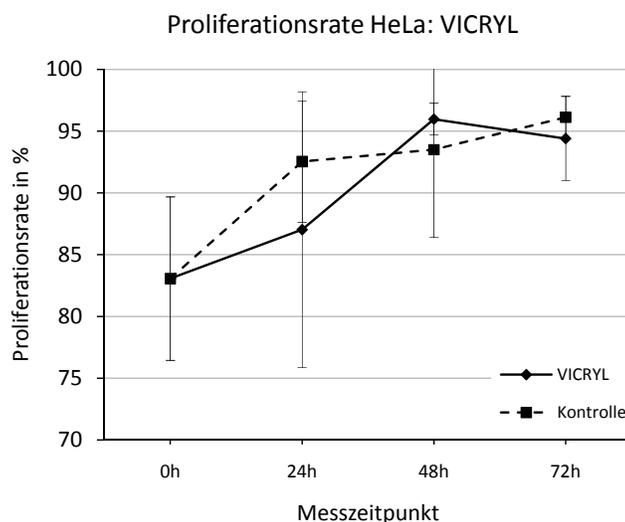


Diagramm 8. Darstellung des Proliferationsindex der HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Tabelle 7 zeigt, dass zu keinem der drei Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen Netz- und Kontrollgruppe festgestellt werden konnte.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	27,0	0,26	nein
48 h	32,0	0,49	nein
72 h	27,5	0,26	nein

Tabelle 7. Statistische Analyse des Proliferationsindex von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.2.4 VYPRO® II

Zu Beginn der Messreihe ließ sich ein Proliferationsindex von 81,58 % nachweisen. Schon nach 24 h zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg des Wachstums. In der Netzgruppe zeigte sich ein Proliferationsindex von 92,40 % und in der Kontrollgruppe von 93,08 %. Im weiteren Verlauf stieg nach 48 h die Proliferation in der Netzgruppe auf 96,06 % an. In der Kontrollgruppe lag sie mit 97,69 % knapp darunter. Am Ende des Versuches zeigten sich mit 94,42 % in der Netzgruppe und 94,62 % in der Kontrollgruppe fast identische Werte.

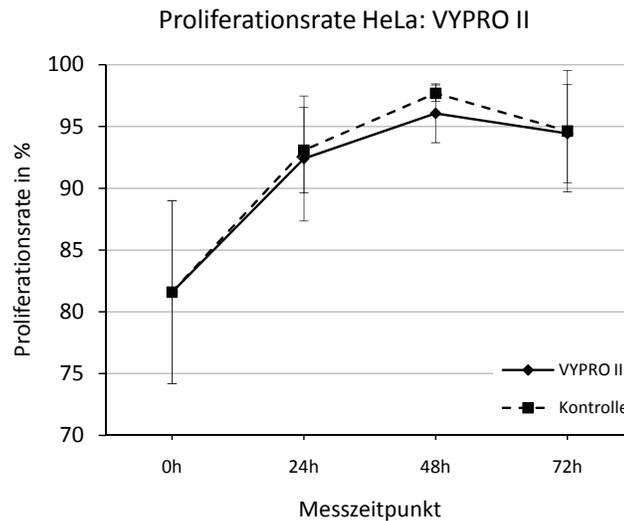


Diagramm 9. Darstellung des Proliferationsindex der HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

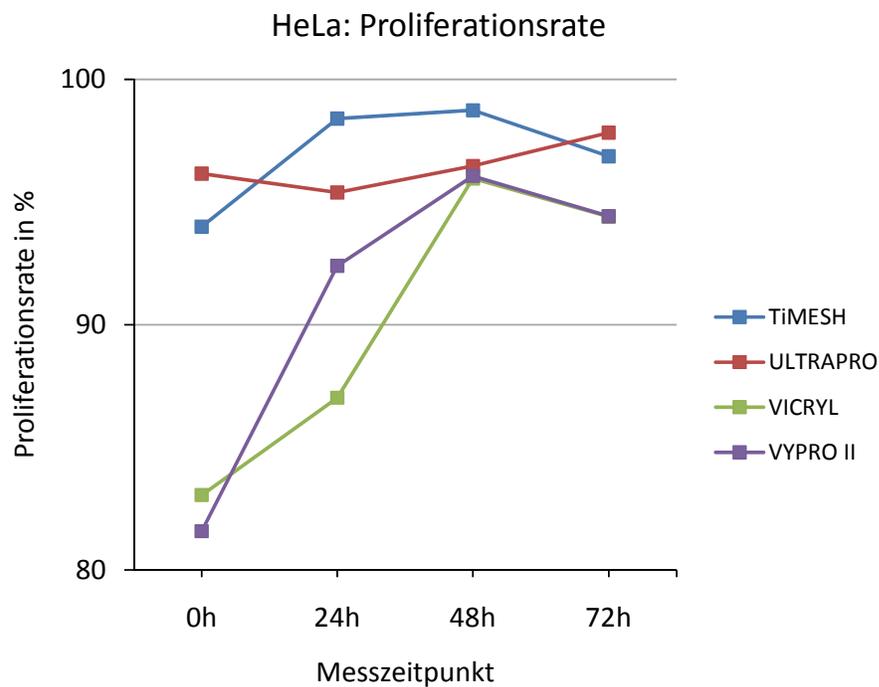
Wie aus Tabelle 8 zu entnehmen ist, wurde zu keinem der Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen Netz- und Kontrollgruppe gefunden.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	39,0	0,93	nein
48 h	26,0	0,22	nein
72 h	27,5	0,26	nein

Tabelle 8. Statistische Analyse des Proliferationsindex von HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.2.5 Zusammenfassung: Proliferation HeLa-Zellen

In dem Übersichtsdiagramm des Proliferationsindex von HeLa-Zellen, die mit unterschiedlichen Netzen inkubiert wurden, zeigen sich einige Unterschiede. Ausgehend von einer mäßigen Proliferationsrate kam es bei VYPRO<sup>®</sup> II und VICRYL<sup>®</sup> zu einem deutlichen Anstieg nach 24 h. Bei TiMESH extralight<sup>®</sup> und ULTRAPRO<sup>®</sup> zeigten sich wenige Veränderungen, am Ende des Versuches lag der Wert dennoch knapp über dem Ausgangswert. Bei VYPRO<sup>®</sup> II und VICRYL<sup>®</sup> hingegen zeigte sich nach 72 h jedoch jeweils ein Proliferationsindex, der erheblich über dem Wert der Anfangsmessung lag.



*Diagramm 10.* Vergleichende Darstellung der netzspezifischen Proliferationsindizes der HeLa-Zellen (Mittelwerte).

### 3.2.3 Apoptoserate MRC-5-Zellen

#### 3.2.3.1 TiMESH extralight®

Am Ausgangspunkt des Versuches zeigte sich bei den MRC-5-Zellen eine Apoptoserate von 1,46 %. Schon nach 24 h kam es in beiden Gruppen zu einem starken Anstieg des Wertes, der in der Netzgruppe dann 4,57 % und in der Negativkontrolle 3,78 % betrug. Im weiteren Verlauf kam es in der Netzgruppe zu einem leichten Rückgang auf 3,68 % nach 48 h. Auch in der Kontrollgruppe ging die Apoptoserate zurück und betrug dort 3,15 %. Am Ende der Versuchsreihe kam es bei den inkubierten Zellen dann zu einem weiteren Anstieg, sodass die Apoptoserate mit 4,42 % mehr als das Doppelte des Ausgangswertes betrug. In der Kontrollgruppe hingegen zeigte sich wieder eine leichte Abnahme, so dass der Wert bei der letzten Messung 2,64 % betrug.

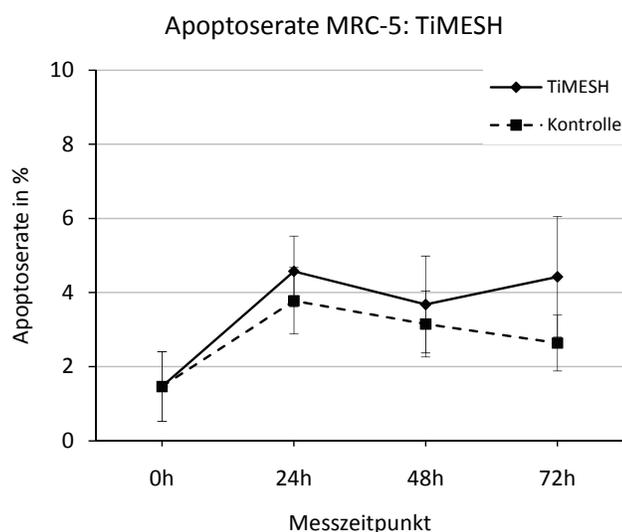


Diagramm 11. Darstellung der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, zeigte sich nach 72 h ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	20,0	0,08	nein
48 h	32,0	0,49	nein
72 h	13,5	0,014	ja

Tabelle 9. Statistische Analyse der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.3.2 ULTRAPRO®

Auch bei Inkubation von MRC-5-Zellen mit dem ULTRAPRO®-Netz kam es ausgehend von einer anfänglichen Apoptoserate von 2,29 % zu einer deutlichen Zunahme nach 24 h. In der Netzgruppe betrug sie zu diesem Zeitpunkt 4,68 %. In der Kontrollgruppe ohne Netz war sie mit 3,89 % geringer. Bei der Bestimmung nach 48 h zeigten sich mit 3,8 % in der Netzgruppe und 3,79 % bei den Zellen ohne Netz nahezu identische Apoptoseraten. Zum Ende des Versuches nach 72 h lag die gemessene Apoptoserate der Zellen, die mit dem ULTRAPRO®-Netz inkubiert wurden, mit 5,9 % deutlich über dem Wert von 3,33 % der Kontrollgruppe.

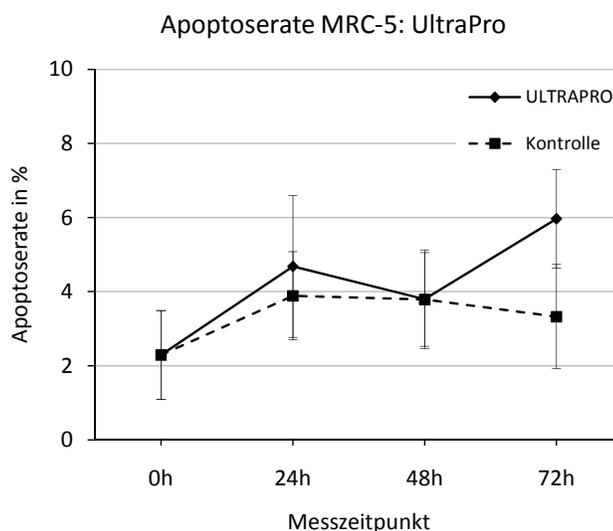


Diagramm 12. Darstellung der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Die statistischen Analysen ergaben nur für die Werte der 72 h-Messung ein signifikantes Ergebnis (Tabelle 10).

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	29,0	0,34	nein
48 h	37,5	0,80	nein
72 h	6,5	0,0012	ja

Tabelle 10. Statistische Analyse der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.3.3 VICRYL®

Der Ausgangswert der Apoptose lag bei 5,31 %. Nach einer Inkubation von 24 h kam es in der Netzgruppe zu einer Zunahme auf 7,09 %, in der Kontrollgruppe hingegen nahm die Apoptoserate auf 4,72 % leicht ab. Bei der zweiten Messung zeigte sich bei den mit dem VICRYL®-Netz inkubierten Zellen eine weitere Zunahme der Apoptose auf 9,80 %. In der Kontrollgruppe zeigte sich mit 4,97 % kaum eine Änderung im Vergleich zu der 24 h-Messung. Am Ende der Versuchsreihe kam es zwar in beiden Gruppen zu einer Abnahme der Apoptoserate, dennoch lag sie in der Netzgruppe mit 7,53 % mehr als deutlich über dem Wert von 2,93 % aus der Negativkontrolle.

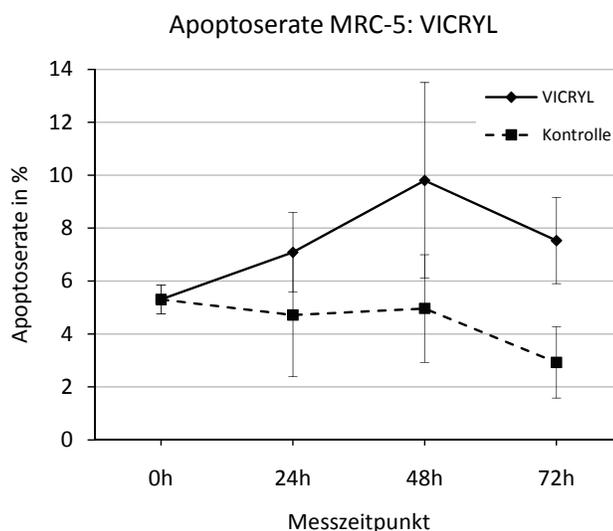


Diagramm 13. Darstellung der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie Tabelle 11 zu entnehmen ist, weisen alle Messergebnisse einen signifikanten Unterschied zwischen Netz- und Kontrollgruppe auf.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	14,0	0,019	ja
48 h	9,0	0,004	ja
72 h	1,0	0,00008	ja

Tabelle 11. Statistische Analyse der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.3.4 VYPRO® II

Zu Beginn der Versuchsreihen zeigte sich ein Ausgangswert der Apoptose von 4,82 %. In der Netzgruppe kam es nach 24 h zu einem starken Anstieg des Wertes auf 13,28 %. Nach 48 h betrug er noch 12,07 %. Auch bei der letzten Messung nach 72 h zeigte sich mit 7,94 % eine deutliche Zunahme im Vergleich zum Beginn des Versuches. Zwar kam es auch in der Kontrollgruppe nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg auf 9,07 % doch bei 48 h war der Werte wieder auf 5,48 % gesunken. Bei der letzten Messung lag die Apoptoserate mit 4,08 % sogar unter dem Ausgangswert.

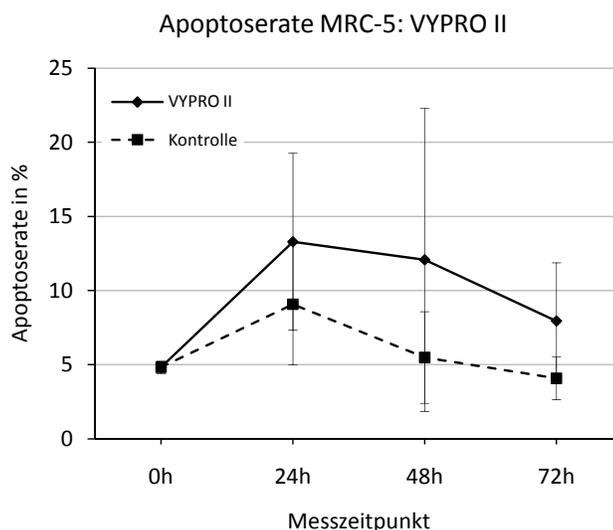


Diagramm 14. Darstellung der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz und einer Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie aus Tabelle 12 zu entnehmen ist, zeigen sich sowohl für die 48 h-Messung, als auch für die 72 h- Messung signifikante Unterschiede.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	23,0	0,14	nein
48 h	16,0	0,031	ja
72 h	11,0	0,008	ja

Tabelle 12. Statistische Analyse der Apoptoserate von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.3.5 Zusammenfassung: Apoptoserate MRC-5-Zellen

Betrachtet man Übersichtsdiagramm 16, in dem die netzspezifischen Apoptoseraten miteinander verglichen werden, zeigt sich, dass die anfängliche Apoptoserate bei TiMESH extralight® und ULTRAPRO® deutlich unter denen von VYPRO® II und VICRYL® liegt. Auffällig ist der starke Anstieg des Wertes nach 24 h im Fall von VYPRO® II. Sowohl nach 48 h und 72 h zeigte sich jedoch wieder eine kontinuierliche Verringerung der Apoptoserate, so dass sich am Ende fast der gleiche Wert wie in der VICRYL®-Gruppe findet. Bei 72 h hat sowohl bei ULTRAPRO®, als auch bei TiMESH extralight® eine Verdopplung der Apoptoserate stattgefunden. Insgesamt zeigte sich jedoch am Ende des Versuches in der TiMESH extralight®-Gruppe die niedrigste Apoptoserate. Bei VICRYL® und VYPRO® II ist sie hingegen doppelt so hoch. Der Wert der ULTRAPRO®-Gruppe liegt dazwischen.

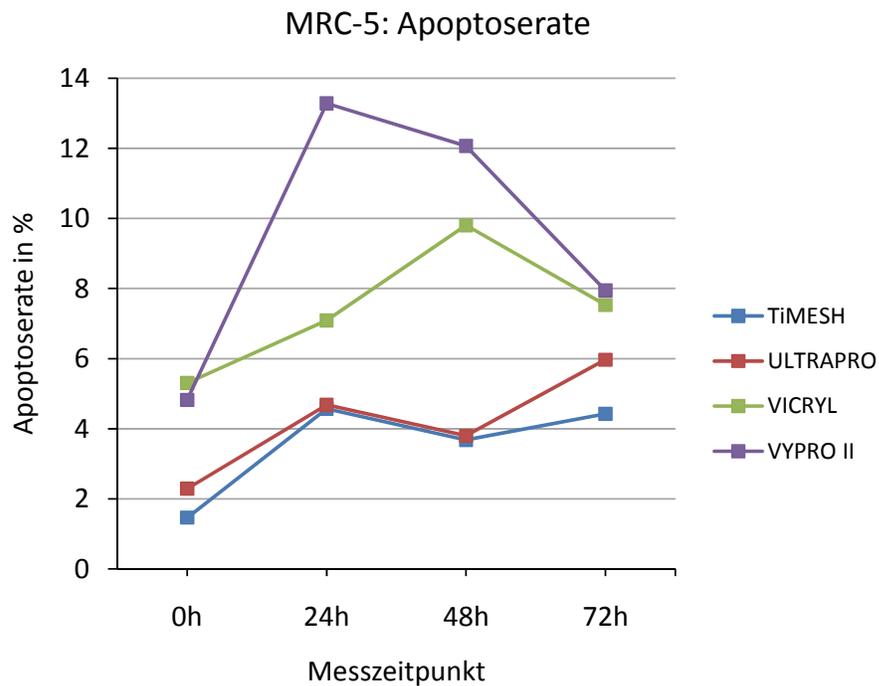


Diagramm 15. Vergleichende Darstellung der netzspezifischen Apoptoseraten der MRC-5-Zellen (Mittelwerte).

### 3.2.4 Proliferationsindex MRC-5-Zellen

#### 3.2.4.1 TiMESH extralight®

In der Netzgruppe zeigte sich zu Beginn des Versuches bei den MRC-5-Zellen ein Proliferationsindex von 96,97 %. Mit Werten von 95,68 % nach 24 h und 97,81 % nach 48 h zeigte sich kaum eine Änderung im Proliferationsverhalten. Am Ende der Messreihe betrug der Index der proliferierenden Zellen 97,31 %. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf. Nach 24 h kam es zu einem minimalen Absinken des Wertes auf 96,46 % und bei der dritten Messung betrug er 97,14 %. Am Ende der Messreihe nach 72 h sank der Proliferationsindex der Zellen ohne Netz ab und lag mit 95,90 % unter dem der Netzgruppe.

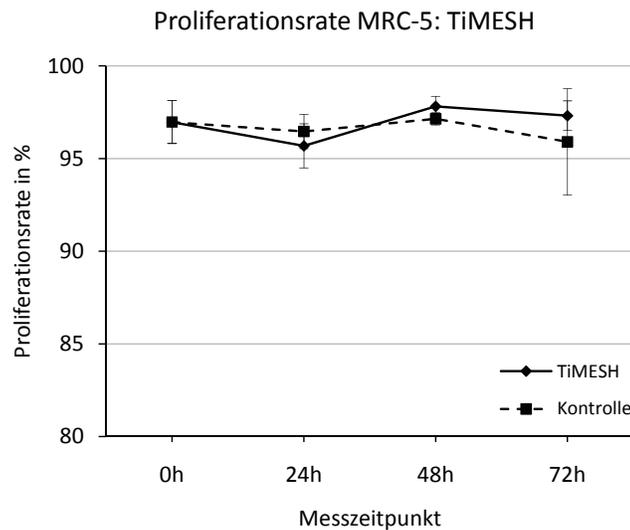


Diagramm 16. Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, zeigte die 48 h-Messung einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	29,0	0,08	nein
48 h	10,0	0,008	ja
72 h	24,0	0,16	nein

Tabelle 13. Statistische Analyse des Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem TiMESH extralight®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.4.2 ULTRAPRO®

Ausgehend von einem anfänglichen Proliferationsindex von 96,2 % kam es nach 24 h in der Gruppe der MRC-5-Zellen, die mit dem ULTRAPRO®-Netz inkubiert wurden, zu einem leichten Anstieg auf 97,76 %. In der Kontrollgruppe lag er mit 99,27 % etwas höher. Bei der dritten Messung nach 48 h kam es in beiden Gruppen zu einem Rückgang. In der Netzgruppe betrug der Proliferationsindex dann 95,71 % und in der Kontrollgruppe ohne Netz 97,43 %. Bei der letzten Messung nach 72 h zeigten sich mit 96,61 % in der Netzgruppe und 96,58 % in der Kontrollgruppe nahezu identische Werte.

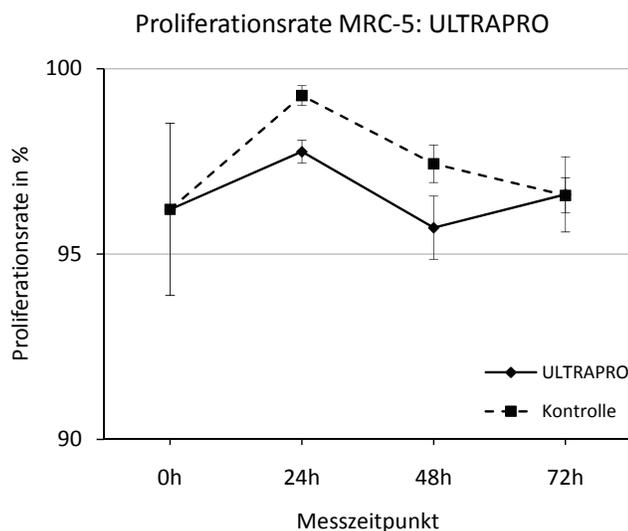


Diagramm 17. Darstellung des Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, zeigen sich sowohl für die 24 h-Messung, als auch für die 48 h-Messung signifikante Unterschiede zwischen Netz- und Kontrollgruppe.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	0,0	0,00004	ja
48 h	0,0	0,00004	ja
72 h	37,5	0,80	nein

Tabelle 14. Statistische Analyse des Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem ULTRAPRO®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.4.3 VICRYL®

Am Anfang des Versuches betrug der Proliferationsindex der MRC-5-Zellen 94,19 %. Im Verlauf zeigte sich eine Steigerung auf 96,62 % nach 24 h. Bei der dritten Messung (48 h) betrug er 98,26 %. Zum Ende der Messreihe nach 72 h sank er noch einmal leicht ab und lag dann bei 97,41 %. In der Kontrollgruppe ohne Netz stieg er nach 24 h ebenfalls an und betrug 98,09 %. Nach 48 h und 72 h zeigten sich mit 97,15 % und 98,17 % nur geringe Schwankungen.

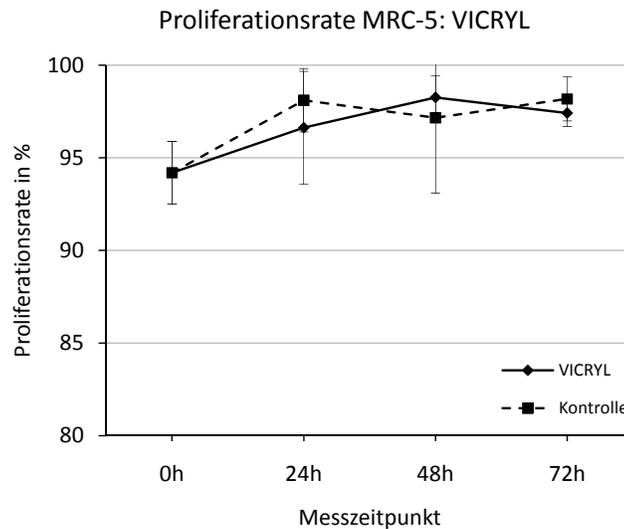


Diagramm 18. Darstellung des Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL®-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Aus Tabelle 15 ist zu entnehmen, dass nur bei der 72 h- Messung ein signifikantes Ergebnis vorliegt.

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	26,5	0,22	nein
48 h	35,0	0,66	nein
72 h	17,5	0,04	ja

Tabelle 15. Statistische Analyse des Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VICRYL®-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.4.4 VYPRO® II

Nach einem Ausgangswert von 92,45 % zu Beginn des Versuches kam es nach 24 h bei den mit VYPRO® II-Netzen inkubierten Zellen zu einer Steigerung des Proliferationsindex auf 95,26 %. In der Kontrollgruppe stieg die Wachstumsrate hingegen auf 96,25 % an. Bei der dritten Messung nach 48 h zeigte sich bei der Netzgruppe mit 97,64 % ein höherer Wert als bei den Zellen ohne Netz. Hier betrug der gemessene Proliferationsindex 97,45 %. Zum Ende der Messreihe nach 72 h war der Proliferationsindex in der Netzgruppe wieder leicht auf 97,0 % gefallen, wohingegen die Wachstumsrate in der Kontrollgruppe mit 98,05 % höher ausfiel.

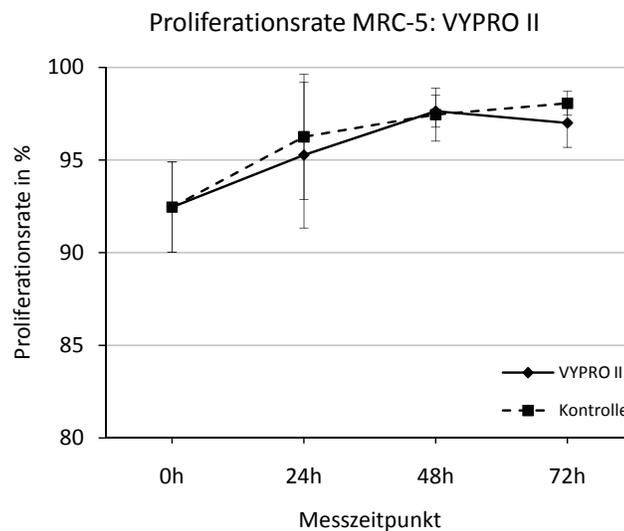


Diagramm 19. Darstellung des Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz und der Kontrollgruppe ohne Netz (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Zu keinem der Messzeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Netz- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Tabelle 16).

Messzeitpunkt	U-Wert	p-Wert	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
24 h	32,0	0,49	nein
48 h	36,0	0,73	nein
72 h	20,0	0,08	nein

Tabelle 16. Statistische Analyse des Proliferationsindex von MRC-5-Zellen nach Inkubation mit dem VYPRO® II-Netz zu den Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

### 3.2.4.5 Zusammenfassung: Proliferationsindex MRC-5-Zellen

Betrachtet man nun die Übersichtsgrafik (Diagramm 20), in der die netzspezifischen Proliferationsindizes miteinander verglichen werden, zeigt sich, dass nur im Falle von TiMESH extralight<sup>®</sup> die Proliferation bei 24 h nachlässt. Bei den anderen Netzen zeigen sich deutlich höhere Werte als zu Beginn. Bei den Zellen, die mit ULTRAPRO<sup>®</sup> inkubiert wurden, wird bei 48 h der niedrigste Proliferationsindex aller Netze gemessen. Die Werte der anderen Netze (VICRYL<sup>®</sup> und VYPRO<sup>®</sup> II) sind zu diesem Zeitpunkt nahezu identisch. So unterschiedlich der einzelne Kurvenverlauf auch ist, am Ende der Versuchsreihe zeigten sich bei allen Netzen ähnliche Werte. Kein Netz hat also zu diesem Zeitpunkt einen besonders positiven oder negativen Einfluss auf die MRC-5-Zellen. Festzuhalten bleibt jedoch, dass sich nach 72 h bei allen Netzen eine höhere Proliferationsrate findet als zu Beginn der Messreihe.

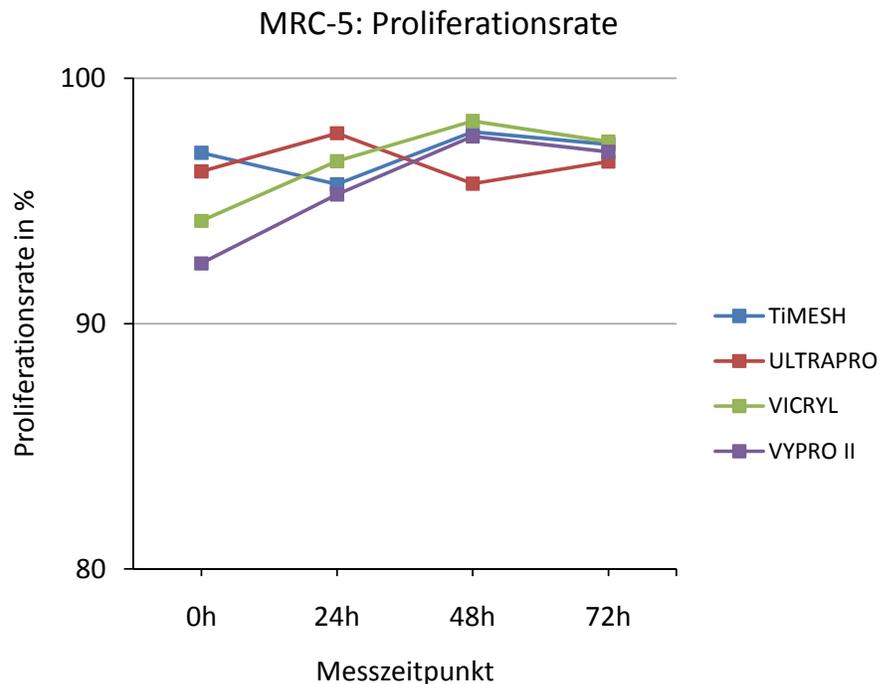


Diagramm 20. Vergleichende Darstellung der netzspezifischen Proliferationsindizes der MRC-5-Zellen (Mittelwerte).

### 3.3 Rasterelektronenmikroskopie

In vorangegangenen Versuchen (Broll et al., 2002; Bethge 2004; Friedrich et al., 2010) konnte bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, dass es nach 72 h Inkubation von schwergewichtigen, nichtresorbierbaren Herniennetzen aus Polypropylen mit MRC-5- Zellen zu oberflächlichen Beschädigungen der Filamentstruktur kam. Die Veränderungen traten als schwarze Punkte, Ausziehungen, sowie Rissen und Spalten unterschiedlicher Tiefe und Ausprägung in Erscheinung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun Herniennetze aus unterschiedlichen Materialien und von unterschiedlichen Herstellern untersucht. Neben der genauen Struktur der Netze war es von Interesse, ob sich auch in diesem Fall morphologische Veränderungen dokumentieren lassen, die möglicherweise auf den Einfluss der Zellkulturen zurückzuführen sind. Dazu wurden die Netze wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben aufbereitet und dann jeweils in nativem Zustand und nach der 72 h-Inkubation mit MRC-5-Zellen und Nährmedium per Rasterelektronenmikroskop untersucht.

#### 3.3.1 *TiMESH extralight<sup>®</sup> nativ*

Die Übersichtsaufnahme des nativen Netzes (Abb. 2a) lässt die monofilamentäre Webstruktur des titanbeschichteten Polypropylennetzes *TiMESH extralight<sup>®</sup>* gut erkennen. Die Oberfläche des Netzes erscheint intakt und glatt und es lassen sich bei dieser Vergrößerung keine Auffälligkeiten finden. Die Maschengröße ist regelmäßig und es zeigte sich keinerlei Verformung. Im Detailausschnitt (Abb. 2b) kann man nun aber in einigen Bereichen des Fadenverlaufs wellige Unebenheiten und Rillen erahnen. Besonders an den Stauchungspunkten der Verknüpfungsstellen, wo es zu einer größeren Krafteinwirkung auf den Faden kommt, zeigen sich nun bei starker Vergrößerung (Abb. 2c und 2d) bis zu 40 µm messende Risse im Längsverlauf des Fadens als auch quer dazu. In einigen Bereichen der Knoten scheinen die nur 30 nm dünnen Titanschichten, welche eigentlich fest mit dem Polypropylenfaden verbunden sein sollen, in größerem Maße regelrecht abzublatern.

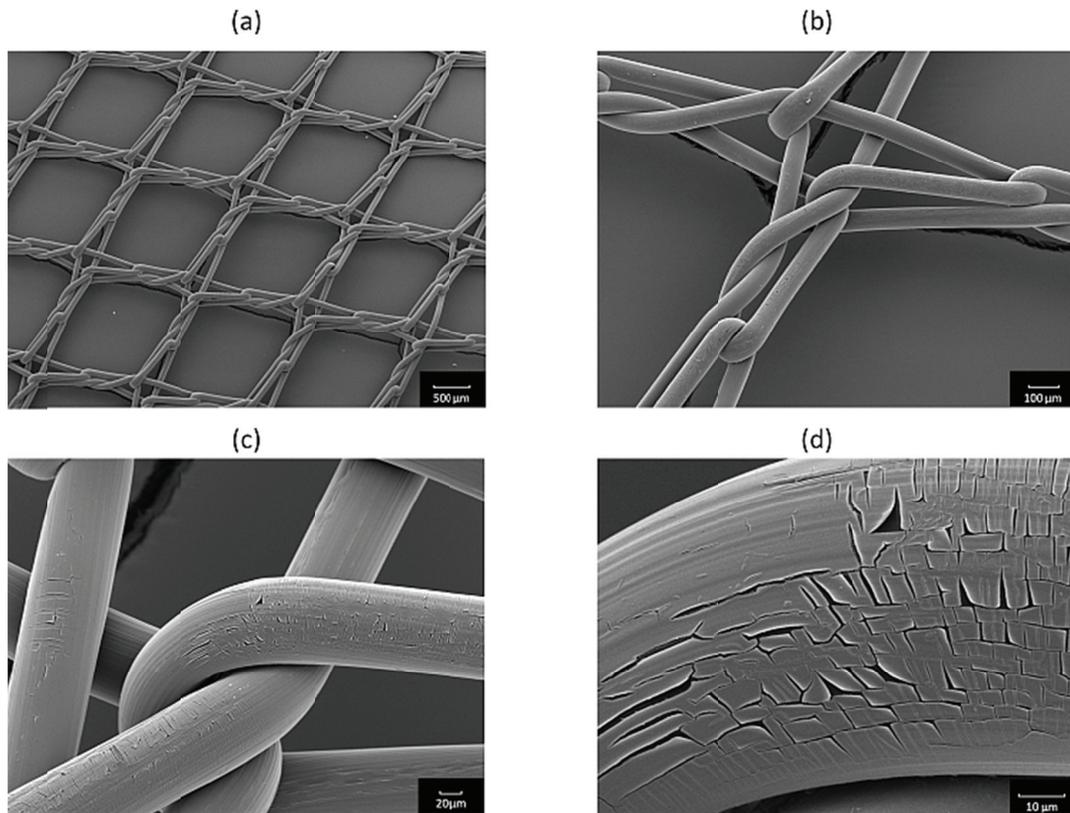


Abbildung 2. Elektronenmikroskopische Darstellung des leichtgewichtigen, titanisierten Polypropylenetzes TiMESH extralight® ohne Kontakt zur MRC-5-Zellen und Medium. a) 20fache Vergrößerung. b) 81fache Vergrößerung. c) 312fache Vergrößerung. d) 1.250fache Vergrößerung.

### 3.3.2 TiMESH extralight® nach Inkubation mit MRC-5-Zellen

Die vier REM-Aufnahmen in Abbildung 3 zeigen im Folgenden das leichtgewichtige TiMESH extralight®-Netz mit einer Maschengröße von mehr als 1 mm nach 72 h Inkubation mit MRC-5-Zellen und dem entsprechenden Kulturmedium. In der Übersichtsaufnahme (Abb. 3a) zeigt sich die gleiche Morphologie wie beim nativen Netz ohne sicheren Hinweis auf eine Schrumpfung oder Verformung. Auffällig ist jedoch schon hier eine gewisse Unruhe der Fadenoberfläche, sowie Beläge in den längsverlaufenden Kontaktzonen des Fadens. In Abbildung 3b fällt eine Unebenheit des Fadens, sowie eine schollige Grundstruktur auf, die die ehemals glatte Oberfläche des Fadens ersetzt hat. Im Bildausschnitt (Abb. 3c) fallen in der Kontaktfläche zweier Fäden kristalline Gebilde auf, die vermutlich getrockneten Rückständen des Kulturmediums entsprechen. Deutlich werden hier die gitterartigen Defektzonen mit der Ablösung der Titanbeschichtung. Bei maximaler Vergrößerung zeigen sich in Abb. 3d noch einmal die Risse und Abblätterungen, sowohl im Längsverlauf der Filamente als auch quer dazu.

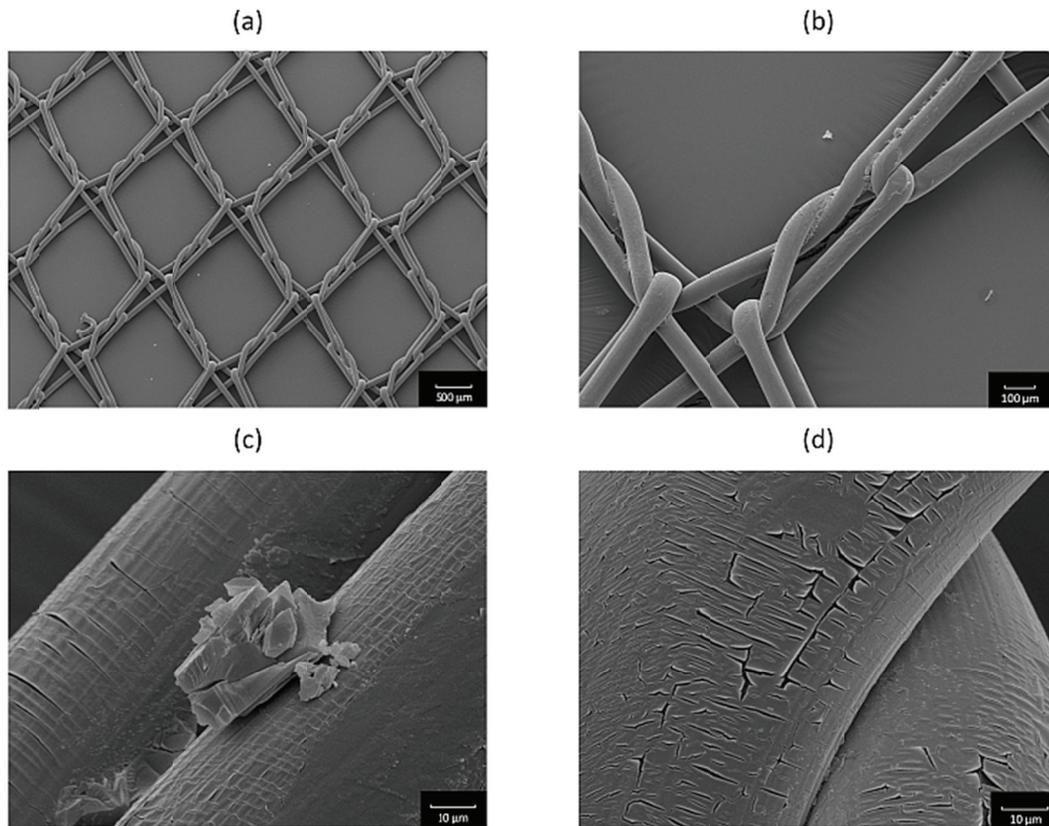


Abbildung 3. Elektronenmikroskopische Darstellung des leichtgewichtigen, titanisierten Polypropylenetz TiMESH extralight<sup>®</sup> nach Inkubation mit MRC-5-Zellen und Kulturmedium. a) 20fache Vergrößerung. b) 81fache Vergrößerung. c) 1.250fache Vergrößerung. d) 1.250fache Vergrößerung.

### 3.3.3 ULTRAPRO<sup>®</sup> *nativ*

Das Übersichtsbild (Abb. 4a) zeigt das native Hybridnetz ULTRAPRO<sup>®</sup>, welches zu gleichen Teilen aus nichtresorbierbarem Polypropylen, sowie dem resorbierbarem Poliglecapron besteht. Die aufwendige Flechtstruktur des monofilen Netzes ist gut zu erkennen. Die Maschen zeigen sich in ihrer Anordnung regelmäßig ohne Hinweis auf Verformung. In Abbildung 4b sieht man die typische Rillenstruktur in der Längsachse der Filamente bei ansonsten glatter Oberfläche. Nur im Stauchungsbereich des Umschlagpunktes wirkt die Oberfläche wellig und unregelmäßig. Bei 312facher Vergrößerung kommen in der Detailansicht (Abb. 4c) kleinvolumige Ausziehungen der ansonsten glatten Oberfläche des Filaments zum Vorschein. Des Weiteren fallen längsverlaufende Inhomogenitäten im Bereich der Fadenkurvatur auf. Bei maximaler Vergrößerung werden in Abbildung 4d nun auch kleine, längsverlaufende Risse sichtbar.

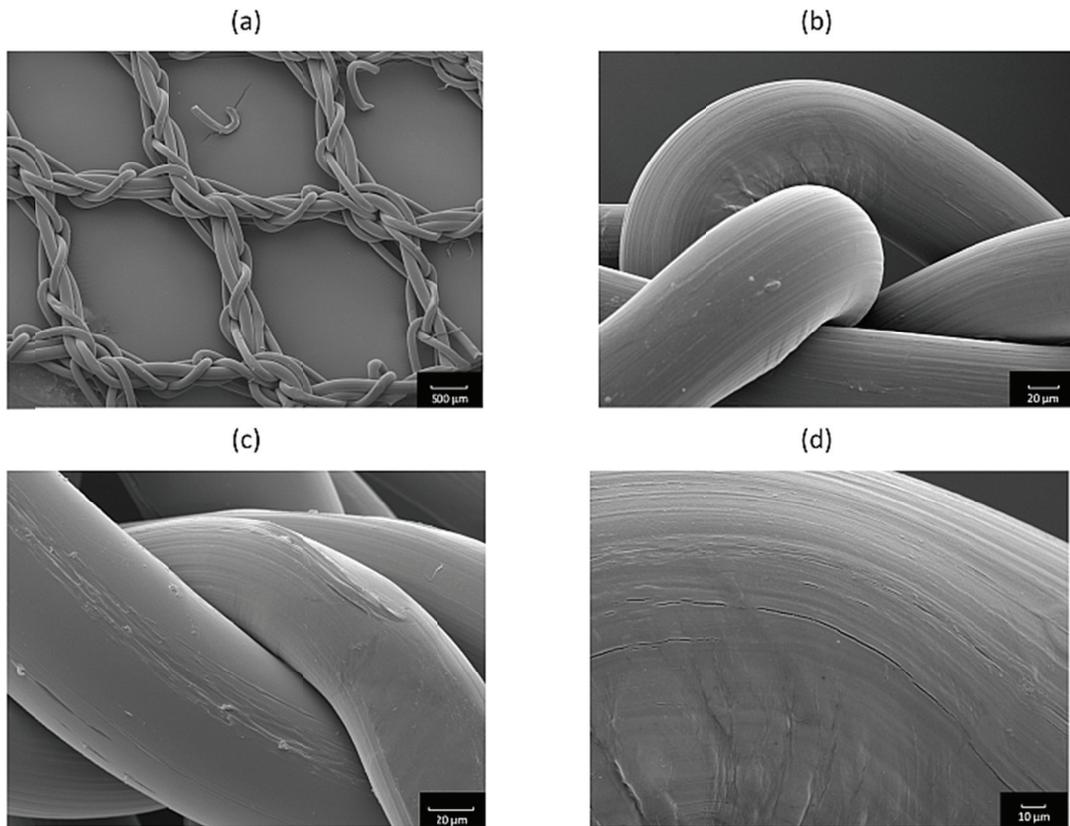


Abbildung 4. Elektronenmikroskopische Darstellung des Hybridnetzes ULTRAPRO<sup>®</sup> ohne Kontakt zur MRC-5-Zellen und Medium. a) 20fache Vergrößerung. b) 312fache Vergrößerung. c) 312fache Vergrößerung. d) 1.250fache Vergrößerung.

### 3.3.4 ULTRAPRO<sup>®</sup> nach Inkubation mit MRC-5-Zellen

Auch nach Inkubation mit MRC-5-Zellen über einen Zeitraum von 72 h kam es zu keiner sichtbaren Verformung der Netzstruktur (Abb. 5a). Die Flechtstruktur zeigt sich im Vergleich zu den Aufnahmen des nativen Netzes unverändert und die Maschenanordnung einheitlich. Bei stärkerer Vergrößerung zeigt Abbildung 5b erneut angelagerte Kristalle im Sinne von Mediumrückständen. Auffällig sind jedoch auch schon hier Diskontinuitäten der Rillenstruktur im Längsverlauf der Filamente. In der Detailaufnahme der Abbildung 5c werden längsverlaufende, zipfelartige Ausziehungen außerhalb der Stauchungszonen sichtbar, welche die ansonsten glatte Oberfläche des Filaments unterbrechen. In der maximalen Vergrößerung zeigen sich dann in Abbildung 5d feine, rillenartige Rupturen an der Oberfläche, vor allem im konvexen Bereich der Dehnungszone.

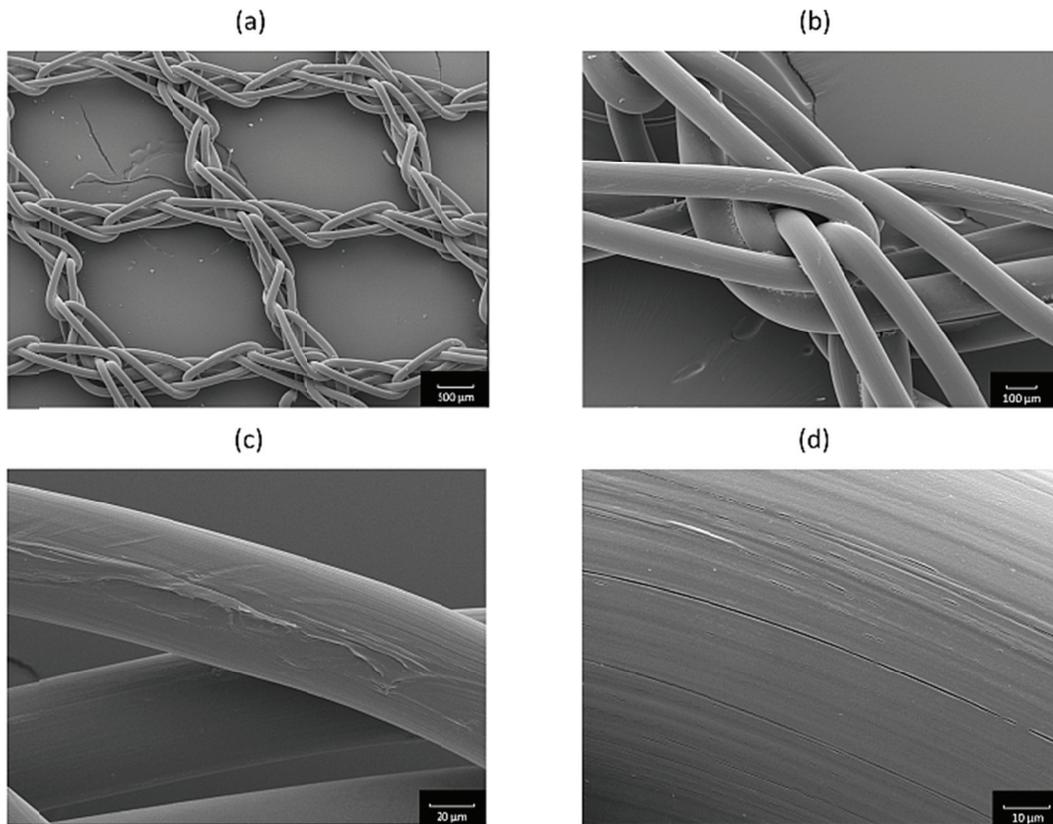


Abbildung 5. Elektronenmikroskopische Darstellung des Hybridnetzes ULTRAPRO<sup>®</sup> nach Inkubation mit MRC-5-Zellen und Medium. a) 20fache Vergrößerung. b) 81fache Vergrößerung. c) 312fache Vergrößerung. d) 1.250fache Vergrößerung.

### 3.5 Massenspektrometrische Analyse der Lyophilisate

Zur Klärung der Frage, ob der in den Versuchen nachgewiesene Einfluss auf die MRC-5- und HeLa-Zellkulturen direkt auf die Netze zurückzuführen ist oder ob möglicherweise eine lösliche Substanz der Materialien dafür verantwortlich sein könnte, wurde mit Hilfe der Lyophilisation ein in Aqua dest. konzentriertes Extrakt der löslichen Bestandteile der Netze hergestellt. Diese wurden wie unter 2.7.1 beschrieben angefertigt und dann einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. In seiner Dissertationsarbeit gelang es Bethge (Bethge, 2004) nachzuweisen, dass der Vorgang der Resterilisation von schwergewichtigen Polypropylenetzen im Dampfautoklaven bei 121 °C zum Auslösen von polymeren Moleküle führt. Diese befinden sich im Massenbereich von 500 m/z bis 800 m/z und besitzen eine sich wiederholenden Massendifferenz von 44 amu (Abb. 6).

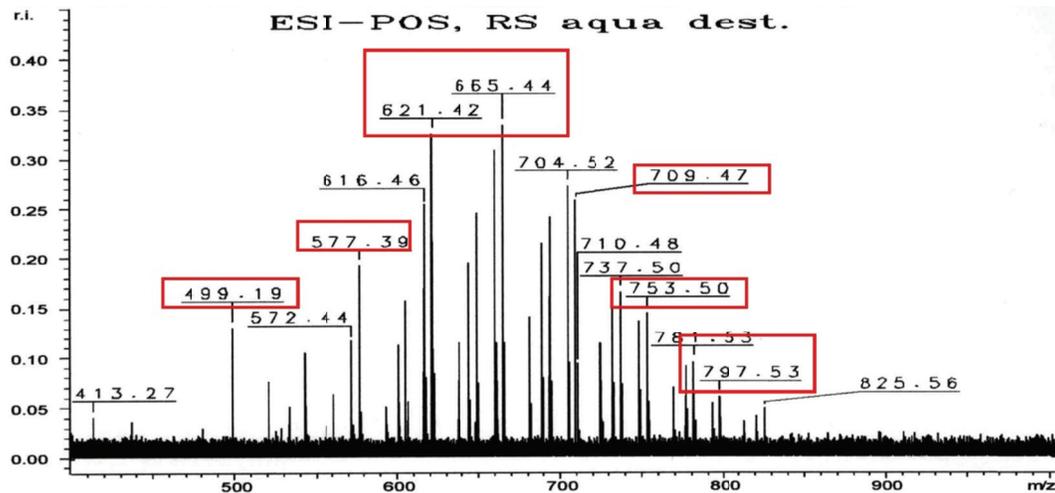


Abbildung 6. Massenspektrum der Lyophilisate von löslichen Bestandteilen eines resterilisierten Polypropylennetzes (Prolene® Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Rot eingrahmt: Polymere steigendem Molekulargewicht von 44 amu (aus Bethge, 2004, Abb. 23).

In weiteren Versuchen konnte dann gezeigt werden, dass diese Lyophilisate einen negativen Einfluss auf die Proliferationsrate von MRC-5-Zellen hatten und es zu einem Anstieg der Apoptoserate kam, wenn man die Zellkulturen mit diesen Polymeren inkubierte. Zwar verbieten heute alle Hersteller der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Herniennetze laut Packungsbeilage eine Resterilisation. Da diese Netze jedoch primär von den Herstellern mit Ethylenoxid sterilisiert werden, sollte überprüft werden, ob sich möglicherweise auch bei diesem Vorgang polymere Moleküle aus den Materialien herausgelöst haben, die per Massenspektrometrie nachzuweisen wären.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der löslichen Bestandteile der untersuchten Netze. Die Kontrollgruppe (Abb. 7), bei der die Untersuchung nur mit Aqua dest. durchgeführt wurde, zeigt mehrere Molekülonen, die als Verunreinigungen in der Spraylösung oder als Reste der verwendeten Eichstandards erkannt wurden. Ähnliche Massenpeaks wurden auch in Teilen der Netz-Lyophilisate nachgewiesen (Abb. 8-11). Insgesamt zeigen sich für die jeweiligen Netze jedoch sehr unterschiedliche Lyophilisate, was auch auf die zum Teil resorbierbaren Anteile der Netze zurückzuführen ist. Ein Nachweis der polymeren Moleküle gelang bei keinem der untersuchten Netze.

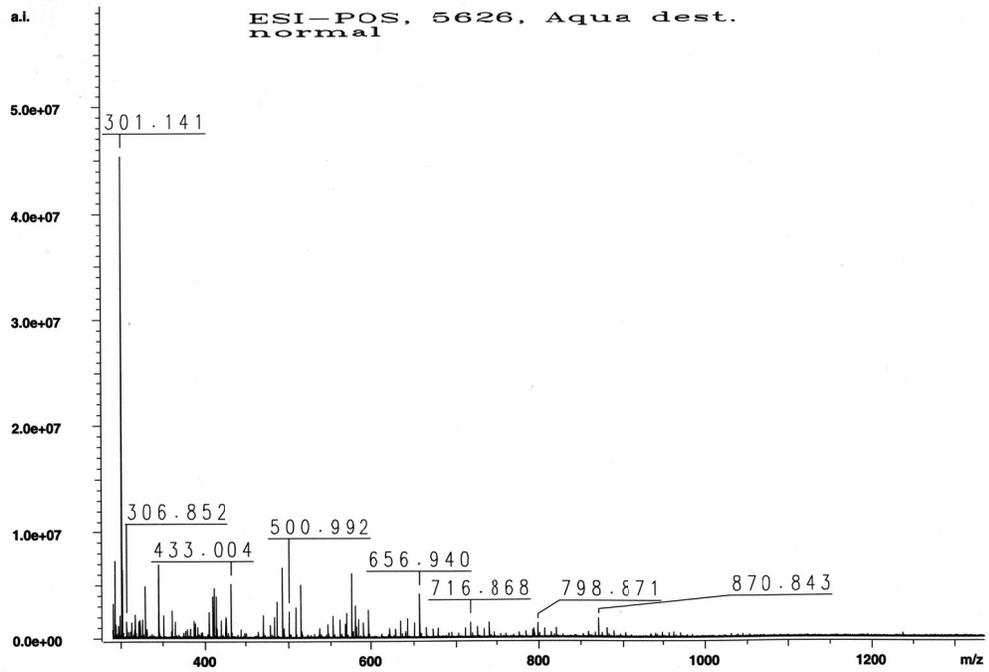


Abbildung 7. Massenspektrum der Lyophilisate der Kontrollgruppe nur mit Aqua dest.

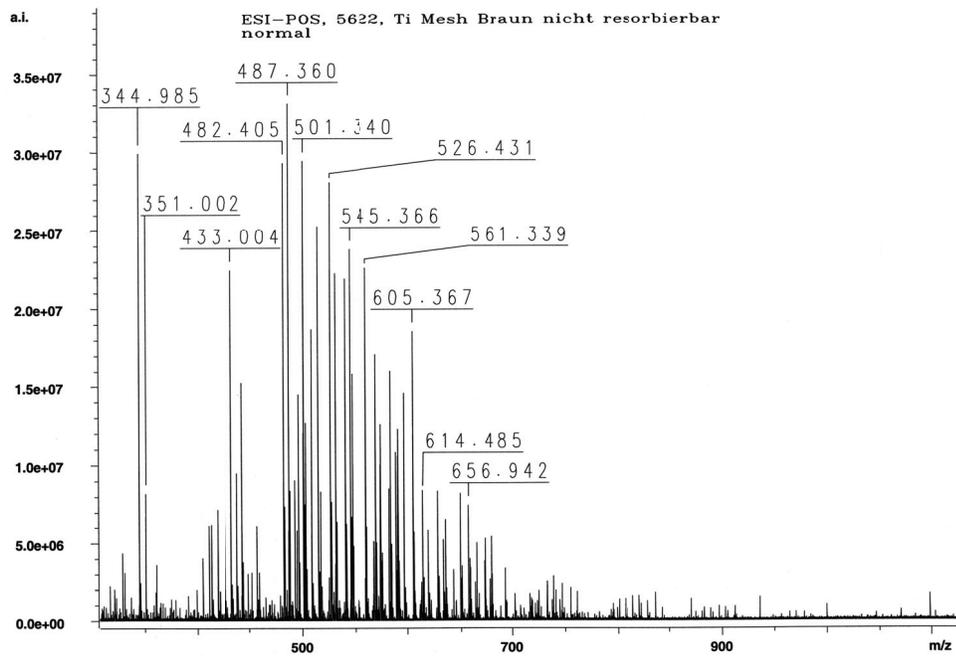


Abbildung 8. Massenspektrum der Lyophilisate des TiMESH extralight®- Netzes.

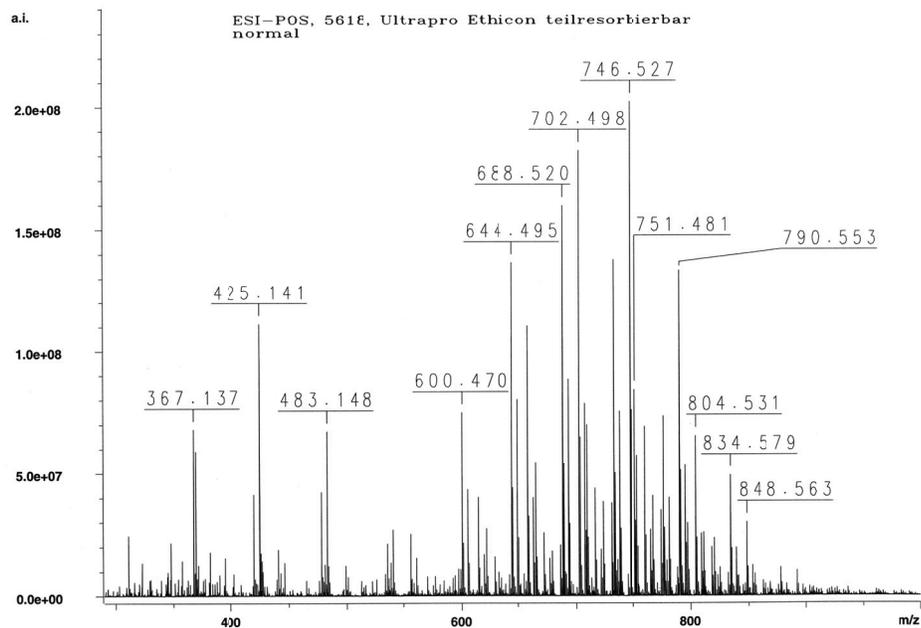


Abbildung 9. Massenspektrum der Lyophilisate des ULTRAPRO®-Netzes.

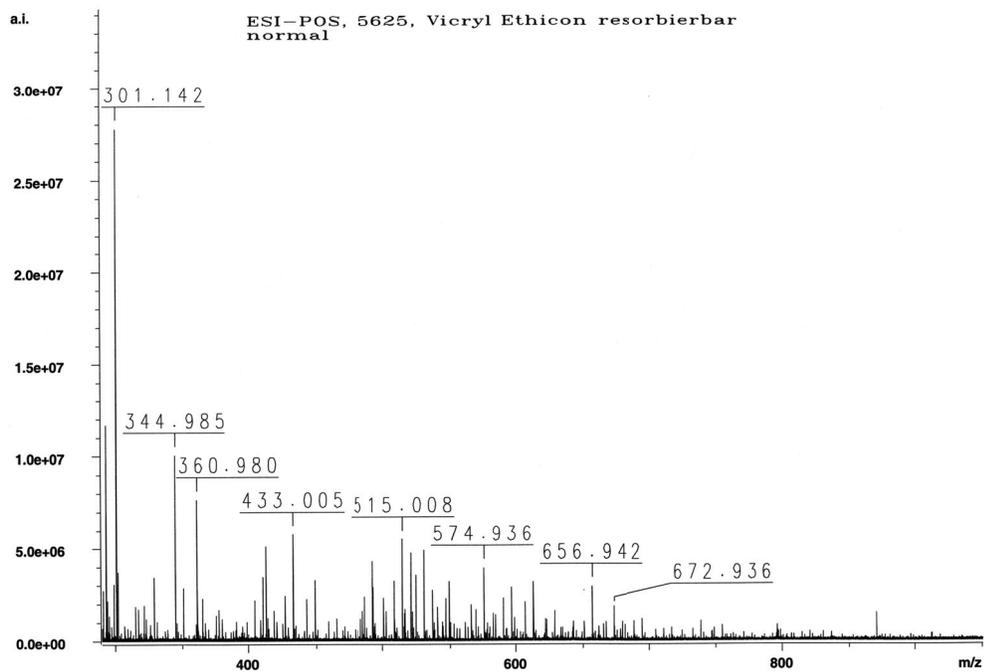


Abbildung 10. Massenspektrum der Lyophilisate des VICRYL®-Netzes.

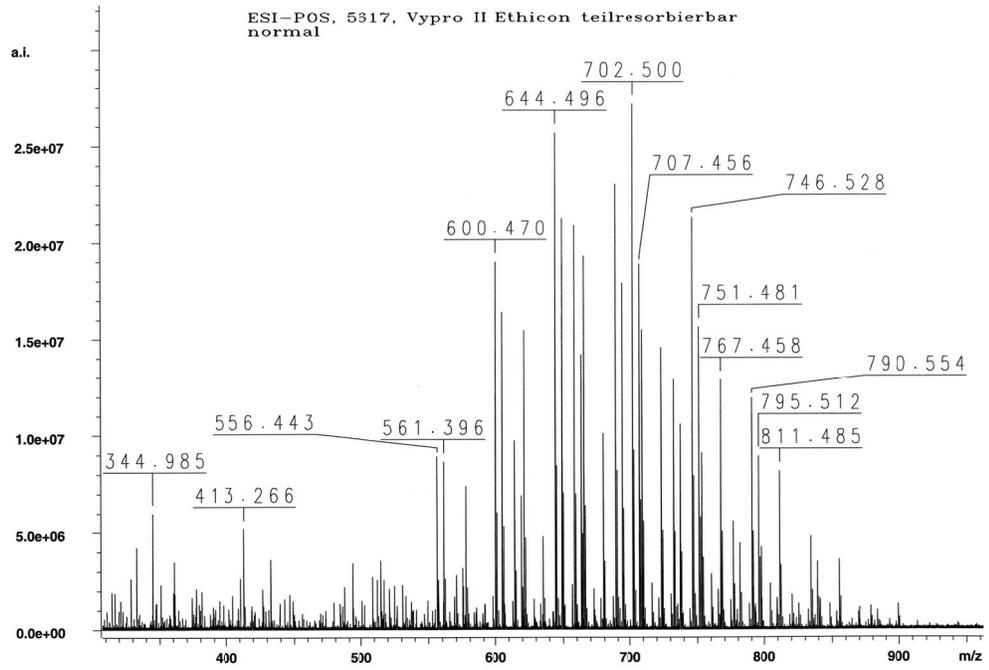


Abbildung 11. Massenspektrum der Lyophilisate des VYPRO<sup>®</sup> II-Netzes.

## **4 Diskussion**

Das Problem der eingeschränkten Biokompatibilität von Herniennetzen hat die Industrie erkannt und inzwischen sind die klassischen schwergewichtigen und kleinporigen Herniennetze durch leichtgewichtige, großporige Netze, sowie Komposite-Netze ergänzt und teilweise sogar ersetzt worden. Auch eine Beschichtung aus Titan, wie im Fall des TiMESH extralight®-Netzes, soll laut Hersteller die Biokompatibilität des Polypropylennetzes verbessern. Dies zeigte sich bereits in einer in vivo-Studie an Schweinen. Dort war ein deutlich geringeres Ausmaß an chronischen Entzündungsreaktionen im Vergleich zu normalen Polypropylennetzen nachgewiesen worden (Scheidbach et al., 2004).

Inzwischen wird eine Vielzahl von verschiedenen Netzen aus unterschiedlichen Materialien verwendet, die mit Hilfe diverser Methoden und Techniken implantiert werden (Korenkov et al., 2002). Von großer klinischer Bedeutung ist die Reaktion des umliegenden Gewebes auf das implantierte, alloplastische Material. Während zahlreiche Untersuchungen über diese Fremdkörperreaktion vorliegen (Klinge et al., 1998; Klinge et al., 1999; Klosterhalfen et al., 1997; Klosterhalfen et al., 1998; Schumpelick et al., 1999), gibt es nur wenige Untersuchungen über die zelluläre Reaktion, insbesondere auf molekularer Ebene. Da in der Hernienchirurgie bis heute keine allgemeingültigen, evidenzbasierten Standards für die Wahl des Netzmaterials oder die Implantationstechnik bestehen, fällt es schwer, die existierenden Studien zu vergleichen und eine Aussage über die Verträglichkeit der Netze zu treffen. Umso mehr besteht die Notwendigkeit, eingehende Untersuchungen an den verschiedenen Netzen vorzunehmen.

### **4.1 Das in vitro-Modell**

Trotz einer kontinuierlichen Weiterentwicklung der alloplastischen Materialien hat die Gewebeunverträglichkeit von Herniennetzen weiterhin Bestand, auch wenn die Ergebnisse von in vivo-Versuchen an Tieren gezeigt haben, dass die Fremdkörperreaktion bei leichtgewichtigen Hybridnetzen weniger ausgeprägt ist als bei einem schwergewichtigen Polypropylennetz (Junge et al., 2002).

Die stattgefunden Reduktion der Materialmenge und die Vergrößerung der Netzporen führte außerdem zu einer weniger starken Narbenbildung im Implantatlager, was wiederum eine deutliche Abnahme der postoperativen Nebenwirkungen nach sich zog (Greca et al., 2001; Klinge et al., 2002; Schumpelick et al., 1999). Histopathologische in vitro-Untersuchungen, vor allem auf zellulärer Ebene blieben eine Seltenheit.

Bereits seit dem Jahre 2002 wurde im chirurgischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Broll mit einem in vitro-Modell gearbeitet, welches es zuließ, das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Zelllinien zu untersuchen, die mit alloplastischem Material inkubiert wurden. Nach durchflusszytometrischer Bestimmung zeigte sich in diesen Arbeiten eine nahezu unveränderte Proliferationsrate der Zellen. Im Gegensatz dazu konnte aber im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Netz eine deutlich erhöhte Apoptoserate der Zellen nachgewiesen werden (Duchrow et al., 2002).

In weiteren in vitro-Versuchen gelang es außerdem nachzuweisen, dass eine erhöhte Apoptoserate auftrat, wenn das verwendete Prolene®-Netz nach den damaligen Angaben des Herstellers vor der Inkubation resterilisiert wurde (Broll et al., 2002). In Folgeuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch Polypropylenetze anderer Hersteller einen ähnlichen Einfluss auf die Apoptoserate der verwendeten Zelllinien hatten (Friedrich, 2009).

Da keine Standards für diese Art von in vitro-Versuchen bestehen, wurden für die Untersuchungen in dieser Arbeit Inkubationszeiten von 24 h, 48 h und 72 h gewählt. Dies ermöglichte eine systematische Beobachtung des initialen Wachstumsverhaltens und lieferte zeitnahe Ergebnisse. Auch wenn sich mit diesem Versuchsaufbau nur beschränkt Aussagen über Langzeitverläufe treffen lassen, ermöglicht er jedoch genaue Aussagen über das Verhalten einer reinen Zelllinie und lässt Rückschlüsse über die Toxizität des zu untersuchenden Werkstoffs zu. Ein Nachteil ist jedoch, dass die Komplexität der in vivo ablaufenden Prozesse nicht abgebildet werden kann, womit die Ergebnisse nur bedingt übertragbar sind. Die exakte Interaktion des Gewebes wird nicht erfasst und auch mechanische Komponenten können nicht untersucht werden. Dennoch ist die Prüfung der Gewebeverträglichkeit von Biomaterialien mit geeigneten Zellkulturen in vitro eine anerkannte Methode, insbesondere da die experimentellen Bedingungen sehr gut standardisierbar sind (Pizzoferrato et al., 1985).

Verwendet wurden MRC-5-Zellen, da Fibroblasten in vivo im Rahmen des Heilungsprozesses durch die perifilamentäre Fibrosierung von Herniennetzen postoperativ eine entscheidende Rolle spielen (Klinge et al., 1999). Sie synthetisieren neben den Kollagenen eine Reihe relevanter Wachstumsfaktoren und sind unter anderem für den Aufbau und die Modulation der extrazellulären Matrix verantwortlich (Singer et al., 1999). Um eine prinzipielle Vergleichbarkeit mit früheren Versuchen (Duchrow et al., 2002; Bethge, 2004; Friedrich et al., 2010) zu gewährleisten, wurden auch in dieser Arbeit die

gleichen Zellen verwendet. Ergänzend dazu wurden auch die Reaktionen von HeLa-Zellen untersucht, da das Verhalten von bereits entarteten Zellen insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Tumorinduktion durch alloplastische Materialien von Interesse ist (Hermanns et al., 2004). Durch die Versuche mit diesen Zellen können zwar grundsätzlich Aussagen über das Wachstumsverhalten von isolierten, malignen Zellen gemacht werden, dennoch ist bei der Interpretation der Ergebnisse im Falle der HeLa-Zellen der Gendefekt des p53-Suppressorgens zu berücksichtigen. Prinzipiell ist das spezifische Wachstumsverhalten einer Vielzahl von Zellen mit diesem Versuchsaufbau zu untersuchen. So konnte z.B. durch den Wechsel der entsprechenden Nährmedien der Einfluss von schwergewichtigen Polypropylnetzen auf humane Monozyten untersucht werden (Gehrts, 2006).

Die Bestimmung der Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch durchgeführt. Diese Methode hat sich bei der Bestimmung der Apoptoserate mit Hilfe von Annexin V als ein Standard etabliert, da sie im Vergleich zu anderen Verfahren schnelle und quantitative Messungen ermöglicht. Zudem ist der Zeitaufwand relativ gering, da hier die zeitaufwendige Fixierung der zu untersuchenden Zellen entfällt. Eine Untersuchung der Zellen ist nach der entsprechenden Vorbereitung also im direkten Anschluss an den Versuch möglich und verringert so die Anzahl von Fehlerquellen. Die einfache Handhabung und die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind weitere Vorteile der Durchflusszytometrie (Schwartz et al., 1986; Darzynkiewicz et al., 1997). Ein Nachteil ist jedoch das Fehlen von dauerhaften Gewebeschnitten. Eine Dokumentation findet also nur durch die Histogramme der Messreihen bzw. durch die Daten der Detektion statt.

Die TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) kam als Alternativmethode nicht in Betracht, da bei dieser Methode nur die fragmentierte DNA nachgewiesen wird. Eine Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zelluntergängen wäre in diesem Versuchsaufbau mit dieser Methode also nur bedingt möglich gewesen (Grasl-Kraupp et al., 1995). Im Gegensatz dazu bietet die Färbung mit Annexin V die Möglichkeit, Zellen nachzuweisen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden (Vermees et al., 1995). Aus diesem Grund wurde ein Inkubationszeitraum von 24 h, 48 h und 72 h gewählt. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Zeiträume war die Tatsache, dass es mit der Annexin V-Färbung möglich ist, apoptotische von nekrotischen Zellen innerhalb einer Population sowohl qualitativ oder quantitativ zu differenzieren. Im Gegensatz zur Apoptosebestimmung mittels Annexin V besteht bei der Aufbereitung der Zellkulturen für die durchflusszytometrische Messung der

Zellproliferation durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 die Notwendigkeit, eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen vorzunehmen, da die Antikörper in das Zellinnere gelangen müssen, um dort an die entsprechenden Antigene binden zu können. Um dies zu erreichen existieren verschiedene Methoden (z.B. Fixierung mit Methanol oder Aceton), die sich jedoch nicht bei jeder beliebigen Zelllinie anwenden lassen. Am ehesten wird die hier angewandte Fixierung und Permeabilisierung mittels 1 %iger Paraformaldehydlösung empfohlen, da dies nahezu keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat (Endl et al., 2001).

## **4.2 Einfluss der Netze auf die MRC-5-Zellen**

### *4.2.1 MRC-5: Proliferation*

Die Messwerte der einzelnen Netz- und Kontrollgruppe lagen bei den vier untersuchten Netzen meist dicht beieinander. Trotzdem zeigten die einzelnen Ergebnisse einige Auffälligkeiten.

Beim TiMESH extralight<sup>®</sup>-Netz zeigte sich unter beiden Bedingungen ein ähnlicher Kurvenverlauf. Am Ende der Messreihe war die Proliferation in der Netzgruppe aber knapp 2 % höher als in der Kontrollgruppe. Für diese Messung zeigte sich jedoch keine statistische Signifikanz. Ob diese Erhöhung des Proliferationsindex in vivo also zu einer vermehrten Narbenbildung im Bereich des Implantationsgebietes führen würde oder nur ein schnelleres Einwachsen des Netzes zur Folge hätte, konnte durch diesen in vitro-Versuch nicht ausreichend beantwortet werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit einem schwergewichtigen PP-Netz zeigte sich aber kein Rückgang des Proliferationsindex, was bedeuten könnte, dass Materialreduktion und Titanbeschichtung dazu führten, die Biokompatibilität zu verbessern. Dies deckt sich auch mit Ergebnissen einer Studie, die gezeigt hat, dass eine Titanbeschichtung bei einem schwergewichtigen PP-Netz zu einer Verringerung der chronischen Entzündungsreaktion führt (Scheidbach et al., 2004).

Beim Hybridnetz ULTRAPRO<sup>®</sup> zeigten die Messungen im zeitlichen Verlauf insgesamt nur eine Schwankung von ca. 4 %. Die Ergebnisse von Netz- und Kontrollgruppe wiesen dabei nur wenige Differenzen auf. Am Ende des Versuches zeigten sich für die Proliferation in beiden Gruppen nahezu identische Werte. Insgesamt lag nach 72 h der Wert weniger als 1 % über dem Ausgangswert. Das Wachstum der MRC-5-Zellen wurde also weder positiv noch negativ beeinflusst, was für eine gute Biokompatibilität spricht.

Bei dem teilresorbierbaren Kompositenetz VYPRO<sup>®</sup> II sowie dem vollständig resorbierbaren VICRYL<sup>®</sup>-Netz kam es bis zur 72 h-Messung in der Netzgruppe zu einer Steigerung des Proliferationsindex. Bei VICRYL<sup>®</sup> lag er mehr als 3 % über dem Ausgangswert, bei VYPRO<sup>®</sup> II war er fast 5 % höher. Gleiches galt jedoch auch für die entsprechende Negativkontrolle, sodass dieser Effekt in diesem Zeitintervall nicht der Anwesenheit des Netzes zugeschrieben werden konnte. Das vollständig resorbierbare Polyglactin zeigte in diesem in vitro-Versuch also keinen positiven Effekt auf die Proliferation. Die Ergebnisse einer anderen in vitro-Studie konnten damit nicht bestätigt werden. Dort hatte das Polyglactin die Proliferation von humanen Fibroblasten signifikant begünstigt (Langer et al., 2005)

Beim Vergleich der netzspezifischen Ergebnisse fiel auf, dass die unterschiedlichen Materialien einen ganz ähnlichen Verlauf der Kurven aufwiesen. Nur im Falle von TiMESH extralight<sup>®</sup> kam es nach 24 h zu einem leichten Rückgang des Proliferationsindex im Vergleich zu den drei anderen Netzen. Dieses Phänomen könnte jedoch auch durch die intermittierend aufgetretene, natürliche Kontaktinhibition der Zellen zu erklären sein.

Festzuhalten bleibt, dass sich nach 72 h bei keinem der Netze ein signifikanter Rückgang der Proliferationsrate nachweisen ließ. Hiermit zeigten sich andere Ergebnisse, als bei Untersuchungen mit dem schwergewichtigen Polypropylnetz Prolene<sup>®</sup>. Dort war ein Rückgang der Proliferation um bis zu 4 % nachgewiesen worden (Duchrow et al., 2002).

Es wird deutlich, dass das Wachstumsverhalten der Fibroblastenkultur durch die inkubierten Netze im Wesentlichen unbeeinflusst blieb. Ein Grund dafür könnte sicherlich die strukturelle Weiterentwicklung der Netze sein, denn im Vergleich zu den klassischen Polypropylnetzen, hat insgesamt eine deutliche Materialreduktion stattgefunden und durch die Kombination mit resorbierbaren Materialien konnte der Anteil von Polypropylen weiter verringert werden.

#### *4.2.2 MRC-5: Apoptose*

Das Apoptoseverhalten von MRC-5-Zellen, die mit unterschiedlichen Herniennetzen über 72 h inkubiert wurden, ist untereinander durchaus vergleichbar. Bei allen Versuchen zeigte sich im Vergleich zu den Negativkontrollen eine Erhöhung der Apoptoserate. Im zeitlichen Verlauf blieb die Rate nicht konstant, sondern stieg mit der Dauer der Inkubation an. Dadurch wird deutlich, dass die Dauer der Inkubation die eigentliche apoptotische Wirkung der Netze weiter verstärkte. Zukünftige Studien müssen klären, ob das in vivo

bedeuten könnte, dass es auch nach einer langen Implantationsdauer zu schwerwiegenden Komplikationen wie Fistelbildungen oder Seromen kommt.

Vergleicht man alle netzspezifischen Messungen miteinander, so zeigte sich, dass es bei allen Versuchen zu einer Zunahme der Apoptose kam. Die Netze stellten also eine Störgröße dar, die dazu führte, dass mehr Zellen abstarben als zu Beginn der Messung. Zwar zeigten sich für die Netze VYPRO<sup>®</sup> II und VICRYL<sup>®</sup> absolut gesehen nach 72 h die höchsten Apoptosewerte, bei diesen Versuchsansätzen waren aber auch zu Beginn der Messreihe schon höhere Werte nachweisbar als bei den Netzen ULTRAPRO<sup>®</sup> und TiMESH extralight<sup>®</sup>. Diese leicht erhöhte Apoptoserate lässt sich wahrscheinlich durch die speziellen Versuchsbedingungen, denen die Fibroblasten in einer Zellkultur ausgesetzt waren erklären (u.a. Anreicherung von Stoffwechselmetaboliten, Rückgang der Nährstoffe, Zellalterung, usw.). Insgesamt war die Erhöhung der Apoptoserate jedoch geringer ausgeprägt als bei Untersuchungen mit einem schwergewichtigen PP-Netz. Dort zeigten sich nach Inkubation über 48 h Apoptoseraten von bis zu 20 % (Broll et al., 2002).

Vergleicht man die aktuellen Ergebnisse mit denen einer Studien, in welcher die Apoptoserate immunhistochemisch mittels der TUNEL-Technik in Geweben nach Langzeitimplantation von PP-Netzen bestimmt wurde, fällt auf, dass die dort nachgewiesenen Apoptoserate von bis zu 26 % nicht annähernd erreicht wurde (Klosterhafen et al., 2000). Die jetzt untersuchten Netze hatten also eine geringere apoptotische Wirkung auf humane Fibroblastenkulturen. Dies deckt sich auch mit Ergebnissen einer anderen in vitro-Studie. Nach 12-wöchiger Inkubation von humanen Fibroblasten mit verschiedenen Netzen, konnte nachgewiesen werden, dass schwergewichtige PP-Netze ein Wachstumshindernis für die Zellen darstellten bzw. sich leichtgewichtige Netze als vorteilhaft erwiesen (Langer et al., 2005).

Für das leichtgewichtige, titanisierte Polypropylen-Netz TiMESH extralight<sup>®</sup> zeigte sich nach 72 h insgesamt die geringste Apoptoserate und auch über die gesamte Inkubationsdauer die niedrigste Zunahme. Auch wenn rasterelektronenmikroskopisch vermutet werden konnte, dass schon im sterilen Zustand strukturelle Schäden in die Titanschicht vorhanden waren, so schien diese Schäden dennoch die apoptotische Wirkung des Polypropylens abzuschwächen. Diese Befunde decken sich auch mit den Ergebnissen einer in vivo-Studie, in der gezeigt werden konnte, dass titanisierte PP-Netze die geringste Entzündungsreaktion und Narbenbildung sowie Induration zur Folge haben (Scheidbach et al., 2004).

Bei den Ergebnissen der beiden Komposite-Netze ULTRAPRO<sup>®</sup> und VYPRO<sup>®</sup> II, sowie des resorbierbaren Netzes VICRYL<sup>®</sup>, sind die Zunahmen der Apoptoseraten durchaus vergleichbar, so dass im vorliegenden Modell für keine dieser Materialien ein signifikanter Vorteil erkennbar war. Im Vergleich zu schwergewichtigen PP-Netzen konnte jedoch festgestellt werden, dass bei den neueren Herniennetzen durch Strukturveränderungen, Materialwechsel und Gewichtsreduktion die apoptotische Wirkung auf Zellen verringert werden konnte.

### **4.3 Einfluss der Netze auf die HeLa-Zellen**

#### *4.3.1 HeLa: Proliferation*

Die Proliferationsindizes der HeLa-Zellen schienen von der Anwesenheit der Kunststoffnetze weitgehend unbeeinflusst zu sein. Dies verdeutlichen die eng beieinanderliegenden Werte von Netz- und Kontrollgruppe. Auffällig waren dennoch Schwankungen der Wachstumsrate im zeitlichen Verlauf. Auch wenn die Zellen durch den Gendefekt des Proteins p53 biologisch als unsterblich gelten, könnte die wiederholte Kryokonservierung einen negativen Einfluss auf die Proliferationsrate gehabt haben. Dies könnte die Schwankung erklären, die meist in Netz- und Kontrollgruppe gleichermaßen auftrat. Insbesondere bei den Versuchen mit VICRYL<sup>®</sup> und VYPRO<sup>®</sup> II fiel auf, dass der Proliferationsindex zu Beginn der Messung mehr als 10 % unter denen der beiden anderen Versuche lag. Da im zeitlichen Verlauf nach 72 h dann aber ähnlich hohe Werte gemessen wurden wie bei den beiden anderen Netzen, ist auch auf Grund der fehlenden Signifikanz von einer zufälligen Fluktuation auszugehen.

Auffällig war auch das Ergebnis der letzten Messung im Versuch mit TiMESH extralight<sup>®</sup>. In der Kontrollgruppe ohne Netz kam es zu einem starken Rückgang auf unter 90 %. Eine schlüssige Erklärung konnte dafür nicht gefunden werden. Möglicherweise hatte sich auch dort die mehrfach durchgeführte Kryokonservierung negativ auf die Zellkultur und ihre Teilungsfähigkeit ausgewirkt. Beim Vergleich der unterschiedlichen Materialien zeigten sich nach 72 h nur geringe Unterschiede. Dies bedeutet also, dass die Zellteilung der HeLa-Zellen kaum von der Anwesenheit eines nicht-, teil- oder vollständig resorbierbaren Netzes beeinflusst wurde.

#### *4.3.2 HeLa: Apoptose*

Bei allen vier Netzen zeigte sich zu Beginn der Versuche eine gut vergleichbare Basis. Die Werte der apoptotischen Zellen lagen bei der Nullmessung zwischen 3,5 % und 4,5 %. Beim titanbeschichteten Polypropylnetz TiMESH extralight<sup>®</sup> zeigte sich eine deutliche

Reaktion der Zellen in den ersten 24 h, denn dort kam es sowohl in der Netzgruppe, als auch in der Negativkontrolle zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate. Während sich der Verlauf in der Kultur ohne Netz dann mit Schwankungen zeigte, war die Rate in der Netzgruppe konstant rückläufig. Am Ende des Versuches zeigten sich bei beiden Messungen fast identische Werte, sodass dem TiMESH extralight® kein negativer Einfluss auf die Apoptoserate von HeLa-Zellen zugeschrieben werden kann.

Beim Hybridnetz ULTRAPRO® blieben die Apoptoseraten über den gesamten Zeitraum relativ konstant. Im Vergleich zur Negativkontrolle waren sie jedoch immer erhöht. Die beiden Netze VYPRO® II und VICRYL® zeigen sowohl im zeitlichen Verlauf, als auch im Vergleich zu den Negativkontrollen eine deutliche erhöhte Apoptoserate. Am Ende des Versuches hatten sich die Werte in beiden Fällen im Vergleich zu den Zellkulturen ohne Netz fast verdoppelt. Bei fast allen bekannten resorbierbaren Materialien kommt es in vivo zu einer temporären, entzündlichen Begleitreaktion (Schumpelick, 1996).

Möglicherweise bewirkten auch in diesem Fall die bei der Hydrolyse des resorbierbaren Anteils freigewordenen Stoffe die erhöhte Apoptose der HeLa-Zellen im untersuchten Zeitintervall. Bei Polyglactin, welches bei VYPRO® II und VICRYL® eingesetzt wird, war der Effekt größer als bei dem Polyglycapron des ULTRAPRO®-Netzes. Da die vollständige Hydrolyse des Polyglycapron in vivo mit 90-120 Tagen wesentlich langsamer abläuft als die des Polyglactins (56 – 70 Tage), ist der Unterschied möglicherweise auch mit einer verringerten Intensität dieses Vorganges zu erklären.

Beim Vergleich der netzspezifischen Ergebnisse fiel auf, dass die unterschiedlichen Kurvenverläufe zum Teil etwas inhomogen waren. Dennoch riefen fast alle Netze nach 72 h eine erhöhte Apoptoserate hervor. Die untersuchten Herniennetze beeinflussten das Apoptoseverhalten von transformierten Zellen ähnlich wie das von intakten menschlichen Zellen (MRC-5-Zellen). Auffällig ist jedoch, dass die Beeinflussung ausgeprägter war als bei den MRC-5-Zellen. Die transformierten Epithelzellen reagierten also empfindlicher auf die Netze, als es die mesenchymalen MRC-5-Zellen taten. Ob dies der Entartung zuzuschreiben ist oder die Zelllinie per se sensibler für Störgrößen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Ergebnisse deckten sich jedoch mit Beobachtungen von Duchrow, der in einem ähnlichen Zellmodell festgestellt hatte, dass die Apoptoserate der HeLa-Zellen nach Inkubation mit einem schwergewichtigen PP-Netz um den Faktor 11 höher war als bei MRC-5-Zellen (Duchrow et al., 2002).

#### 4.4 Rasterelektronenmikroskopie der Netze

Durch die vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung von inkubierten und sterilen Netzen sollte herausgefunden werden, ob die Inkubation mit Zellkulturen bereits über den relativ kurzen Zeitraum von 72 h eine nachweisbare Veränderung verursacht hat. Neben der genauen Struktur der Netze war es von Interesse, ob sich auch morphologische Veränderungen dokumentieren lassen, die möglicherweise auf den Einfluss der Zellkulturen zurückzuführen sind. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich an der Oberflächenstruktur von Polypropylenetzen verschiedener Hersteller nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation mit Fibroblasten zum Teil deutliche Veränderungen per Rasterelektronenmikroskopie nachweisen ließen (Broll et al., 2002; Friedrich, 2009). Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine Auswahl der durchflusszytometrisch untersuchten Netze in sterilem Zustand und nach Inkubation über 72 h per REM untersucht.

Schon bei den sterilen Netzproben zeigten sich in den Vergrößerungen diverse Auffälligkeiten. Während sich in den Übersichtsaufnahmen des titanbeschichteten Polypropylenetzes TiMESH extralight<sup>®</sup> die monofilamentäre Webstruktur gut erkennen lässt und die Oberfläche des Fadens glatt und intakt schien, zeigten sich bei stärkerer Vergrößerung bis zu 40 µm messende Risse. In einigen Bereichen schien die nur 30nm dünne Titanschicht, welche eigentlich fest mit dem Polypropylenfaden verbunden sein soll, in größerem Maße abzublattern. Nach der Inkubation mit MRC-5-Zellen und dem entsprechenden Kulturmedium zeigte sich beim TiMESH extralight<sup>®</sup> nur eine geringe Zunahme der schon im sterilen Zustand gefundenen Auffälligkeiten. Die Übersichtsaufnahmen zeigten eine gewisse Unruhe der Fadenoberfläche sowie Beläge in den längsverlaufenden Kontaktzonen. In der Vergrößerung wurde dann die Zunahme der gitterartigen Defektzonen deutlich, die zum Ablösen der Titanbeschichtung führte. Von einem intakten Verbundstoff konnte bei dem untersuchten Netz nicht mehr ausgegangen werden. Im Hinblick auf die Webstruktur zeigte sich jedoch die gleiche Morphologie wie beim nativen Netz ohne Hinweis auf eine Schrumpfung.

Bei den Aufnahmen des sterilen Hybridnetzes ULTRAPRO<sup>®</sup> ließen sich die Maschen in ihrer Anordnung regelmäßig und ohne Hinweise auf Verformung darstellen. Die monofilen Fäden zeigten die typische Rillenstruktur in der Längsachse bei ansonsten glatter Oberfläche. Nur bei starker Vergrößerung wurden längs verlaufende Risse und kleinvolumige Ausziehungen der ansonsten glatten Oberfläche sichtbar.

Auch nach der Inkubation mit MRC-5-Zellen konnte keine sichtbare Verformung der Netzstruktur nachgewiesen werden. In den Aufnahmen mit einer stärkeren Vergrößerung wurden aber Diskontinuitäten der Rillenstruktur im Längsverlauf der Filamente, sowie zipfelartige Ausziehungen außerhalb der Stauchungszonen und feine Rupturen an der Oberfläche sichtbar. Der Versuchsaufbau dieser Arbeit zeigte also, dass ein Inkubationsintervall von 72 h ausreicht, um elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderung an einem titanisierten Polypropylnetz (TiMESH extralight®), sowie einem teilresorbierbaren Hybridnetz auszulösen (ULTRAPRO®). Zu einer Netzschrumpfung war es jedoch nicht gekommen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer prospektiv-randomisierten klinischen Vergleichsstudie, wonach moderne PP-Netze bei unkomplizierter Implantation grundsätzlich nicht schrumpfen (Langer et al., 2010).

Prinzipiell zeigten sich aber ähnliche Ergebnisse wie bei einer früheren in vitro-Untersuchung (Coda et al., 2002). Dort konnte gezeigt werden, dass es nach der Inkubation von Netzen aus Polyester und Polypropylen in Aqua dest., Kochsalzlösung und Blut zu deutlichen Veränderungen der Oberflächenstruktur kam, welche elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten.

Im Vergleich zu ähnlichen Veränderungen an schwergewichtigen PP-Netzen zeigten in diesem Fall die Veränderungen zumindest einen geringeren negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Dies spricht dafür, dass durch die Weiterentwicklung der Netze eine bessere Biokompatibilität erreicht werden konnte. In Anbetracht der kurzen Inkubationsdauer sind die Veränderungen dennoch relevant. Geht man davon aus, dass die Netze bei früher Indikationsstellung und entsprechender Implantation mehrere Jahrzehnte im Körper verbleiben, sind diese Prozesse in vivo sicherlich noch wesentlich ausgeprägter und zeigen, dass bei den Hernienetzen hinsichtlich ihrer Eigenschaften weiterhin ein Bedarf an Weiterentwicklung besteht, um die Biokompatibilität zu optimieren.

#### **4.5 Massenspektrometrie**

Vorangegangene Arbeiten des chirurgischen Forschungslabors an der Lübecker Universitätsklinik untersuchten die Interaktion von reinen Polypropylnetzen mit humanen Fibroblastenkulturen (Broll et al., 2002; Duchrow et al., 2002). Es gelang nachzuweisen, dass die Resterilisation eines Prolene®-Netzes deutliche Strukturveränderungen zur Folge hatte (Bethge, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es bei einer Inkubation dieser Netze in der Zellpopulation zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation kam. Noch deutlicher war jedoch eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate um etwas mehr als das Zehnfache gegenüber der Kontrollgruppe.

Gaschromatographische Untersuchungen von Lyophilisaten nach 48 h Inkubation in Aqua dest. zeigten polymere Moleküle mit einer sich wiederholenden Massendifferenz von 44 amu in dem Molekulargewichtsbereich von ca. 500-800 g/mol. Wahrscheinlich stellten sie die Ursache für die erhöhte Apoptoserate der Fibroblasten im Zellkulturversuch dar (Bethge, 2004).

Eine Resterilisation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Herniennetze wird heute von Seiten der Hersteller untersagt. Da diese Netze jedoch primär mit Ethylenoxid sterilisiert werden, galt es zu überprüfen, ob sich möglicherweise auch bei diesem Vorgang polymere Moleküle aus den Materialien herauslösen, die per Massenspektrometrie nachzuweisen wären. Die Analyse unserer Proben wurde mittels Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie vorgenommen. Bei dieser Untersuchungsmethode liegt die Nachweisgrenze unbekannter Substanzen je nach Hersteller bei etwa  $10^{-15}$  g. Verlässliche Daten darüber lagen zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht vor.

Bei den untersuchten Herniennetzen hat im Vergleich zu den vorher untersuchten, klassischen PP-Netzen eine deutliche Gewichtsreduktion stattgefunden. Die untersuchten Netzproben lagen im Gewicht zwischen  $0,16 \text{ g/cm}^2$  (TiMESH extralight®) und  $0,75 \text{ g/cm}^2$  (VYPRO® II). Aufgrund der hohen Sensitivität der Untersuchungsmethode kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die untersuchte Materialmenge ausgereicht hätte, um einen Substanznachweis leisten zu können.

In den durchgeführten Analysen gelang bei keinem der untersuchten Netze der Nachweis von ähnlichen Molekülen. Insgesamt zeigte der Vergleich der entsprechenden Spektren untereinander keine Peaks mit auffälliger Übereinstimmung, so dass auch produktionsbedingte Additive als Ursache für die erhöhte Apoptoserate ausschieden. Der Vorgang der primären Sterilisation mittels Ethylenoxid schien folglich keine schädlichen Substanzen aus den Netzen herausgelöst zu haben, so dass im Falle dieser Zellversuche die Netze selbst als der wachstumshemmende Faktoren angesehen werden müssen.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von unterschiedlichen Herniennetzen (TiMESH extralight<sup>®</sup>, ULTRAPRO<sup>®</sup>, VICRYL<sup>®</sup>, VYPRO<sup>®</sup> II) auf humane Zellkulturen zu untersuchen. In einem in vitro-Modell wurde die Wirkung der Netze auf die Apoptoserate und den Proliferationsindex von MRC-5- und HeLa- Zellen in Intervallen von 24 h, 48 h und 72 h analysiert. Die Proliferation wurde mit Hilfe des Proliferationsantigens Ki-67 gemessen, die Apoptoserate nach Färbung der Fibroblasten und HeLa-Zellen mit Annexin V bestimmt. Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde untersucht, ob strukturelle Veränderungen der Netze durch die Inkubation stattfinden. Durch massenspektrometrische Analysen wurde geprüft, ob die vom Hersteller durchgeführte Primärsterilisation mittels Ethylenoxid möglicherweise zytotoxische Substanzen aus den Materialien herausgelöst.

Nach Inkubation über 72 h mit MRC-5-Zellen ließ sich bei keinem der Netze ein signifikanter Rückgang der Proliferationsrate nachweisen. Im Vergleich zu den Negativkontrollen zeigte sich am Ende der Versuche jedoch bei allen Netzen eine Zunahme der Apoptose in der MRC-5-Zellkultur. Insgesamt war die Erhöhung der Apoptoserate jedoch weniger ausgeprägt als bei vorangegangenen Untersuchungen mit einem schwergewichtigen PP-Netz (Duchrow et al., 2002). Im Zellversuch mit HeLa-Zellen blieben die Proliferationsindizes von den Netzen weitgehend unbeeinflusst. Die untersuchten Herniennetze beeinflussten das Apoptoseverhalten von entarteten Zellen aber ähnlich wie das von intakten menschlichen Zellen. Die Beeinflussung war jedoch ausgeprägter als bei den MRC-5-Zellen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten nach einer Inkubation über 72h sichtbare Veränderung an einem titanisierten Polypropylnetz, sowie einem teilresorbierbaren Hybridnetz. In den massenspektrometrischen Analysen konnte bei keinem der untersuchten Netze auffällige Moleküle gezeigt werden, und der Vergleich der Spektren untereinander indiziert, dass produktionsbedingte Additive als Ursache für die erhöhte Apoptoserate ausscheiden.

Mit der durchgeführten in vitro-Untersuchung war es möglich, die Wechselwirkungen zwischen Biomaterialien und Zellkulturen zu verdeutlichen und Aussagen über eine mögliche Toxizität zu treffen. Prinzipiell sind durch Modifikationen Zellen und Materialien austauschbar, so dass dieses Modell geeignet ist, eine Prüfung der Gewebeverträglichkeit von Biomaterialien unter experimentellen Bedingungen durchzuführen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams JE, Jaffe KA, Lemons JE, Siegal GP : Prosthetic implant associated sarcomas: a case report emphaizing surface evaluation and spectroscopic trace metal analysis. *Ann Diag Pathol* 7, 35-46 (2003)
- Amid PK, Shulman AG, Lichtenstein IL Surgical repair of primary or recurrent inguinal hernia by prosthesis and polypropylene plug. *Chirurgie* 118:551-558 (1992)
- Anderson JM, Miller KM: Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 5, 5-10 issn: 0142-9612 (1984)
- Avtan L, Avci C, Bulut T, Fourtanier G: Mesh infections after laparoskopig inguinal hernia repair. *Surg Laparosc Endosc* 7, 192-195 (1997)
- Barth RJ jr, Burchard KW, Tosteson A: Short-term outcome after mesh or schouldice herniorrhaphy: A randomized, prospective study. *Surgery* 123, 121-126 (1998)
- Bassini, E: Über die Behandlung des Leistenbruches. *Arch klin Chir* 40, 429-476 (1890)
- Bernatchez SF, Parks PJ, Gibbons DF: Interaction of macrophages with fibrous materials in vitro. *Biomaterials* 17, 2077-2086 (1996)
- Bhardwaj RS, Henze U, Klein B, Zwaldo- Klarwasser G, Klinge U, Mittermayer CH, Klosterhalfen B: Monocyte-biomaterial interaction inducing phenotypic dynamics of monocytes: A possible role of monocyte subsets in biocompatibility. *Journal of Material Science: Materials in medicine* 8, 737-742 (1997)
- Bittner R, Schwarz J: Inguinal hernia repair: current surgical techniques. *Langenbecks Arch Chir* 397(2) 271-282 (2012)

- Bethge T: In-vitro Untersuchungen zur Interaktion implantierbarer Kunststoffnetze aus Polypropylen mit humanen Fibroblasten. Med. Diss. (2004)
- Broll R, Bethge T, Windhövel U, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Duchrow M: Influence of resterilized polypropylene meshes on grown of human fibroblasts- an experimental in vitro study. Zentralblatt 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)
- 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 M: 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)
- Engeland van 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, 1-9 (1998)
- Friedrich M: Wechselwirkung zwischen leichtgewichtigen Herniennetzen aus Polypropylen verschiedener Hersteller und ausgesuchten humanen Zellen. Med. Diss. (2009)

- Friedrich M, Meder S, Wedel T, Fischer F, Roblick U, Habermann J, Bruch HP, Farke S: Effects of Resterilization on the Surface-Structure of Lightweight Polypropylen Hernia Meshes – An in vitro Study. Res. J. Med. Sci 4, 330-333 (2010)
- Gehrts M: In-vitro Untersuchungen zum Einfluss von Kunststoffnetzen auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von humanen Monozyten. Med. Diss. (2006)
- 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, 1710-1715 (1984)
- Grasl-Kraupp B , Ruttkay-Nedecky B, Koudelka. H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R: In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology 21, 1465-1468 (1995)
- Greca F, Paula J de, Biondo-Simones M, Costa F da, Silva a da, Time S, Mansur A: The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. Hernia 5, 59-64 (2001)
- Herrmanns B, Klinge U, Alfer J, Rosch R, Junge K, Klosterhalfen B: Pro oncogenesis and surgical meshes. Viszeralchirurgie 39, 42-47 (2004)
- Jenkins SD, Klamer TW, Parteka JJ, Condon RE: A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects. Surg 94, 392-398 (1983)
- Junge K, Klinge U, Rosch R, Klosterhalfen B, Schumpelick V: Functional and morphological properties of an modified mesh for inguinal hernia repair. World J. Surgery 26, 1472-1480 (2002)
- Klinge U, Klosterhalfen B, Müller M, Öttinger AP, Schumpelick V: Shrinking of polypropylene mesh in vivo: An experimental study in dogs. Eur J Surg 164, 965-969 (1998)

- 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)
- Klinge U, Klosterhalfen B, Birkenhauer V, Junge K, Schumpelick V: Impact of polymer pore size on the interface scar formation in a rat model. *J Surg Res* 103, 208-214 (2002)
- Klosterhalfen B, Klinge U, Henze U, Bhardwaj R, Conze J, Schumpelick V: Morphologische Korrelation der funktionellen Bauchwandmechanik nach Mesh-Implantation. *Langenbecks Arch Chir* 382, 87-94 (1997)
- Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V: Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 19, 2235-2246 (1998)
- Klosterhalfen B, Klinge U, Hermanns B, Schumpelick V: Pathologie traditioneller chirurgischer Netze zur Hernienreparation nach Langzeitimplantation im Menschen. *Chirurg* 71, 43-51 (2000)
- Korenkov M, Sauerland S, Paul A, Neugebauer E: Die deutsche Narbenhernienchirurgie im Umbruch. Ein Vergleich zweier Klinikumfragen 1995 und 2001. *Zentralbl Chir* 127, 700-705 (2002)
- Langer S, Christiansen J: Long term results after incisional hernia repair. *Acta Chir Scand* 151, 217-219 (1985)
- 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 C, Schwartz P, Krause P, Mohammadi H, Kulle B, Schaper A, Füzesi L, Becker H: Hernienchirurgie: Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten auf alloplastischen Kunststoffnetzen. *Chirurg* 76, 876-885 (2005)

- Lager C, Forster H, Konietzschke F, Raab B-W, Schaper A, Brunner E, Becker H: Netzschrumpfung in der Hernienchirurgie. *Chirurg* 81, 735-745 (2010)
- Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK: The prevention and treatment of recurrent groin hernia. *Surg Clin North Am* 73, 529 (1993)
- Lotheissen G: Zur Radikaloperation der Schenkelhernien. *Zentralbl Chir* 25, 548-550 (1898)
- McVay CB: An anatomic error in current methods of inguinal herniorrhaphy. *Ann Surg* 113, 1111-1113 (1941)
- Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP, de Lange DC, Braaksma MM, IJzermans JN, Boelhouwer RU, de Vries BC, Salu MK, Wereldsma JC, Bruijninx CM, Jeekel J: A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. *N Engl J Med* 343, 392-398 (2000)
- Pizzoferrato A, Vespucci A, Ciapetti G, Stea S: Biocompatibility testing of prosthetic implant materials by cell cultures. *Biomaterials* 6, 346-351 (1985)
- Sanchez-Bustos F, Ramia JM, Fernandez Ferrero F: Prosthetic repair of femoral hernia: audit of long term follow-up. *Eur J Surg* 164, 191-193 (1998)
- Scheidbach H, Tannapfel A, Schmidt U, Lippert H, Köckerling F: Influence of titanium coating on the biocompatibility of a heavyweight polypropylene mesh. *Eur Surg Res* 36, 313-317 (2004)
- Schumpelick V: *Hernien. 3., neu überarbeitete und erweiterte Auflage Kapitel 4 S.31* Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1996)
- Schumpelick V: *Hernien. 3., neu überarbeitete und erweiterte Auflage Kapitel 7 S.63* Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1996)

- Schumpelick V: Hernien. 3., neu überarbeitete und erweiterte Auflage Kapitel 8 S.81  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1996)
- Schumpelick V, Klosterhafen B, M. Müller, Klinge U: Minimierte Polypropylen-Netze zur präperitonealen Netzplastik (PNP) der Narbenhernie - eine prospektive randomisierte klinische Studie. Chirurg 70, 422-430 (1999)
- Schumpelick V, Klinge U, Welty G, Klosterhafen B: Meshes in der Bauchwand. Chirurg 70, 876-887 (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)
- Scott NW, McCormack K, Graham P, Go PM, Ross SJ, Grant AM: Open mesh versus non-mesh for repair of femoral and inguinal hernia. Cochrane Database Syst Rev (2002)
- Shouldice EE: Surgical treatment of hernia. Ontario Med Rev. 20, 670-684 (1953)
- Silich RC, McSherry CK: Spermatic granuloma. An uncommon complication of the tension-free hernia repair. Surg Endosc 10, 537-539 (1996)
- Singer A, Clark R: Cutaneous wound healing. N Engl J Med 341, 738-746 (1999)
- Usher FC: Further observations on the use of Marlex mesh: a new technique for the repair of inguinal hernias. Am Surg 25, 792-795 (1959)
- Usher FC: Knitted Marlex mesh. An improved Marlex prosthesis for the repairing hernias and other tissue defects. Arch Surg 82, 771-773 (1961)
- Usher FC: Hernia repair with Marlex mesh. An analysis of 541 cases. Arch Surg 84, 325-328 (1962)

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)

## 7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amu	atomic mass unit
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
°C	Grad Celsius
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleidacid
FACS	Fluoreszens-aktiviertes-Laser-Durchflusszytometer
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
g/cm <sup>2</sup>	Gramm pro Quadratcentimeter
g/m <sup>2</sup>	Gramm pro Quadratmeter
HEPES	4-(2-Hydroxymethyl)-1Piperazineethansulfonsäure
IPOM	Intraperitoneale Onlay-Mesh
kV	Kilovolt
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat
M	Mol
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
m/z	Masse pro Ladung
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
PBS	Phosphate buffered saline
PP	Polypropylen
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
PI	Propidiumjodid
pNA	Para-Nitro-Anilin
REM	Rasterelektronenmikroskop

Std.	Stunde
Stck.	Stück
Tab.	Tabelle
TAPP	Transabdominelle präperitoneale Patchplastik
TEPP	Total extraperitoneale Patchplastik
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
U/min	Umdrehung pro Minute
z.B.	zum Beispiel

## 8 Anhang

### 8.1 Einfriermedium

#### *Komplett-Medium*

10 % FKS (Gibco BRL, Berlin) und 12 % DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### *FKS (Fetales Kälberserum)*

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

#### *MRC-5-Kulturmedium*

450 ml Minimal Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 50 ml FKS, 5 ml Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5ml non-essential amino acid (alles Gibco BRL, Berlin)

#### *HeLa- Kulturmedium*

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

### 8.2 Lösungen

Die Herstellung der Lösungen erfolgte mit sterilem Aqua bidest.

#### *Phosphate buffered saline (PBS, Gibco BRL, Berlin)*

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4  
0,25 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100

50 ml Aqua bidest., 125 µl Triton<sup>®</sup>X-100 (Gibco BRL, Berlin)

#### *Paraformaldehyd-Lösung*

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

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

0,1 M HEPES, 1,4 mM NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4

#### *Propidiumjodid-Lösung (Apoptosis detection Kit I, BD Pharmingen Heidelberg)*

50 µg PI/ml PBS

### **8.3 Antikörper und Färbemethoden**

#### *Trypanblau-Färbung*

90 µl Trypanblue Solution 0,4 %, (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit jeweils 10 µl Zellsuspension

#### *Annexin V-FITC*

Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, Heidelberg)

#### *Monoclonal Mouse Anti Human Ki-67 Antigen*

(Code: F0788, Dako, Glostrup, Dänemark)

#### *Anti-Mouse Immunoglobulins/ FITC Rabbit F(ab')<sub>2</sub>*

(Code: F0313, Dako, Glostrup, Dänemark)

### **8.4 Geräte**

#### *Brutschränke*

Fa. Heraeus, Osterode

#### *Durchflusszytometer*

FACScan<sup>®</sup>, BD, Heidelberg

#### *Kritische Punkt-Trockner*

Critical point dryer E 3000, Quorum Technologies, West Sussex, Großbritannien

#### *Lyophilisator*

Christ L1/ Alpha 1, Fa. Christ, Osterode

#### *Massenspektrometer*

Tesla Apex II, Bruker-Daltonics, Billerica, USA

#### *Mikroskop*

ZEISS Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen

#### *Rasterelektronenmikroskop*

SEM 505, Philips, Eindhoven, Holland

*Sterile Werkbank*

Class II Typ A/B3, NuAire, Plymouth, USA

*Zentrifugen*

Rotana /TR, Fa. Andreas Hettich, Tuttlingen

*Zählkammer*

Typ Neubauer, Fa. Brand, Wertheim, Deutschland

*Dampfsterilisator*

Modell CS-V, Webeco, Bad Schwartau

## 8.5 Tabellen aller Einzelmesswerte der Durchflusszytometrie

### 8.5.1 HeLa: TiMESH extralight®

HeLa: TiMESH extralight® Einzelmesswerte				
Messzeitpunkt	Apoptoserate		Proliferationsrate	
	TiMESH	Kontrolle	TiMESH	Kontrolle
0 h	3,51	3,51	90,55	90,55
	1,97	1,97	91,24	91,24
	3,4	3,4	91,31	91,31
	2,21	2,21	95,66	95,66
	2,58	2,58	96,66	96,66
	3,06	3,06	96,03	96,03
	5,21	5,21	93,46	93,46
	5,16	5,16	95,39	95,39
	4,59	4,59	95,70	95,70
<i>Mittelwert</i>	3,52	3,52	94,00	94,00
<i>Standardabweichung</i>	1,22	1,22	2,39	2,39
24 h	6,39	6,87	98,15	98,31
	5,98	5,50	98,75	98,36
	7,58	5,06	98,93	98,97
	5,92	4,79	98,38	98,59
	7,55	4,68	98,43	98,55
	10,41	5,30	98,20	98,49
	5,70	4,46	98,51	98,14
	5,25	5,88	98,48	97,67
	5,80	6,54	97,78	98,23
<i>Mittelwert</i>	6,73	5,45	98,40	98,37
<i>Standardabweichung</i>	1,60	0,83	0,34	0,36
48 h	6,69	3,51	98,63	98,71
	5,73	2,93	98,66	99,10
	7,99	4,12	98,87	98,84
	4,48	2,87	98,87	99,11
	6,68	4,38	98,72	99,01
	7,80	2,40	98,61	98,17
	6,88	3,09	98,83	98,88
	3,03	3,73	98,58	98,53
	4,17	3,81	98,89	99,26
<i>Mittelwert</i>	5,94	3,43	98,74	98,85
<i>Standardabweichung</i>	1,71	0,65	0,13	0,34
72 h	4,33	6,60	97,15	96,02
	4,83	6,13	97,51	89,55
	4,75	7,94	98,27	78,34
	6,83	5,18	97,67	84,25
	7,01	3,89	96,49	94,19
	6,74	6,46	98,53	87,47
	3,80	2,75	97,47	82,78
	3,99	3,71	94,14	96,96
	4,52	2,02	94,55	91,62
<i>Mittelwert</i>	5,20	4,96	96,86	89,02
<i>Standardabweichung</i>	1,29	1,98	1,55	6,36

Tabelle 17. Rohdaten für TiMESH extralight®-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit HeLa-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

### 8.5.2 HeLa: ULTRAPRO®

HeLa: ULTRAPRO® Einzelmesswerte				
Messzeitpunkt	Apoptoserate		Proliferationsrate	
	ULTRAPRO®	Kontrolle	ULTRAPRO®	Kontrolle
0 h	3,4	3,4	95,01	95,01
	3,3	3,3	95,29	95,29
	3,19	3,19	93,88	93,88
	3,19	3,19	93,47	93,47
	3,65	3,65	95,63	95,63
	4,5	4,5	94,45	94,45
	4,94	4,94	99,68	99,68
	5,09	5,09	99,55	99,55
	4,46	4,46	98,49	98,49
	<i>Mittelwert</i>	3,97	3,97	96,16
<i>Standardabweichung</i>	0,78	0,78	2,42	2,42
24 h	4,31	2,47	94,58	95,93
	3,37	2,98	96,07	97,14
	3,82	3,1	95,21	94,12
	4,15	2,37	95,63	94,55
	3,34	2,65	95,46	96,39
	3,49	2,5	95,65	95,99
	4,09	2,24	96,7	96,77
	3,55	3,23	94,27	96,25
	3,36	3,16	94,95	95,4
	<i>Mittelwert</i>	3,72	2,74	95,39
<i>Standardabweichung</i>	0,38	0,38	0,75	0,99
48 h	3,19	2,57	96,04	98,12
	2,89	1,86	97,15	96,94
	3,9	2,33	96,46	97,87
	4,47	2,24	96,36	97,69
	3,94	2,03	95,75	97,43
	3,97	2,47	96,8	97,65
	3,59	1,96	96,81	97,63
	3,83	1,38	95,87	97,87
	3,91	2,06	96,99	97,22
	<i>Mittelwert</i>	3,74	2,10	96,47
<i>Standardabweichung</i>	0,47	0,36	0,50	0,36
72 h	4,74	2,22	98	91,53
	4,07	2,14	98,71	99,07
	5,36	2,75	98,77	94,71
	5,6	2,51	97,29	99,25
	3,47	1,88	92,73	94,44
	3,65	1,28	99,05	97,67
	5,46	2,66	99,08	98,97
	3,65	1,98	98,12	97,94
	4,33	3,38	98,7	96,14
	<i>Mittelwert</i>	4,48	2,31	97,83
<i>Standardabweichung</i>	0,84	0,60	2,00	2,64

Tabelle 18. Rohdaten für ULTRAPRO®-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit HeLa-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

### 8.5.3 HeLa: VICRYL<sup>®</sup>

HeLa: VICRYL <sup>®</sup> Einzelmesswerte				
Messzeitpunkt	Apoptoserate		Proliferationsrate	
	VICRYL <sup>®</sup>	Kontrolle	VICRYL <sup>®</sup>	Kontrolle
0 h	4,24	4,24	69,42	69,42
	4,04	4,04	83	83
	3,95	3,95	85,6	85,6
	4,84	4,84	84,06	84,06
	4,19	4,19	80,14	80,14
	4,65	4,65	78,69	78,69
	4,71	4,71	92,35	92,35
	4,29	4,29	89,27	89,27
	4,58	4,58	84,96	84,96
	<i>Mittelwert</i>	4,39	4,39	83,05
<i>Standardabweichung</i>	0,32	0,32	6,61	6,61
24 h	4,53	4,41	89,87	96,76
	5,22	4,4	95,2	95,21
	5,34	3,87	95,96	85,1
	3,94	3,48	71,8	87,92
	13,63	4,27	75,68	88,81
	3,97	3,12	69,98	88,2
	2,95	4,96	93,43	96,22
	11,67	9,78	96,52	97,57
	12,83	7,57	94,76	96,95
	<i>Mittelwert</i>	7,12	5,10	87,02
<i>Standardabweichung</i>	4,28	2,17	11,16	4,91
48 h	9,87	2,58	96,2	97,54
	6,41	4,65	96,38	79,79
	6,75	3,53	97,19	97,55
	12,4	2,95	93,29	95,52
	6,11	3,83	94,73	94,72
	4,02	3,3	95,37	82,54
	7,24	3,79	96,72	97,82
	7,37	3,6	96,46	97,96
	6,66	3,75	97,35	97,98
	<i>Mittelwert</i>	7,43	3,55	95,97
<i>Standardabweichung</i>	2,40	0,59	1,30	7,12
72 h	6	4,21	96,14	95,74
	6,81	4,51	95,52	92,72
	7,78	3,91	87,79	94,57
	7,92	5,94	94,66	96,47
	7,32	7,01	92,13	96,85
	5,31	3,85	91,51	95,61
	9,73	4,49	95,31	97,63
	9,71	4,56	97,95	97,56
	9,48	4,7	98,56	97,95
	<i>Mittelwert</i>	7,78	4,80	94,40
<i>Standardabweichung</i>	1,61	1,03	3,40	1,69

Tabelle 19. Rohdaten für VICRYL<sup>®</sup>-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit HeLa-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

### 8.5.4 HeLa: VYPRO® II

HeLa: VYPRO® II Einzelmesswerte				
Messzeitpunkt	Apoptoserate		Proliferationsrate	
	VYPRO® II	Kontrolle	VYPRO® II	Kontrolle
0 h	4,24	4.24	63.00	63.00
	4,04	4.04	82.33	82.33
	3,95	3.95	84.58	84.58
	4,84	4.84	85.59	85.59
	4,19	4.19	79.03	79.03
	4,65	4.65	87.48	87.48
	4,68	4.68	85.66	85.66
	4,45	4.45	81.84	81.84
	4,82	4.82	84.70	84.70
<i>Mittelwert</i>	<i>4,43</i>	<i>4.43</i>	<i>81.58</i>	<i>81.58</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>0,34</i>	<i>0.34</i>	<i>7.40</i>	<i>7.40</i>
24 h	1,72	1.67	95.41	95.53
	1,98	1.38	89.50	93.61
	1,69	2.81	94.86	95.35
	5,25	3.36	84.93	88.69
	4,22	3.25	92.55	88.43
	4,51	3.59	84.18	88.54
	3,81	2.55	96.12	96.18
	5,06	1.98	97.87	95.98
	5,13	2.51	96.20	95.38
<i>Mittelwert</i>	<i>3,71</i>	<i>2.57</i>	<i>92.40</i>	<i>93.08</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>1,51</i>	<i>0.77</i>	<i>5.06</i>	<i>3.47</i>
48 h	3,84	2.86	94.36	98.09
	5,19	3.11	96.70	96.82
	4,46	3.21	97.78	97.69
	4,76	4.03	92.50	96.78
	4,89	3.95	95.47	97.46
	6,41	3.43	92.82	97.26
	7,95	4.25	98.29	98.57
	6,25	4.02	98.28	97.98
	6,58	3.78	98.38	98.54
<i>Mittelwert</i>	<i>5,59</i>	<i>3.63</i>	<i>96.06</i>	<i>97.69</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>1,29</i>	<i>0.49</i>	<i>2.37</i>	<i>0.67</i>
72 h	8,73	4.13	93.9	95.42
	4,28	4.99	96.13	87.26
	4,58	4.77	95.45	84.98
	14,89	8.78	95.42	97.85
	5,70	6.73	84.76	96.48
	9,61	5.22	92.53	96.57
	9,09	2.43	96.46	97.27
	7,83	1.60	97.55	98.14
	6,87	2.47	97.62	97.63
<i>Mittelwert</i>	<i>7,95</i>	<i>4.57</i>	<i>94.42</i>	<i>94.62</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>3,24</i>	<i>2.26</i>	<i>3.97</i>	<i>4.92</i>

Tabelle 20. Rohdaten für VYPRO® II-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit HeLa-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

### 8.5.5 MRC-5: TiMESH extralight®

<b>MRC-5: TiMESH extralight® Einzelmesswerte</b>				
<i>Messzeitpunkt</i>	<b>Apoptoserate</b>		<b>Proliferationsrate</b>	
	<i>TiMESH</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>TiMESH</i>	<i>Kontrolle</i>
0 h	2,93	2,93	97,18	97,18
	2,72	2,72	96,28	96,28
	2,09	2,09	97,04	97,04
	1,10	1,10	94,44	94,44
	0,00	0,00	96,43	96,43
	1,32	1,32	97,17	97,17
	1,04	1,04	98,17	98,17
	1,03	1,03	97,99	97,99
	0,94	0,94	97,99	97,99
	<i>Mittelwert</i>	<i>1,46</i>	<i>1,46</i>	<i>96,97</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>0,94</i>	<i>0,94</i>	<i>1,16</i>	<i>1,16</i>
24 h	5,99	3,72	93,97	96,85
	5,42	5,46	94,53	95,27
	4,95	5,02	96,02	95,86
	5,39	3,51	94,51	98,44
	2,95	3,05	96,88	96,63
	3,89	3,57	95,40	96,74
	4,28	3,57	95,71	96,66
	3,85	3,44	96,79	96,12
	4,43	2,67	97,34	95,55
	<i>Mittelwert</i>	<i>4,57</i>	<i>3,78</i>	<i>95,68</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>0,95</i>	<i>0,89</i>	<i>1,19</i>	<i>0,93</i>
48 h	4,13	3,09	97,14	97,70
	2,64	4,29	98,21	97,26
	3,36	3,93	97,78	96,98
	3,26	1,74	97,95	96,91
	2,11	2,90	97,79	96,62
	2,24	1,77	98,80	97,42
	6,05	3,38	97,15	97,34
	4,87	3,70	98,15	97,13
	4,44	3,57	97,35	96,90
	<i>Mittelwert</i>	<i>3,68</i>	<i>3,15</i>	<i>97,81</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>1,31</i>	<i>0,89</i>	<i>0,54</i>	<i>0,33</i>
72 h	5,72	2,02	97,51	96,64
	6,61	2,49	95,53	88,86
	4,95	2,22	97,02	95,77
	5,2	3,05	97,85	96,61
	3,53	2,08	97,63	96,89
	3,09	1,73	97,66	94,77
	6,03	4,01	98,24	97,74
	2,52	3,53	97,61	97,07
	2,17	2,6	96,7	98,73
	<i>Mittelwert</i>	<i>4,42</i>	<i>2,64</i>	<i>97,31</i>
<i>Standardabweichung</i>	<i>1,63</i>	<i>0,76</i>	<i>0,80</i>	<i>2,86</i>

*Tabelle 21.* Rohdaten für TiMESH extralight®-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit MRC-5-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

### 8.5.6 MRC-5: ULTRAPRO<sup>®</sup>

<b>MRC-5: ULTRAPRO<sup>®</sup> Einzelmesswerte</b>				
<i>Messzeitpunkt</i>	<b>Apoptoserate</b>		<b>Proliferationsrate</b>	
	<i>ULTRAPRO<sup>®</sup></i>	<i>Kontrolle</i>	<i>ULTRAPRO<sup>®</sup></i>	<i>Kontrolle</i>
0 h	1,67	1,67	95,27	95,27
	1,58	1,58	94,34	94,34
	1,64	1,64	94,81	94,81
	3,41	3,41	94,79	94,79
	0,02	0,02	94,81	94,81
	3,97	3,97	94,08	94,08
	2,89	2,89	99,68	99,68
	3,11	3,11	99,55	99,55
	2,33	2,33	98,49	98,49
	<i>Mittelwert</i>	2,29	2,29	96,20
<i>Standardabweichung</i>	1,20	1,20	2,33	2,33
24 h	6,28	5,10	97,89	99,12
	6,98	3,77	98,01	99,18
	6,96	5,76	97,18	99,50
	3,29	3,57	97,94	99,19
	4,67	2,24	97,98	99,62
	4,23	4,55	97,88	99,59
	1,42	3,81	98,01	99,04
	2,95	2,14	97,52	99,38
	5,35	4,05	97,43	98,85
	<i>Mittelwert</i>	4,68	3,89	97,76
<i>Standardabweichung</i>	1,91	1,19	0,30	0,26
48 h	5,04	4,69	94,51	97,19
	4,38	3,07	96,07	97,53
	6,43	4,69	95,78	97,81
	2,84	5,83	95,02	97,61
	2,5	3,27	96,54	97,94
	4,32	4,91	96,26	96,92
	2,93	2,89	94,4	98,15
	2,85	2,12	96,6	97,14
	2,89	2,64	96,2	96,61
	<i>Mittelwert</i>	3,80	3,79	95,71
<i>Standardabweichung</i>	1,33	1,26	0,85	0,50
72 h	5,19	2,18	94,54	97,50
	6,24	2,10	96,57	97,04
	5,89	2,04	97,38	96,31
	7,09	5,30	96,68	96,12
	3,13	5,00	96,85	96,96
	6,67	5,19	97,54	96,28
	7,30	2,79	97,92	96,18
	7,07	2,53	95,95	96,57
	5,13	2,80	96,05	96,28
	<i>Mittelwert</i>	5,97	3,33	96,61
<i>Standardabweichung</i>	1,33	1,41	1,02	0,48

*Tabelle 22.* Rohdaten für ULTRAPRO<sup>®</sup>-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit MRC-5-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

### 8.5.7 MRC-5: VICRYL<sup>®</sup>

<b>MRC-5: VICRYL<sup>®</sup> Einzelmesswerte</b>				
<i>Messzeitpunkt</i>	<b>Apoptoserate</b>		<b>Proliferationsrate</b>	
	<i>VICRYL<sup>®</sup></i>	<i>Kontrolle</i>	<i>VICRYL<sup>®</sup></i>	<i>Kontrolle</i>
0 h	4,83	4,83	95,35	95,35
	5,02	5,02	96,14	96,14
	4,53	4,53	93,42	93,42
	5,37	5,37	96,31	96,31
	4,98	4,98	94,86	94,86
	5,68	5,68	94,31	94,31
	6,23	6,23	92,14	92,14
	5,83	5,83	91,37	91,37
	5,29	5,29	93,78	93,78
	<i>Mittelwert</i>	5,31	5,31	94,19
<i>Standardabweichung</i>	0,53	0,53	1,70	1,70
24 h	9,43	5,07	98,26	99,63
	4,58	4,78	98,94	99,49
	7,66	3,29	98,89	99,76
	5,61	5,99	97,63	98,71
	6,22	4,08	98,2	98,63
	7,32	5,28	98,84	98,89
	6,46	8,89	90,79	96,52
	8,29	0,06	95,59	95,87
	8,22	5,03	92,44	95,35
	<i>Mittelwert</i>	7,09	4,72	96,62
<i>Standardabweichung</i>	1,51	2,34	3,05	1,71
48 h	6,54	3,15	99,02	99,19
	8,66	4,87	99,44	99,66
	7,15	2,7	99,52	99,2
	7,79	2,07	98,29	99,35
	6,25	7,88	98,7	99,07
	8,26	4,87	98,47	99,4
	16,18	5,38	98,02	96,77
	14,01	7,19	96,69	87,37
	13,39	6,58	96,15	94,36
	<i>Mittelwert</i>	9,80	4,97	98,26
<i>Standardabweichung</i>	3,70	2,03	1,16	4,06
72 h	9,26	2,50	98,44	95,34
	7,68	3,39	96,59	97,98
	9,64	2,56	97,98	98,60
	6,06	3,36	97,15	98,86
	7,17	3,15	96,67	99,21
	8,39	6,02	96,45	99,09
	8,60	2,13	98,07	98,78
	4,72	1,64	97,72	97,91
	6,25	1,60	97,65	97,74
	<i>Mittelwert</i>	7,53	2,93	97,41
<i>Standardabweichung</i>	1,63	1,34	0,72	1,19

*Tabelle 23.* Rohdaten für VICRYL<sup>®</sup>-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit MRC-5-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

8.5.8 MRC-5: VYPRO<sup>®</sup> II

MRC-5: VYPRO <sup>®</sup> II Einzelmesswerte				
Messzeitpunkt	Apoptoserate		Proliferationsrate	
	VYPRO <sup>®</sup> II	Kontrolle	VYPRO <sup>®</sup> II	Kontrolle
0 h	4,52	4,52	92,05	92,05
	5,01	5,01	94,32	94,32
	4,69	4,69	94,49	94,49
	5,43	5,43	93,52	93,52
	4,63	4,63	93,68	93,68
	4,29	4,29	95,44	95,44
	4,72	4,72	89,52	89,52
	5,47	5,47	90,61	90,61
	4,64	4,64	88,46	88,46
<i>Mittelwert</i>	4,82	4,82	92,45	92,45
<i>Standardabweichung</i>	0,40	0,40	2,43	2,43
24 h	5,11	5,18	97,96	97,81
	6,40	5,04	97,82	97,48
	6,47	4,62	97,76	98,24
	18,79	8,13	96,44	98,47
	12,78	7,24	97,97	98,90
	17,07	9,82	98,63	98,66
	19,32	15,03	92,65	92,96
	19,84	15,21	89,12	94,74
	13,78	11,38	89,02	88,99
<i>Mittelwert</i>	13,28	9,07	95,26	96,25
<i>Standardabweichung</i>	5,97	4,10	3,93	3,38
48 h	7,57	3,84	97,58	96,55
	9,58	3,18	97,05	99,01
	5,44	2,67	96,70	98,56
	7,23	2,90	98,87	98,49
	4,93	4,72	98,62	99,09
	5,60	3,53	98,71	95,92
	17,17	8,85	97,40	96,48
	36,94	10,25	97,05	97,67
	14,19	9,40	96,75	95,24
<i>Mittelwert</i>	12,07	5,48	97,64	97,45
<i>Standardabweichung</i>	10,22	3,09	0,87	1,43
72 h	5,37	6,23	98,38	98,85
	7,41	4,82	98,41	99,04
	5,81	5,49	98,81	98,13
	6,27	2,80	96,57	97,16
	2,96	2,00	95,08	97,60
	5,80	4,03	97,39	97,49
	10,28	2,97	96,13	97,89
	12,21	3,06	95,64	97,75
	15,39	5,28	96,60	98,57
<i>Mittelwert</i>	7,94	4,08	97,00	98,05
<i>Standardabweichung</i>	3,92	1,45	1,32	0,64

Tabelle 24. Rohdaten für VYPRO<sup>®</sup> II-Netz und Kontrollgruppe nach Inkubation mit MRC-5-Zellen zu den Messzeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Apoptoserate wurde bestimmt mittels Annexin V, Proliferationsrate mittels Ki-67.

## **9 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow für die Überlassung des Dissertationsthemas. Bis zu seinem plötzlichen Tod stand er mir während des experimentellen Teils dieser Arbeit als geduldiger und gewissenhafter Betreuer zur Verfügung und war bei der Umsetzung dieser Arbeit unersetzlich. Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. S. Farke für seine entgegengebrachte Unterstützung. Ich danke ihm für seine Geduld und dafür, dass er den Glauben an diese Arbeit nicht verloren hat.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-P. Bruch, Direktor der Chirurgischen Klinik der Universität zu Lübeck für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der notwendigen Materialien. Herrn Prof. Dr. J. Westermann, Direktor des Anatomischen Institutes der Universität zu Lübeck, sowie seinen Mitarbeitern danke ich für die Nutzung des Rasterelektronenmikroskops im Anatomischen Institut und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der notwendigen Arbeiten. Claudia Kilaitis danke ich für die freundliche Hilfestellung bei der statistischen Aufarbeitung der Messdaten.

Für die Bereitstellung des Massenspektrometers sowie die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und die anregenden Diskussionen möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. B. Lindner aus dem Forschungszentrum Borstel bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors insbesondere bei Annemarie Aumüller, Elke Gheribi, Vera Grobleben, Gisela Grosser-Pape und Regina Kaatz. Während der experimentellen Arbeit wurde ich durch sie tatkräftig unterstützt und sie sorgten stets für ein angenehmes Arbeitsklima.

Meiner Frau danke ich im Besonderen für die Geduld und ihre Unterstützung, mit der sie die Fertigstellung dieser Promotionsschrift ermöglicht hat. Ein besonderer Dank gilt auch meinem Bruder, Dr. rer. nat. Björn Meder, der mir stets als gewissenhafter und kritischer Lektor zur Seite stand.

## 10 Lebenslauf

### PERSON

---

Name: Meder  
Vorname: Sven  
Geburtsdatum: 02.07.1979  
Geburtsort: Hannover  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder  
  
Wohnort: Im Kiebitzhörn 5  
21762 Otterndorf

### AUSBILDUNG UND BERUFLICHER WERDEGANG

---

seit 06/2007 Assistenzarzt in der Abteilung für Chirurgie des Capio Krankenhauses Land Hadeln in Otterndorf

05/2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Erteilung der ärztlichen Approbation

11/2006-03/2007 PJ in der Klinik für Hämatologie, internistische Onkologie und Immunologie, Sanakliniken Lübeck

08/2006-11/2006 PJ in der Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie, Klinikum Neustadt

04/2006-08/2006 PJ in der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

04/2006 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2005	Famulatur in der Radiologischen Praxis Drs. Finkenstaedt / Maas, Hamburg
09/2005	Famulatur in der Allgemeinmedizinischen Praxis Drs. Niebuhr / Ruser, Lübeck
08-10/2004	Famulatur in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
10/ 2003	Famulatur in der Klinik für Traumatologie BG-Kliniken „Bergmannsheil“, Bochum
08/2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003	Famulatur in der Abteilung für Chirurgie Kreiskrankenhaus Land Hadeln, Otterndorf
11/2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/2002	Ärztliche Vorprüfung
10/2000- 09/2002	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
09/1999-10/2000	Zivildienst DRK-Sozialstation Langenhagen
08/1990-07/1999	Integrierte Gesamtschule Langenhagen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/1986- 06/1990	Adolf-Reichwein-Schule Langenhagen