

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik  
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der Universität  
Tübingen

Immunkompatibilität einer neuartigen gestrickten  
Titannukleusprothese der Firma Buck und Co. GmbH

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

Vorgelegt von:  
Dorn, Clemens Hendrik  
2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Professor Dr. Andreas Nüssler  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Held

Tag der Disputation: 18.12.2017



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Bandscheibe .....	3
1.2	Degeneration .....	8
1.3	Nucleusimplantate.....	9
1.4	Die gestrickte Titan-nucleusprothese der Fa. Buck & Co. GmbH .....	14
1.5	Biokompatibilität/Immunkompatibilität.....	17
1.6	Immunsystem.....	18
1.6.1	Die akute Entzündungsreaktion.....	19
1.6.2	Das angeborene Immunsystem.....	20
1.6.3	Das erworbene Immunsystem .....	21
1.7	Immunreaktionen durch Implantatabrieb.....	23
2	Zielsetzung.....	25
3	Material und Methodik.....	27
3.1	Materialien .....	27
3.1.1	Chemikalienliste .....	27
	Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien .....	28
	Geräteliste.....	29
	Software .....	30
3.2	Methoden.....	31
3.2.1	THP1-Zellen.....	31
3.2.2	Differenzierung von THP1-Zellen zu Makrophagen durch PMA .....	33
3.2.3	HL-60-Zellen .....	34

3.2.4	Zellzahlbestimmung mit Trypanblau .....	35
3.2.5	Fluoreszenzfärbung.....	36
3.2.6	Durchflusszytometrie.....	38
3.2.7	Toxizitätstest.....	39
3.2.8	DNA laddering .....	42
3.2.9	Phagozytose .....	46
3.2.10	ELISA.....	46
3.2.11	ROS und ROS Quantifizierung .....	48
3.2.12	Monozytenaktivierungstest ELISA TNF $\alpha$ / IL-6 .....	50
3.2.13	Hämolyse nachweis mittels Chemolumineszenz .....	52
3.2.14	Zytokin Array.....	52
3.2.15	Statistische Auswertung.....	56
4	Ergebnisse .....	56
4.1	Charakterisierung der Zellmorphologie mittels Fluoreszenz-färbung.....	56
4.2	Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	58
4.3	Keine Toxizität des Abriebs messbar.....	60
4.4	Keine Apoptoseinduktion im DNA laddering detektierbar.....	61
4.4.1	Wirkung der Beize auf die THP-1-Zellen .....	62
4.5	Phagozytose der Abriebpartikel.....	63
4.6	Keine erhöhte TNF- $\alpha$ Sekretion durch die getesteten Substanzen .....	64
4.7	Keine erhöhte ROS Produktion durch die getesteten Substanzen.....	65
4.8	Keine erhöhte TNF- $\alpha$ und IL-6 Expression im Vollblut.....	67

4.9	Beize und Elektropolierflüssigkeit induzieren bereits in geringsten Mengen eine schwache Hämolyse .....	68
4.10	Abrieb aktiviert die Immunzellen .....	69
4.11	Geringere Immunzellaktivierung durch die Testsubstanzen zeigt die Bedeutung eines geeigneten Reinigungsprotokolls auf .....	73
4.12	Ausbleibende Immunzellaktivierung durch das gereinigte und sterilisierte Implantat bestätigt die Effizienz des Reinigungsprotokolls .....	75
4.13	Erhöhte Spiegel von MIP-1 $\beta$ , I-309, IP-10, IL-6sR und IL-10 nach Inkubation von Vollblut mit Abrieb und den Testsubstanzen .....	76
5	Diskussion .....	79
6	Ausblick .....	88
7	Zusammenfassung .....	91
8	Vorträge .....	93
9	Danksagung .....	103
10	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
Abb.	Abbildung
B-Zellen	B-Lymphozyten
ca.	circa
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpolFI.	Elektropolierflüssigkeit
FCS	Fetales Kälberserum
HE	Hämatoxylin-Eosin
IP2	Schmiermittel
IL	Interleukin
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Biologische Replikate
n	Technische Replikate
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PEEK	Polyetheretherketon
PBMC	mononukleäre Blutzellen
P/S	Penicillin/Streptomycin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMMA	Polymethylmethacrylat
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean

Tab.

TE Puffer

TNF- $\alpha$

T-Zellen

UV

V

z.B.

z.T.

Tabelle

TRIS/EDTA Puffer

Tumornekrosefaktor  $\alpha$

T-Lymphozyten

Ultraviolet

Volt

zum Beispiel

zum Teil

# 1 Einleitung

Rückenschmerzen sind neben Kopfschmerzen eines der häufigsten Schmerzsyndrome. Sie sind in Deutschland und anderen Industrienationen ein sehr häufiger Grund für die Inanspruchnahme des medizinischen Versorgungssystems, frühzeitige Pensionierungen und Arbeitsunfähigkeit. So sind die rückenassoziierten Krankheitsbilder nicht nur aus medizinischer, sondern auch aus gesundheitsökonomischer Sicht sehr bedeutsam. Die aus Rückenschmerzen resultierenden Produktivitätsverluste übersteigen die direkten medizinischen Kosten deutlich (Abb. 1).

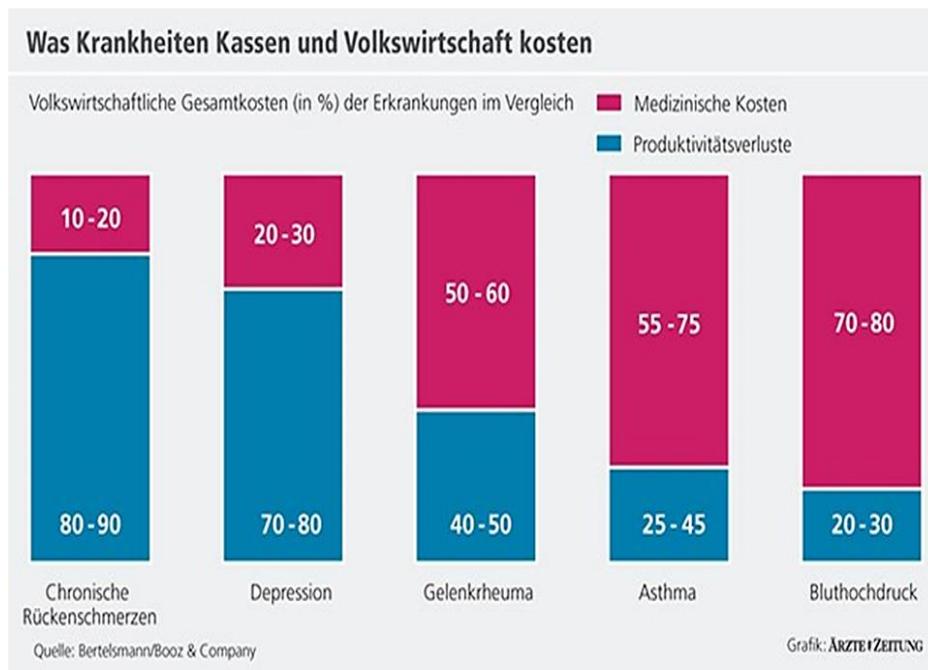


Abbildung 1: Krankheitskosten für die Volkswirtschaft bei verschiedenen Erkrankungen (Quelle: [www.aerztezeitung.de/img.ashx?f=/docs/2012/07/09/330\\_0008\\_3869850\\_125a0601-A.jpg&w=620](http://www.aerztezeitung.de/img.ashx?f=/docs/2012/07/09/330_0008_3869850_125a0601-A.jpg&w=620))

Krankheitskostenanalysen beziffern die durch Rückenschmerzen verursachten volkswirtschaftlichen Gesamtkosten auf 17 Mrd. € jährlich [1]. Die telefonische Gesundheitsumfrage des Robert-Koch-Instituts (DSTel 03 und GEDA 2009) ergab, dass in den letzten 12 Monaten des jeweiligen Befragungszeitraumes 22% der

Frauen und 16% der Männer unter Rückenschmerzen litten, die über drei Monate oder länger fast täglich auftraten [2]. Die Lebenszeitprävalenz einer einzelnen Rückenschmerzepisode beträgt ca. 74-84% und steigt mit zunehmendem Lebensalter (Abb. 2). Rückenschmerzen sind assoziiert mit höherem Alter, weiblichem Geschlecht, Übergewicht oder Adipositas, Arthrose- oder Arthritis Diagnose und einem niedrigen Bildungsniveau [2].

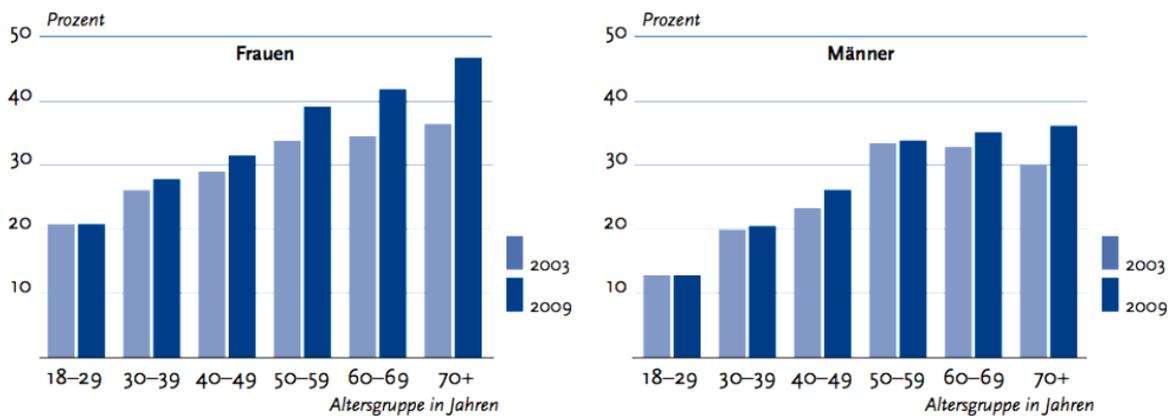


Abbildung 2: Prävalenz von Rückenschmerzen (mind. drei Monate, fast täglich) in der deutschen Bevölkerung in den Jahren 2003 und 2009 (Gesundheitssurvey des RKI 2003, 2009) [3]

Rückenschmerzen sind komplex, d.h. sie umfassen ein sehr breites Spektrum unterschiedlicher Erscheinungsformen [1]. Einteilungen lassen sich anhand der Schmerzstärke und am Ausmaß der Funktionsbeeinträchtigung vornehmen. Mit dem Graduierungsschema von Raspe und Kohlmann werden Rückenschmerzen von Grad 1 mit geringer Schmerzintensität und niedriger Funktionseinschränkung bis Grad 3 mit hoher Schmerzintensität und hoher Funktionseinschränkung eingeteilt. Des Weiteren wird zwischen dem nichtspezifischen und dem spezifischen Kreuzschmerz differenziert. Dem spezifischen liegt im Gegensatz zum nicht spezifischen Kreuzschmerz eine pathologische Struktur zugrunde. Im Rahmen bandscheibenbedingter Beschwerden treten Schmerzformen und

Ausbreitungen auf, die auf Irritationen unterschiedlicher Anteile des Nervensystems zurückzuführen sind [4]. Man unterscheidet den Organschmerz von der Neuralgie. Bei Ersterem sind der Schmerzort und der Ort der Störung identisch. Neuralgien sind sog. projizierte Schmerzen, bei denen der Schmerz im Ausbreitungsgebiet des segmentalen Nervs (Volksmund Ischias) empfunden wird [4]. Es wird geschätzt, dass 1 bis 2% aller Menschen zu einem beliebigen Zeitpunkt ihres Lebens Rückenschmerzen aufgrund eines Bandscheibenvorfalles haben [5]. Der Bandscheibenvorfall ist eine degenerativ bedingte Vorwölbung bzw. ein Vorfall von Bandscheibengewebe in den Spinalkanal mit fakultativer Ausbildung einer neurologischen Defizitsymptomatik [6]. Üblicherweise treten Bandscheibenvorfälle bei Personen über 30 Jahren auf, Männer sind im Gegensatz zu Frauen doppelt so oft betroffen. Je nach Schweregrad und Ausprägung existieren verschiedene Therapieansätze. Diese reichen von der medikamentösen, konservativen bis hin zur operativen, invasiven Therapie.

## **1.1 Die Bandscheibe**

Die Bandscheibe ist eine faserknorpelige Verbindung zwischen den Wirbelkörpern, die durch ihren Aufbau sowohl die Beweglichkeit ermöglicht, als auch die Funktion eines Stoßdämpfers hat. Bei Verlust der Elastizität kann die Bandscheibe diese Aufgabe nicht mehr ausreichend erfüllen und es kann zu einem Bandscheibenprolaps kommen [5]. Der zentrale aus gallertigem Bindegewebe bestehende Kern (Nucleus pulposus) wird von dem teils bindegewebigen, teils faserknorpeligen Bandscheibenring (Anulus fibrosus) umschlossen (Abb. 3). Der Anulus fibrosus besteht vorwiegend aus Fasern, die sich in Schraubenwindungen miteinander verflechtend von Wirbelkörper zu Wirbelkörper ziehen [4]. Er strahlt in die Deckplatte und die Randleisten der Wirbelkörper ein. Die Anordnung sowie der hohe Wassergehalt des Nucleus erlauben im Normalfall der nicht geschädigten Bandscheibe eine exzellente Weiterleitung kompressiv wirkender Kräfte [6]. Der Anulus fibrosus ist durchsetzt von Fibroblasten-ähnlichen Zellen und Stammzellen [7]. Die Kollagenzusammensetzung der äußeren Bereiche des Anulus fibrosus

bestehen überwiegend aus Kollagen-Typ-I. Dieses nimmt zum Nucleus pulposus hin ab, während das Kollagen-Typ-II von außen nach innen zunimmt [7].

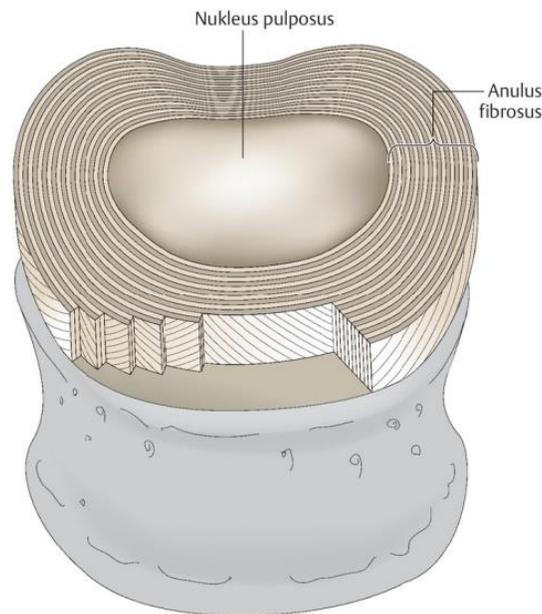


Abbildung 3: Aufbau der lumbalen Bandscheibe. Zentral liegt der gelartige und wasserbindende Nucleus pulposus. Dieser wird von den konzentrisch angeordneten Kollagenfasern des Anulus fibrosus umgeben [6].

Der zentral liegende Nucleus pulposus besteht aus zellarmem gallertigen Gewebe. Dieser Gallertkern ist reich an Glykoproteinen und hochmolekularen Polysacchariden. Glykoproteine bestehen aus Eiweiß und Kohlenhydraten und zeichnen sich als Bestandteil von Sekreten (Mukoproteine) durch starke Wasseranziehungskraft und Viskosität aus [4]. Extrazelluläre Strukturen müssen aufgrund der begrenzten Lebensdauer immer wieder erneuert werden. Dies erfordert einen regelmäßigen Stoffaustausch im Zwischenwirbelabschnitt, um Biosynthese und Abbau der extrazellulär gelegenen Strukturelemente aufrechtzuerhalten [4]. Schlecht versorgte Bandscheibenzellen produzieren Makromoleküle von minderer Qualität und Quantität [4]. Eine degenerierte Bandscheibe weist eine deutliche Minderung in den beschriebenen Funktionen auf. Bei Beschädigung wird der gallertige Kern durch die bindegewebige Außenzone

gedrückt und komprimiert so die benachbarten Nerven oder das Rückenmark [8] (Abb. 4).

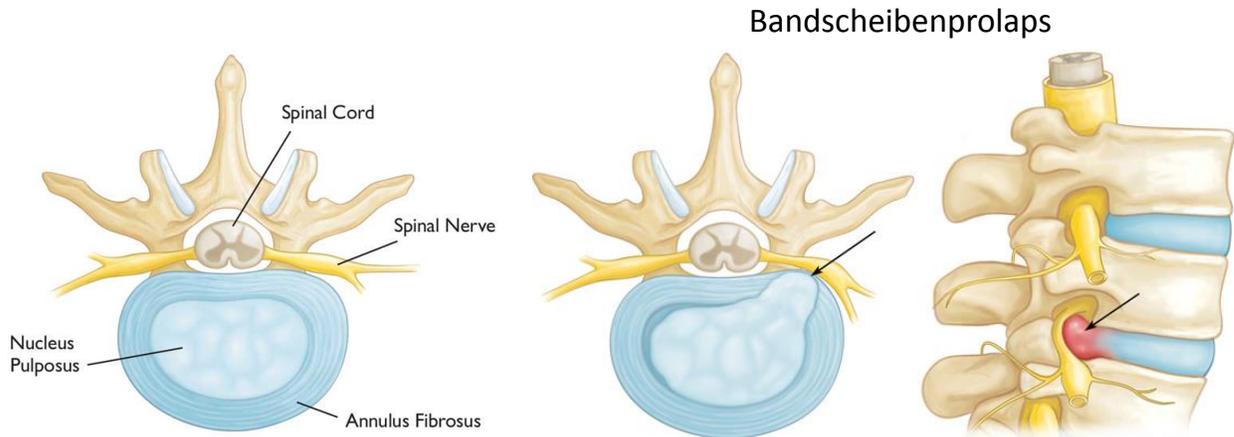


Abbildung 4: Bandscheibenprolaps, im Vergleich die physiologische- und die pathologisch veränderte Bandscheibe. Der Spinalnerv wird durch den Nucleus pulposus komprimiert (→). (Quelle: OrthoInfo – AAOS orthoinfo.aaos.org)

Die Symptome einer geschädigten Bandscheibe sind sehr variabel und reichen von leichten bis hin zu stärksten Rückenschmerzen mit Parästhesien und Lähmungserscheinungen. Diese können progredient oder mit plötzlich auftretenden und sich ausbreitenden Schmerzen assoziiert sein. Die Ischialgie beschreibt den Schmerz, der sich über das Bein bis in den Fuß ausdehnt [5]. Der Hauptgrund dafür ist ein prolabierter Diskus. Eine prolabierte Bandscheibe ruft aber nicht immer Symptome hervor [5]. Dies kann durch eine Studie belegt werden, in der Erwachsene ohne Rückenschmerzen mittels MRT untersucht wurden. Mehr als 50 der 100 Untersuchten hatten eine vorgewölbte Bandscheibe [5]. Bei 20 der 100 Untersuchten hatte der Kern der Bandscheibe bereits einige Lagen des sie umgebenden Faserrings durchbrochen oder war sogar in das umliegende Gewebe eingedrungen, jedoch ohne spürbare Symptome auszulösen [5].

Drei Typen von Bandscheibenvorfällen [5]:

- Prolaps: Die Bandscheibe wölbt sich zwischen den Wirbelkörpern hervor, aber die äußerste Schicht ist noch intakt
- Extrusion: In der äußersten Schicht der Bandscheibe befindet sich ein Riss, was zum Austritt des Bandscheibengewebes führt. Der ausgetretene Inhalt hat aber noch Kontakt zur Bandscheibe
- Sequestration: Bandscheibengewebe ist in den Spinalkanal eingedrungen und ist nicht mehr direkt an der Bandscheibe befestigt

Die konservative und die operative Behandlung stellen die zwei wesentlichen Behandlungsoptionen dar. Wesentlich für das Ergebnis ist die Indikationsstellung, denn ca. 80% der Patienten erreichen durch nichtoperative Maßnahmen nach einem Bandscheibenvorfall eine günstige Wiederherstellung [7]. Die Leitlinien zur Behandlung eines Bandscheibenvorfalles besagen, dass eine frühzeitige und ausreichende analgetische Therapie mit NSAR (nichtsteroidalen Antirheumatika), muskelrelaxierenden Medikamenten und bei starken Schmerzen auch kurzfristig mit Opioiden eingeleitet werden sollte [3, 9]. Des Weiteren ist eine Operation bei progredienten Paresen oder Blasen-Mastdarm-Störungen sowie bei erfolgloser konservativer ambulanter oder stationärer Therapie bei gesicherter morphologischer Ursache der Schmerzsymptomatik indiziert [9]. Zu den Zielen der operativen Therapie zählen die Entlastung der eingeengten Rückenmarksnerven und damit die Besserung der Schmerzsymptomatik und ggf. die Wiederherstellung der Funktion. Der traditionelle chirurgische Ansatz ist die interkorporelle Fusion, was eine vollständige oder teilweise Entfernung der degenerierten Bandscheibe und die Verbindung der darüber und darunterliegenden Wirbelkörper zur Folge hat [10] (Abb. 5). Durch die Fusion kommt es häufig neben Funktionseinschränkungen zur Degeneration benachbarter Bandscheiben [11].

Die auf die Versteifung der Wirbelsäule bezogenen bisher erschienen Veröffentlichungen suggerieren eine Schmerzlinderung und mäßige Zugewinne in

der Funktion [10]. Es hat den Anschein, als sei diese operative Methode der konventionellen Physiotherapie überlegen; dies konnte jedoch nicht belegt werden [10]. Bandscheibenimplantate und Nucleusimplantate zählen zu den neueren Therapieverfahren. Diese haben das Ziel der Wiederherstellung der Bandscheibe und somit dem Funktionserhalt [4, 6].

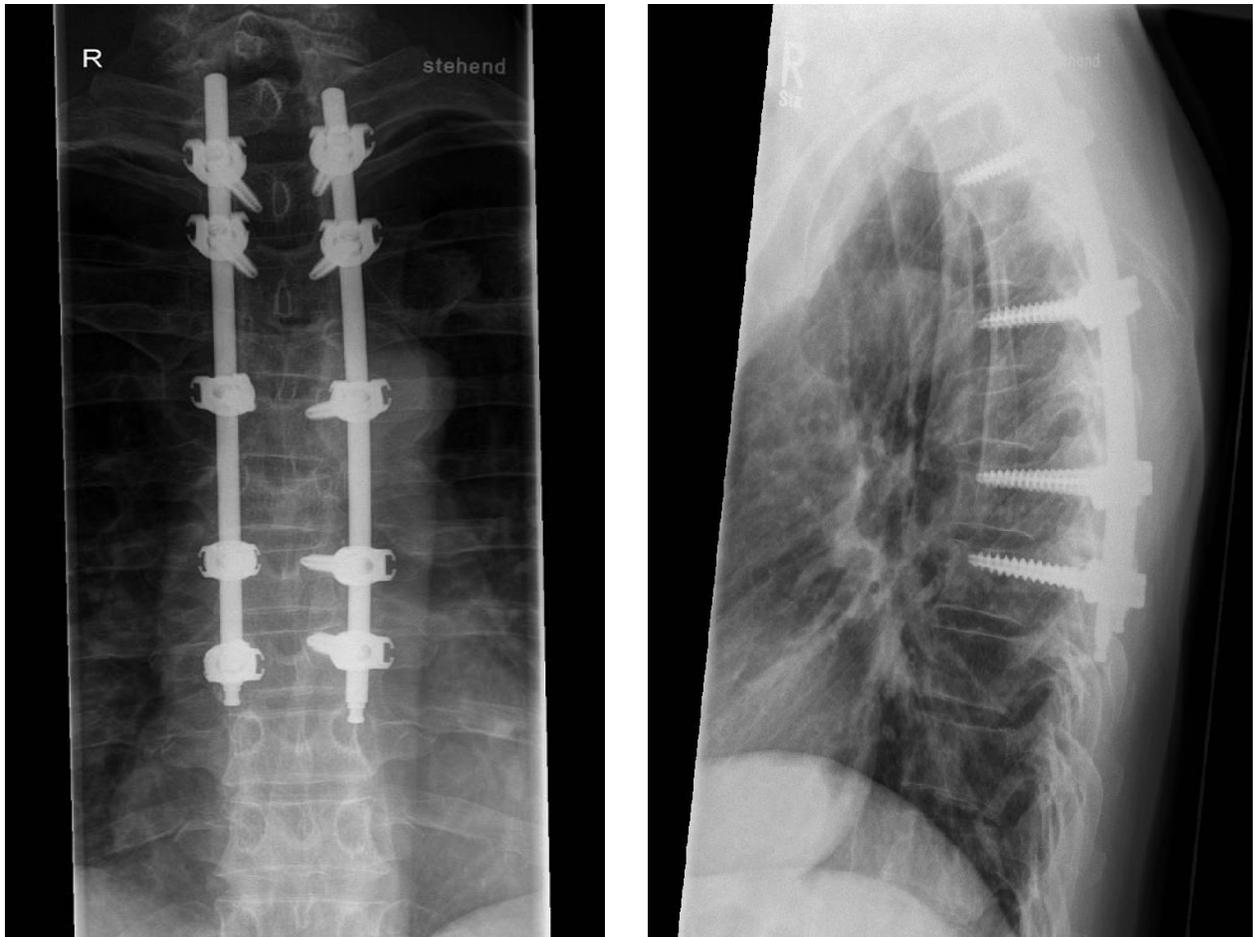


Abbildung 5: Dorsale interkorporelle Fusion in der Brustwirbelsäule, posterior-anteriorer und seitlicher Strahlengang (Quelle: PD Dr. Badke, BGU Tübingen)

## 1.2 Degeneration

Die Degeneration der Bandscheibe geht nahezu universell mit dem Alterungsprozess einher. Wenngleich es viele Theorien zur Begründung von lumbalen Rückenschmerzen gibt, werden die Symptome doch sehr häufig der degenerierten Bandscheibe zugeschrieben [10]. Degenerative Erkrankungen der Bandscheibe können zu erheblichen Schmerzen, Instabilität, Beeinträchtigungen der Nervenwurzeln oder des Rückenmarks beziehungsweise zu einer Kombination der Symptome führen [8]. Bereits in der zweiten Lebensdekade kommt es zu einer zu Beginn noch geringfügigen Minderversorgung der Deckplatten, wodurch eine Gewebestörung resultiert, welche im Bereich des Nucleus pulposus beginnt [12]. Altersbedingte Veränderungen sind durch Zellapoptose, Abnahme an Kollagen und Proteoglykanen gekennzeichnet, wodurch ein Wasserverlust resultiert [7]. Diese Veränderungen können zur Schwächung des Anulus fibrosus führen, wodurch sich der Nucleus pulposus ausbeult und es zu einem potentiellen Prolaps kommt [7]. Die Initialphase der Degeneration ist durch eine Abnahme des Proteoglykangehalts und einen Umbau von Kollagen-Typ-II- zu Kollagen-Typ-I-Fasern im Nucleus pulposus gekennzeichnet [13]. Eine daraus resultierende verminderte Wasserbindungsfähigkeit des Nucleus führt zu einer gestörten spinalen Lastübertragung, die wiederum diskale Strukturläsionen v.a. des Anulus akzentuieren kann [6]. Durch das Einwachsen von Nerven in den Nucleus kann ein diskogener Schmerz hervorgerufen werden [14]. Die erst später im Anulus fibrosus entstehenden Risse werden durch hyalinisiertes Kollagen ersetzt. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Zellproliferation und auch teilweise zur Neovasikularisierung entlang der entstandenen Risse [15]. Die Symptome eines Bandscheibenvorfalles sind abhängig von der Lokalisation und reichen von sensiblen Störungen und Schmerzen über Paresen bis hin zu ggf. Blasen- und Mastdarmstörungen. Des Weiteren verändern der Bandscheibenvorfall und dessen chirurgische Behandlung die mechanische Funktion des Bandscheibenfachs erheblich. Dies kann zur Progression der Degeneration im umgebenden Gewebe beitragen [11]. Diese Symptome werden durch Kompression und Inflammation des

umliegenden Nervengewebes hervorgerufen. Entzündliche Prozesse exazerbieren durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und gelten als Hauptvermittler für Bandscheibendegeneration und Rückenschmerzen [6].

### **1.3 Nucleusimplantate**

In den vergangenen Jahrzehnten stieg neben der Anzahl der Wirbelsäulenoperationen auch die Komplexität der Operationen aufgrund zunehmender Technisierung, z.B. durch den Einsatz von interkorporellen Platzhaltern [6]. Die Fusionsoperation, Spondylodese, stellt im Moment den Goldstandard in der operativen Therapie der Bandscheibendegeneration dar. Ziel dieses Verfahrens ist die segmentale Stabilisierung und die Verbesserung der Schmerzsymptomatik. Neben der Versteifung der Wirbelsäule existieren dynamische Stabilisierungssysteme, die versuchen, das physiologische Bewegungsausmaß wiederherzustellen. Weiterhin wurden neben den dynamischen pedikelbasierten dorsalen Stabilisierungssystemen, wie den interspinösen Platzhaltern, Prothesen für den Ersatz des Facettengelenks der gesamten Bandscheibe sowie des Nucleus entwickelt [6, 16]. Neben den bekannten Risiken bei Operationen, wie z.B. Wundheilungsstörungen, entsteht bei der Fusionsoperation zusätzlich das Risiko der Pseudarthrose oder des Postfusionssyndroms, welches zu fusionsspezifischen Symptomen führt, die auch nach gelungener Fusionsoperation auftreten können [4]. Zu den Morbiditäten der Fusionsoperationen zählen u.a. Muskelatrophie, Bewegungseinschränkungen und Infektionen sowie Schmerzen an der Knochenentnahmestelle. Bei der posterolateralen Fusion werden Knochenspäne aus dem Beckenkamm zwischen die Querfortsätze und der Wirbelgelenke gelegt, um eine knöcherne Verbindung der Wirbelkörper herbeizuführen. Dies birgt ebenfalls Infektionsrisiken an der Knochenentnahmestelle. Lehmann et al. fand in einer Langzeit follow-up Studie heraus, dass 44% der Patienten, die sich einer Fusionsoperation unterzogen haben, an Rückenschmerzen leiden [17]. Eine Spinalstenose in benachbarten Segmenten wurde bei 42% der Patienten beobachtet, von denen 15% symptomatisch waren [17]. Mit dem Ziel, die

Beweglichkeit in den Bewegungssegmenten zu erhalten und die genannten fusionsspezifischen Probleme wie implantatbezogene perioperative Komplikationen, Pseudarthrose, oder Anschlusssegmentdegeneration der Wirbelwirbelsäule zu vermeiden, wurden in den letzten Jahrzehnten unterschiedliche dynamische Operationsverfahren entwickelt, die Bewegungssegmente dorsal oder interkorporell stabilisieren [6]. Die Bandscheibenprothese ist definiert als bewegungserhaltendes Zwischenwirbelimplantat. Beschrieben werden Nucleusimplantate als minimalinvasive Alternative zur Fusionsoperation mit einem Indikationsspektrum von geringgradiger bis mittlerer Bandscheibendegeneration [18, 19]. Unterschieden wird noch zwischen der Teilprothese und Bandscheibentotalendoprothese. Die Teilprothese ersetzt nur den gallertartigen Nucleus. Bei der Entwicklung von Nucleusprothesen besteht das Ziel, die Morbidität der Operation zu reduzieren und dem Patienten postoperativ ein Maximum an Stabilität und physiologischer Beweglichkeit zu ermöglichen. Neben dem Funktionserhalt zählen der Wegfall von Schmerzen und die Reduktion des Infektionsrisikos an der Knochenentnahmestelle zu den Vorteilen dieses Verfahrens.

Der Nucleus pulposus Ersatz ist eine sehr wichtige Weiterentwicklung, die eine stabile Bewegung ermöglicht, die Bandscheibenhöhe wiederherstellt und die Übertragung von Scherkräften auf den noch vorhandenen Anulus fibrosus und die Facettengelenke vermindert [17]. Zusätzlich kommt es zu einer Stabilisierung der ligamentären Strukturen [17]. Hauptindikation ist die symptomatische, monosegmentale, degenerative Instabilität. Grundvoraussetzung für die Implantation ist ein vorhandener/intakter Anulus fibrosus und weitgehend intakte Begleitstrukturen im betroffenen Bereich [6]. In der Bildgebung sollte sich eine moderate Degeneration der Bandscheibe sowie ein Höhenverlust der Bandscheibe zwischen 10-50% zeigen [17]. Ein Versagen der konservativen Therapie ist ebenfalls Voraussetzung für die Implantation. Die Zielgruppe für Nucleusimplantate

stellen damit Patienten in frühen Stadien der Bandscheibendegeneration dar [20]. In Deutschland werden rund 160.000 Operationen bei Bandscheibenvorfällen durchgeführt. Dabei ist der Einsatz von bewegungserhaltenden Implantaten bei ca. einem Viertel der Patienten indiziert. Als Kontraindikationen gelten z.B. Implantatlagerstörungen wie Osteoporose oder Frakturen, sowie Tumore und Infektionen [4]. Nucleusimplantate werden meistens über einen posterioren Zugang eingesetzt [6]. Eine Alternative zur standardmäßigen posterioren Hemilaminotomie Technik beschreibt Bertagnoli durch eine Implantation über einen anterolateralen transspinalen Zugang (ALPA), um die potentielle Migration und Dislokation zu minimieren [17].

Es existiert eine große Vielfalt an verschiedenen Materialien und Bauweisen von Nucleusimplantaten. Die Anforderungen, die an ein Implantat gestellt werden, sind jedoch immer dieselben. Nach Phillips und Laurysen (2010) soll das Implantat die biomechanischen Eigenschaften wiederherstellen und für eine gleichmäßige Kraftverteilung im Segment sorgen. Weiterhin wird gefordert, dass ein gewisses Maß an Beweglichkeit ermöglicht wird, keine Migration stattfindet, sowie eine Minimierung des Materialabriebs. Dadurch können resultierende Komplikationen, wie Entzündungsreaktionen, reduziert werden. Das Elastizitätsmodul (E-Modul) des verwendeten Materials muss mit den Wirbelkörperdeckplatten kompatibel sein, weil Diskrepanzen zu abnormen Belastungsverteilungen und zum Einsinken in die Wirbelkörperdeckplatten führen können [17]. Stabilität und Biokompatibilität sind weitere essentielle Voraussetzungen eines Implantates. Das Nucleusimplantat sollte so gestaltet sein, dass es über einen minimalinvasiven oder einen geringinvasiven Zugang implantiert werden kann [17]. Durch einen möglichst kleinen Zugang werden umliegende Strukturen geschont und das Implantat zusätzlich durch diese stabilisiert. Weiterhin werden so postoperative Komplikationen und Schmerzen reduziert und eine frühe Mobilisierung des Patienten ermöglicht. Da ein Erwachsener im Durchschnitt 2 Millionen Schritte pro Jahr geht, soll das Implantat bei einer angenommenen Verweildauer im Patienten

von 40 Jahren ca. 100 Millionen Bewegungszyklen standhalten [17]. Die Migration stellt eines der Hauptprobleme früherer Nucleusimplantate dar. Diese kann durch eine zu glatte Oberflächenstruktur oder durch einen nicht minimalen Operationszugang mit einhergehender Beeinträchtigung benachbarter Strukturen hervorgerufen werden. Die bei der Belastung des Implantatgerüsts entstehenden Abriebpartikel sollten in möglichst geringem Umfang entstehen und keine Immunreaktion hervorrufen. Die Palette an Implantaten auf dem Markt reicht von Metallimplantaten und Polymeren bis hin zu viskoelastischen, z.T. injizierbaren Präparaten [6].

Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die erste Stahlkugelprothese implantiert [21]. Ein Problem dieser Prothesen war das Einsinken in die benachbarten Strukturen und die teilweise vorkommende Hypermobilität (Fernström 1964, 1965, 1966-, sowie Reitz und Joubert 1964). Die im Moment verwendeten Implantate können in „*in situ* aushärtende“, „vorgeformte“ und in eine Kombination aus beidem eingeteilt werden. Die „vorgeformten Nucleusimplantate“ bieten den Vorteil, dass sie sehr formstabil sind, jedoch kann die Implantation und die Einpassung in den vorgegebenen Raum erschwert sein. Zu den mechanischen Nucleusprothesen zählt die NUBAC™. Es artikulieren zwei Deckplatten aus Polyetherketonen (PEEK) über einen Ball. Für die Indikation dieser Prothese ist eine Bandscheibenhöhe von mindestens 5 mm notwendig. Die NUBAC™ liefert hinsichtlich des Schmerzes (VAS und ODI) gute Ergebnisse [12]. Ebenso wird eine geringe Komplikationsrate erreicht [12]. Nachemson war einer der ersten, der mit den sog. „*in situ* aushärtenden“ Polymerern experimentierte [17]. Diese bieten den Vorteil, dass sie sich über einen minimalinvasiven Zugang injizieren lassen. Der durch die Nucleotomie geschaffene Raum wird zudem gut durch die zu Beginn noch flüssigen Materialien ausgefüllt [17]. Zur Zeit wird am häufigsten Silikon und Polyurethan verwendet [17]. Die Materialermüdung und die Toxizität der Komponenten stellen aber wesentliche Probleme dieser Implantate dar. Neben dem injizierten Silikon versuchten Hamby und Glaser PMMA

(Polymethylmethacrylat) zu injizieren, sie scheiterten jedoch wie beim Silikon an der Kontrolle des flüssigen Materials und dem schlechten Outcome [20]. In klinischen Tests befinden sich derzeit die Nucleusprothese von ‚Disc Dynamics‘ (Minnetonka, MN) und die „BioDisc“ (Cryolife, Kennesaw, GA) [17]. Somit können hierzu noch keine aussagekräftigen Ergebnisse vorgestellt werden. Das Newcclus Spiral Implant (Centerpulse Orthopedics, Winterthur, Schweiz) stellt einen weiteren Ansatz dar. Dabei werden hydrophile Coils in die Nucleushöhle eingebracht, die sich dann zu einer Spirale ausweiten. Dieses Implantat lieferte bisher gute klinische Ergebnisse und befindet sich weiterhin in der klinischen Erprobung [17]. Kombinierte Implantate bestehen aus Hydrogel. Dieses hat eine vorgegebene Größe und verändert beim Einsatz in das physiologische Bandscheibenmilieu seine Form [17]. Vor der Implantation wird das Implantat durch Dehydrierung verkleinert und soll dann nach der Implantation wieder durch Wasserabsorption expandieren. Bis jetzt konnte dies jedoch *in vitro* nicht konstant reproduziert werden [17]. Hydrogelbasierte Nucleusimplantate befinden sich seit über 15 Jahren in der Entwicklung [20]. Die PDN (Prosthetic Disc Nucleus) Prothese wurde Mitte der 90er Jahre entwickelt und von Raymedica, Inc (Abb. 6). (Bloomington, MN) auf den Markt gebracht [20]. Sie wird im Moment am häufigsten implantiert. Im Zentrum der Prothese befindet sich ein Hydrogelkern, der von einem Polyethylengeflecht umgeben wird. Sie ist also ein Kompromiss aus einem präformierten Implantat und einem Hydrogel.

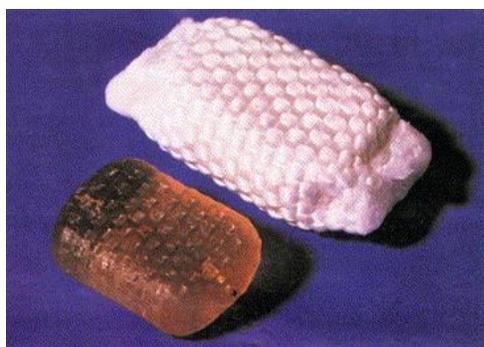


Abbildung 6: Prosthetic Disc Nucleus aus Goins et al. [17]

Der Hydrogelkern nimmt nach der Implantation mit der Zeit Flüssigkeit auf und erreicht sein Maximum nach 4 – 5 Tagen [20, 22]. Durch die Wasseraufnahme wächst die Prothese und kann die anatomische Form der Bandscheibe wiederherstellen. Die Prothese zeigt sowohl gute biomechanische Eigenschaften, Biokompatibilität und keine Toxizität [17]. Jedoch stellt die hohe Migrationstendenz der PDN ein großes Problem dar. In Studien wird von einer Migrationsrate von bis zu 35% berichtet [23]. Die meisten klinischen Erfahrungswerte bei Hydrogel Implantaten stammen von der von Dr. Charles Ray entwickelten PDN [20].

Dieser Überblick über die verschiedenen existierenden Systeme, deren unterschiedliche Materialien und Implantationstechniken zeigt, dass es zwar viele verschiedene Ansätze gibt, dass die jedoch derzeit auf dem Markt befindlichen Nucleusimplantate noch nicht den klinischen Bedürfnissen gerecht werden. Dementsprechend existieren bisher keine Langzeitstudien, die einen konkreten Vorteil einzelner Materialien sowie bestimmter Operationstechniken nachweisen können. Die anatomischen Verhältnisse wiederherzustellen und gleichzeitig biokompatibel zu sein, ist eine der Voraussetzungen für ein erfolgreiches Implantat. Diese Voraussetzungen werden bisher von Prothesen wie z.B. der PDN (Prosthetik Disc Nucleus) teilweise erfüllt. Das größte Problem jedoch, die Migration, ist noch nicht gelöst [6]. Postoperative Komplikationen können durch einen kleinen Zugang zum Operationsgebiet reduziert werden. Die richtige Indikationsstellung ist ein wesentlicher Schritt zum erfolgreichen Nucleusimplantat. Degenerative Instabilität, weitgehend intakte Begleitstrukturen und ein überwiegend intakter Anulus fibrosus sind die Voraussetzungen für eine Implantation [6, 24].

#### **1.4 Die gestrickte Titannucleusprothese der Fa. Buck & Co. GmbH**

Die gestrickte Titannucleusprothese der Firma Buck und Co. GmbH ist eine Innovation im Bereich der mechanischen Nucleusimplantate. Das Implantat hat die

Form einer Wirbelkörperdeckplatte und ist aus gestrickten, in sich verschlungenen Titanfäden aufgebaut (Abb. 7).



Abbildung 7: Die gestrickte Titannucleusprothese (aus Kettler, 2007) [23]

Nach Informationen vom Hersteller (Fa. Buck & Co. GmbH) werden in der Automobilindustrie gestrickte Stahlfäden schon seit längerer Zeit als Dämpfungselemente eingesetzt. Dieses Wissen über die exzellenten Dämpfungseigenschaften kombiniert mit der Biokompatibilität des Titans, waren ausschlaggebend für diese Neuentwicklung. Man erwartet, dass die Prothese die auf sie wirkende Last optimal im Segment verteilen und somit die physiologischen Dämpfungseigenschaften der Bandscheibe wiederstellen kann. Der Herstellungsprozess des Titangerüsts kann variiert und somit die Steifigkeit und die Dämpfungseigenschaften der Prothese individuell angepasst werden. Dies wird durch die Veränderung von Parametern, wie z.B. Durchmesser des Drahtes und der Pressung des Drahtgestrickes, erreicht. Die Implantatmigration stellt eines der relevantesten Probleme bestehender Nucleusimplantate dar. Diese soll durch die raue Oberfläche dieses Implantats kontrolliert werden.

Kettler et al. (2007) [23] untersuchten die neue gestrickte Titanprothese in einer Machbarkeitsstudie (Kadaverstudie). Man implantierte die Prothese in lumbale Bandscheiben vom Kalb und bestimmte verschiedene Parameter, wie z.B. die Migrationstendenz, axiale Steifigkeit, Flexibilität und den Höhenverlust. Dazu wurde ein anteriorer Zugang geschaffen, über den dann der Anulus fibrosus

fenestriert wurde. Der Nucleus pulposus und die knorpeligen Anteile der Deckplatten wurden entfernt, die Prothese implantiert und anschließend der Anulus fibrosus wieder vernäht. Nach Erfassung der Parameter wurde das Segment wieder eröffnet und auf Abrieb und Veränderungen im Implantatlager untersucht [23].

Die Machbarkeitsstudie zeigte nach Dauerbelastung vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Flexibilität und die axiale Verformbarkeit. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Prothese die Höhe der Bandscheibe optimal wiederherstellen kann. Defizite zeigten sich bei der Untersuchung der Flexibilität in Extensions- und Flexionsbewegungen. Diese waren nach Dauerbelastung bis auf das doppelte gesteigert. Man nimmt an, dass dieses erhöhte Bewegungsausmaß auf eine bereits nach der Implantation gesteigerte Lordose zurückzuführen ist. Eine weitere mögliche Erklärung hierfür ist die Schwächung des Anulus fibrosus bei der Implantation [23]. Durch eine optimierte Anpassung der Implantatgröße könnte dieses Problem behoben werden. Dieses Defizit gab es in der Seitenneigung nicht, denn diese konnte nach der Implantation fast vollständig wiederhergestellt werden. Mittels Röntgenbildern wurden sowohl die Migrationstendenz wie auch die Austreibung beurteilt. Es konnte keine Austreibung des Implantates provoziert werden. Jedoch konnte eine geringe Migration nachgewiesen werden. Diese war immer nach anterior gerichtet, was zum einen durch den anterioren Zugang und zum anderen durch die nach anterior geneigte Position des Implantats erklärt werden konnte. Die Migration wird im Vergleich zu bisherigen Studien bestehender Nucleusimplantate als gering eingeschätzt und kann zum Teil mit der mangelnden Erfahrung bei der Präparation des Implantatlagers und dem Fehlen von optimierten Operationsinstrumentarien erklärt werden. Nach Belastung wurden kleine Teile der Titanfäden im Bereich des Implantatlagers detektiert, welche zu unerwünschten immunologischen Reaktionen führen könnten. Der bei der Belastung entstehende Abrieb soll möglichst minimiert werden, um mögliche Abstoßungsreaktionen und weitere Reaktionen des Immunsystems zu vermeiden. Die vorangegangenen

Tests zu Materialermüdung und Abrieb bestätigen jedoch die Stabilität des verwendeten Materials [23].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die sehr guten biomechanischen Eigenschaften dieser neuen Nucleusprothese wesentlich sind für die Lösung des Migrationsproblems bestehender Implantate. Zugleich werden bei der Implantation durch einen gering invasiven Zugang umliegende Strukturen geschont, wodurch eine frühestmögliche Mobilisierung des Patienten angestrebt wird. Des Weiteren hat sich das verwendete Titan über Jahrzehnte in der Prothetik als sehr verträgliches Material erwiesen und zeichnet sich u.a. dadurch aus, dass es *in vitro* zu geringeren Zellirritationen als Gold oder Keramik führt [25]. Zudem bietet es den Vorteil der radiologischen Kontrolle [26].

### **1.5 Biokompatibilität/Immunkompatibilität**

Die Immunkompatibilität und die Biokompatibilität sind wesentliche Voraussetzungen für die Anwendung von Implantaten *in vivo* [17]. Die Biokompatibilität medizinischer Implantate bestimmt das Schicksal fast aller medizinischen Bauteile [27]. Als biokompatibel bezeichnet man in der Medizin Materialien und Produkte, die bei direktem oder indirektem Kontakt mit lebendem Gewebe keine Nebenwirkungen hervorrufen und den Stoffwechsel nicht beeinflussen. Es ist bekannt, dass medizinische Produkte eine Vielzahl von ungünstigen Gewebereaktionen hervorrufen, wie z.B. Entzündungen, Fibrosen, Infektionen und Thrombosen [27]. Um das Risiko dieser unerwünschten Reaktionen zu minimieren, muss auf die Auswahl des geeigneten Materials sowie die ideale Form und Applikationsweise geachtet werden. Zusätzlich sind neben den allgemeinen Anforderungen, wie der Auswahl eines biokompatiblen Materials, immer auch die individuellen Konstellationen, wie Vorerkrankungen, Alter und Allergien zu berücksichtigen. Die Fremdkörperreaktion des Organismus auf das Implantat, kann Auswirkungen auf die Biokompatibilität haben und ist somit beim Einsatz von Prothesen und Biomaterialien von entscheidender Bedeutung [28]. Die

Formen der Entzündungsreaktion gegenüber Implantaten lassen sich in eine Fremdkörperreaktion mit Granulationsgewebe, eine akute und eine chronische Entzündungsreaktion differenzieren [29].

Die immunologische Komponente spielt bei der Implantation von Prothesen immer eine wesentliche Rolle. Daher wird im Folgenden genauer auf das Immunsystem und die Interaktion mit dem implantierten Fremdkörper eingegangen.

## **1.6 Immunsystem**

Das Immunsystem stellt eine Antwort des Organismus auf körperfremde Stoffe dar, durch welche der Organismus versucht, sich vor Erkrankungen zu schützen. Das Immunsystem stellt einen Komplex aus Zellen und Molekülen dar, in welchem alle Mitglieder eine spezialisierte Rolle in der Verteidigung gegen Infektionen einnehmen [30]. Man differenziert ganz allgemein zwischen dem unspezifischen, angeborenen und dem spezifischen, erworbenen, oder adaptiven System. Einfache Organismen sind mit einem angeborenen Immunsystem ausgestattet. Höher entwickelte Lebewesen besitzen zusätzlich noch eine adaptive Immunantwort. Diese stellt einen komplexeren und effektiveren Abwehrmechanismus dar. Beide Systeme arbeiten üblicherweise eng zusammen, um Pathogene zu eliminieren [30]. Die angeborene Immunantwort agiert immer im selben Umfang unabhängig davon, wie oft es mit dem Antigen in Kontakt kommt. Hingegen wird die erworbene Immunantwort bei mehrmaliger Darbietung eines infektiösen Agens optimiert und angepasst. Die angeborene Immunantwort umfasst das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine und die Zytokine, wie z.B. die Interferone als molekulare Bestandteile [30]. Die phagozytierenden Zellen, wie die Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen, werden zum angeborenen Immunsystem gezählt (Abb. 8). Die antigenspezifischen B- und T-Zellen zählen zum adaptiven Immunsystem, wobei ihre Proliferation durch die Bindung bestimmter Oberflächenrezeptoren ausgelöst wird [30]. Zusätzlich zu deren Spezifität ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses ein

wesentliches Merkmal [31]. Die spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen präsentieren den Lymphozyten das Antigen und arbeiten mit diesen eng zusammen bei der Bekämpfung des Antigens [30]. Die B-Zellen produzieren antigenspezifische Antikörper, die für die Elimination extrazellulärer Mikroorganismen verantwortlich sind. Durch die Aktivierung von Makrophagen wirken die T-Zellen zum einen bei der Beseitigung von intrazellulären Pathogenen mit und zum anderen wirken sie über die Eliminierung virusinfizierter Zellen. Alle diese Zellen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen in der fetalen Leber und dem Knochenmark und zirkulieren dann überall in der extrazellulären Flüssigkeit [30]. Die unreifen T-Zellen wandern vom Knochenmark in den Thymus, wo sie ausreifen. Dazu im Gegensatz reifen die B-Zellen im Knochenmark aus. Eine adaptive Antwort des Immunsystems wird in der Milz, den Lymphknoten oder dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe ausgelöst [30]. Der Organismus besitzt unterschiedliche Ebenen der Verteidigung gegen Pathogene. Zunächst stellt die Körperoberfläche, die Haut und die Schleimhäute, mit den hier befindlichen Enzymen und Schleim eine Barriere für eindringende Substanzen dar. Jeder Organismus, der diese erste Barriere durchbricht, stößt direkt auf die sich anschließenden Verteidigungsebenen.

### **1.6.1 Die akute Entzündungsreaktion**

Die Infektion mit Krankheitserregern und anderen Fremdstoffen triggert eine akute Entzündungsreaktion, wobei sich die Zellen und Moleküle des Immunsystems in Richtung des betroffenen Ortes bewegen [30]. Durch die Aktivierung des Komplementsystems wird C3b gebildet, das dann an die Oberfläche der Erreger bindet [30]. Die folgende Komplementkaskade führt u.a. zur Freisetzung von Histamin, Prostaglandinen und Serotonin. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität und somit die Diapedese der Immunzellen ist die Folge. Die Rekrutierung der Entzündungszellen wird durch die Komplementfaktoren, Prostaglandine und Leukotriene vermittelt. Die aktivierten Neutrophilen folgen dem ,chemotaktischen

Gradient' und wandern durch das Gefäßendothel, um sich am Ort der Entzündung anzuhäufen, wo sie z.B. alle C3b markierten ‚Mikroben‘ phagozytieren [30].

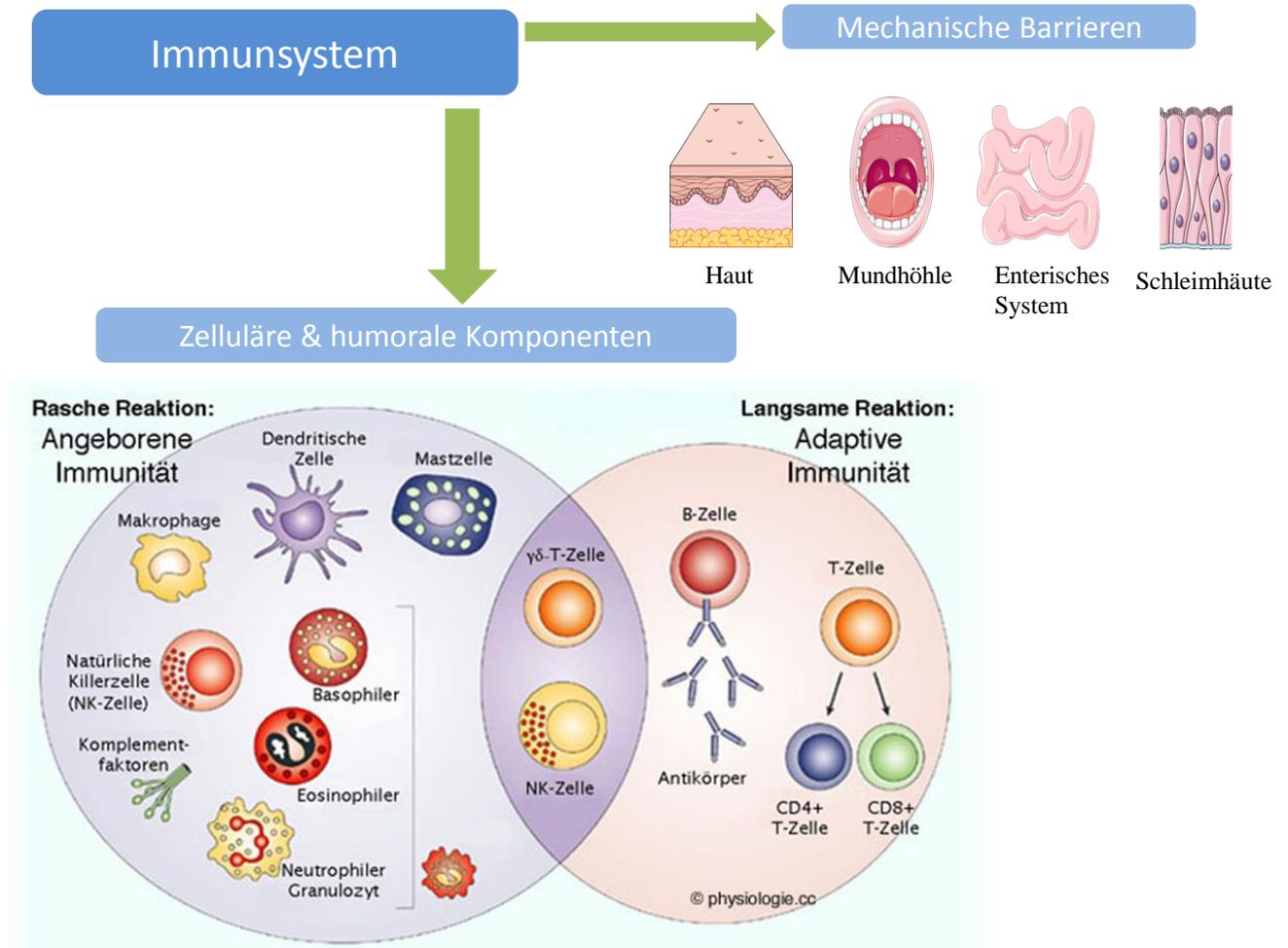


Abbildung 8: Überblick über das Immunsystem. (Quelle: [http://physiologie.cc/angeboren\\_adaptiv.jpg](http://physiologie.cc/angeboren_adaptiv.jpg), modifiziert mit „Slide kit Servier Medical Art“)

### 1.6.2 Das angeborene Immunsystem

Charakteristisch für das angeborene Immunsystem ist die schnelle Reaktion auf das Eindringen von Erregern innerhalb weniger Minuten. Das angeborene Immunsystem ist im Gegensatz zum spezifischen Immunsystem nicht in der Lage die Immunantwort auf eindringende fremde Substanzen anzupassen. Bestandteile sind zum einen die mechanischen und physiologischen Barrieren, die zellulären

Komponenten im Blut und in den Geweben, sowie die humoralen Bestandteile. Die mechanischen und physiologischen Barrieren sind die ersten Körperstrukturen, mit denen die fremden Substanzen in Kontakt treten. Beispiele hierfür sind die Haut, die Schleimhäute, der Speichel und die Magensäure. Die Zellen des angeborenen Immunsystems zirkulieren im Blut und befinden sich zusätzlich in unterschiedlichen Geweben, wo sie die eindringenden Zellen entweder direkt abtöten oder über Zytokine Abwehrzellen zum Angriffsort locken. Granulozyten, NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) und Makrophagen übernehmen dann die Aufgabe der Eliminierung. Sie gehören alle zur Gruppe der Leukozyten. Die spezialisierten Makrophagen können zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“ unterscheiden und sind zusätzlich zur Phagozytose befähigt [30]. Nach deren Aktivierung setzen sie eine Fülle von Botenstoffen frei, u.a. das Zytokin TNF- $\alpha$ , welches zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe und zu einer Aktivierung weiterer Zellen führt. Die Zytokine sind Peptidhormone, die die Funktion von Informationsvermittlern und Regulatoren des Immunsystems übernehmen. Sie regulieren z.B. die Synthese verwandter Interleukine und damit die Kommunikation körpereigener Abwehrzellen.

### **1.6.3 Das erworbene Immunsystem**

Die Besonderheit des adaptiven Immunsystems ist der Einsatz von antigenspezifischen Rezeptoren auf T- und B-Zellen, die eine zielgerichtete Immunantwort in zwei Phasen ermöglicht [32]. T- und B-Gedächtniszellen werden beim ersten Aufeinandertreffen mit dem Pathogen gebildet [31]. Die Entwicklung der Lymphozyten und der myeloiden Zellreihe aus ursprünglichen Stammzellen der fetalen Leber und dem Knochenmark, wird durch die Interaktion mit Stromazellen und Zytokinen gesteuert [30]. Naive Zellen haben noch keinen Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen gehabt. Die lymphatischen Gewebe bieten eine optimale Umgebung für den Kontakt zwischen Zelle und Antigen. Zusätzlich zu den T- und B-Zellen existieren in diesem Gewebe zum einen effiziente antigenpräsentierende Zellen und zum anderen werden die nötigen Zytokine zur Aufrechterhaltung der

Lymphozyten produziert. Als erster Schritt wird das Antigen den antigenspezifischen T- und B-Zellen präsentiert und von diesen erkannt [32]. Diese Präsentation führt zur Initiierung, Aktivierung und Differenzierung der Zellen [32]. Diese Vorgänge laufen im lymphatischen Gewebe, wie z.B. den Lymphknoten, ab. Als Zweites erfolgt die Zellantwort, d.h. es verlassen nun entweder die aktivierten T-Zellen das lymphatische Gewebe, um an den Ort der Entzündung zu wandern, oder die aktivierten B-Zellen, Plasmazellen, sezernieren die produzierten Antikörper ins Blut und die Gewebeflüssigkeiten [32].

#### **1.6.3.1 T- Zellen**

Die T-Zellen, als Teil der Leukozyten, werden im Knochenmark gebildet, wandern dann jedoch in den Thymus ein, wo ihre Reifung und Differenzierung stattfindet [30]. Sobald die Rezeptorausbildung stattgefunden hat, sind die T- und B-Zellen in der Lage, auf ihr Antigen zu reagieren und eine Immunantwort zu induzieren [32].

Wichtig ist die strenge Regulierung der Zellaktivierung, um sicherzustellen, dass nur schädliche Antigene eine Immunreaktion hervorrufen [32]. Im Thymus findet die positive und negative Selektion der T-Zellen statt. Die positive Selektion dient dem Überleben und der Proliferation funktionstüchtiger Zellen, d.h. den Zellen, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen. Bei nicht funktionstüchtigen Zellen wird Apoptose induziert. T-Zellen, die körpereigene Zellen angreifen, werden in einem zweiten Schritt ebenfalls eliminiert (negative Selektion).

#### **1.6.3.2 B- Zellen**

Beim Menschen entwickeln sich die B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark [31]. Entscheidend bei ihrer Entwicklung und Reifung ist die Ausbildung eines B-Zellrezeptors, mit dem sie in der Lage sind, Antigene zu erkennen. Einer der wesentlichen Unterschiede zwischen B- und T-Zellen liegt in der Produktion von Antikörpern und in der Erkennung von Antigenen. Die B-Zellen besitzen die Fähigkeit, Antigene direkt zu erkennen und zu binden, wohingegen die T-Zellen auf die Präsentation von Peptidfragmenten über MHC-Moleküle

angewiesen sind. Reife, aktivierte B-Zellen (Plasmazellen) produzieren Antikörper. Dies dient der Neutralisierung von Toxinen, der Aktivierung des Komplementsystems und der Opsonierung von Bakterien zur Phagozytose [32]. Nach der Internalisierung der Antigene folgt eine intrazelluläre Prozessierung. Anschließend erfolgt die Antigenpräsentation mittels des auf ihrer Oberfläche befindlichen MHC Moleküls. Dieser Komplex aus Antigen und MHC-Molekül kann nun den T-Zellen präsentiert werden [30].

### **1.7 Immunreaktionen durch Implantatabrieb**

Beim Einsatz von Implantaten (Keramik, Metall, Polyethylen, etc.) entstehen durch ausgiebige Belastung Abriebpartikel an der Oberfläche. Dieser Oberflächenabrieb limitiert den Einsatz insbesondere von Metallimplantaten [33, 34]. Die entstehende Menge an Abrieb variiert je nach Oberflächenmorphologie. Der Abrieb kann sich im umliegenden Gewebe anreichern oder auch von Makrophagen phagozytiert werden. Dies kann zu Entzündungsreaktionen des Gewebes führen [35]. Des Weiteren kann es durch diesen entzündlichen Prozess zu Osteolysen oder Veränderungen des Weichgewebes kommen, die sich zunächst noch symptomlos darstellen, aber durch Fortschreiten zu Implantatlockerungen, Frakturen, oder zum Bruch des Implantates führen können [34, 35].

Der Prototyp des hier untersuchten Titannucleusimplantats erzeugt bei Belastung eine erhebliche Menge an Abrieb. Dies kann teilweise auf die Oberflächenrauigkeit des Implantats zurückgeführt werden. Die Anzahl an produzierten Abriebpartikeln an der Metalloberfläche kann durch eine Elektropolitur signifikant reduziert werden. Sowohl beim Herstellungsprozess, wie auch der folgenden Elektropolitur, kommt es zum Einsatz von toxischen Substanzen, welche auf dem Drahtgerüst adhären können. Diese müssen nach der Politur wieder vom Implantat entfernt werden (Abb. 9).



Abbildung 9: SRB-Färbung, 4x Vergrößerung. (a) Abriebpartikel vor der Elektropolitur. (b) adhärierende Substanzen am Drahtgerüst; durch Pfeile (→) markiert. (c) gereinigtes, poliertes Drahtgerüst [36].

Um die Chemikalienrückstände effizient zu entfernen, wurde in unserem Institut ein spezifisches Reinigungsprotokoll entwickelt. Ist dieser Reinigungsprozess vollzogen, können keine Chemikalienrückstände mehr auf dem Drahtgerüst detektiert werden [36]. Der Reinigungsvorgang wird teilweise im Ultraschallbad durchgeführt. Die Drahtoberfläche wird seriell mit destilliertem Wasser, Triton X 100, Aceton (99%), Isopropanol und Ethanol (99%) gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Um Sterilität zu gewährleisten wird das Implantat noch 15 min bei 121°C autoklaviert [36].

## 2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit soll die Frage klären, ob die Reste der Chemikalien aus dem Herstellungsprozess, der Elektropolitur und der bei Belastung entstehende Abrieb, toxisch und/oder aktivierend auf die Immunzellen wirken. Weiterhin wird das Verhalten der Makrophagen gegenüber den Abriebpartikeln untersucht.

Im Folgenden wird der temporäre Ablauf der Bearbeitung dieser Fragestellung erläutert.

Um die Differenzierung der Zellen und die damit einhergehende Veränderung der Zellmorphologie zu untersuchen, werden Färbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM durchgeführt. Des Weiteren wird untersucht, ob die differenzierten Makrophagen die bei Belastung entstehenden Abriebpartikel phagozytieren. Anschließend folgt auf die Färbungen die Durchflusszytometrie. Diese dient der Quantifizierung der Veränderung von Zellgröße und der Granularität. Diese Methode wird eingesetzt, um eine Differenzierung der Zellen darzustellen und zu dokumentieren. Beim Herstellungsprozess und der anschließenden Elektropolitur des Implantats kommen verschiedene Substanzen zum Einsatz. Dazu zählen die Elektropolierflüssigkeit, das IP2 (Schmiermittel) und die Beize. Diese werden, ebenso wie der unter Belastung entstehende Abrieb, auf Ihre toxische Wirkung untersucht. Die Toxizitätstests werden mit den drei verschiedenen Zellreihen, Monozyten, Granulozyten und Makrophagen durchgeführt. Die Differenzierung, ob die eingesetzten Substanzen eine Apoptose oder eine Nekrose der Zellen auslösen, wird mittels DNA laddering untersucht. Bei dieser Methode können durch Apoptose entstandene DNA Fragmente mittels der Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden. Ob es durch die verwendeten Chemikalien und den Abrieb zu einer Aktivierung der Immunzellen *in vitro* kommt, wird mit einem TNF- $\alpha$ -ELISA untersucht. Das von den Immunzellen produzierte TNF- $\alpha$  wird bestimmt, da dieses einer der klassischen Entzündungsmarker ist. ROS (reactive oxygen species) spielen u.a. eine wichtige Rolle bei Reaktionen des Immunsystems. Ob die Inkubation der Zellen mit den Substanzen Stress induziert,

wird mit einer Fluoreszenzmessung bestimmt. Zur Quantifizierung des oxidativen Stresses wird eine Messung und Quantifizierung mittels des Substrats Dichlorofluoreszin Diacetat vorgenommen. Mit einem Monozytenaktivierungstest wird das Verhalten der Immunzellen im Vollblut untersucht. Hierbei werden die produzierten Mengen an TNF- $\alpha$  und IL-6 bestimmt. Der Vorteil bei der Untersuchung im Vollblut ist, dass Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellen beobachtet werden können. Zusätzlich wird die Reaktion der Zellen auf die verschiedenen Substanzen im Vollblut durch einen Zytokin Array untersucht. Dadurch kann die Expression von 38 verschiedenen Zytokinen untersucht werden.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalienliste

Tabelle 1: Chemikalienliste

Name	Hersteller
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Carl Roth GmbH
Calcein acetoxymethyl ester (Calcein AM)	Sigma Aldrich Co.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
ddH <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
Fetales Kalbserum (FCS)	Gibco™
Hoechst 33342	Sigma Aldrich Co.
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich Co.
Resazurin Natriumsalz	Sigma Aldrich Co.
Trypan Blue 0.5 %	Carl Roth GmbH
RPMI 1640	Sigma Aldrich Co.
PMA (Phorbol 12-myristate-13-acetate)	Abcam
Fluoromount G	Southern Biotech Inc.
Tween 20, Ph. Eur.	Carl Roth GmbH
Luminol	Carl Roth GmbH
p-Coumarinsäure	Carl Roth GmbH
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH
SDS Pellets	Carl Roth GmbH
Tris-Base	Sigma Aldrich Co.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma Aldrich Co.
Calcein Blue	Sigma Aldrich Co.

2-7 Dichlorofluorescein diacetate	Sigma Aldrich Co.
Methanol	VWR GmbH
Te (Tris EDTA)	Carl Roth GmbH
BSA (Albumin Fraktion 5)	Carl Roth GmbH
Trifast	PEQLAB GmbH
LPS	Sigma Aldrich Co.
Agarose Standard	Carl Roth GmbH

## Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchs- und Gebrauchsmaterial

Name	Hersteller
Kulturflaschen <ul style="list-style-type: none"> <li>• T25</li> <li>• T75</li> <li>• T175</li> </ul>	Greiner Bio One GmbH
Mikrotiterplatten <ul style="list-style-type: none"> <li>• 24 Well</li> <li>• 96 Well</li> </ul>	Greiner Bio One GmbH
Mikrotiterplatten <ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 Well</li> </ul>	Becton Dickinson GmbH
Heparinröhrchen	Sarstedt AG & Co.
Röhrchen (Tubes) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 15 ml Cellstar Tubes, graduated, conical bottom</li> <li>• 50 ml Cellstar Tubes, graduated, conical bottom</li> </ul>	Corning, New York NY USA
Coverslips	Carl Roth GmbH
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt Ag & Co.

Pipettenspitzen 1000 µl	Ratiolab GmbH
Pipettierwannen	VWR GmbH
Plastikküvetten	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml	Sarstedt AG & Co.
Reaktionsgefäße 50 ml	Sarstedt AG & Co.
Sterilfilter 0,20 µm	Sarstedt AG & Co.
Zellschaber, 20 mm	Sigma Aldrich Co.

## Geräteliste

Tabelle 3: Geräteliste

Name	Hersteller
Arktik Thermal Cycler	Thermo Scientific, Langenselbold Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio-Rad GmbH
Mikroskope: <ul style="list-style-type: none"> <li>• EVOS fl (Fluoreszenzmikroskop)</li> <li>• Primo Vert 12 V DC, 30 W</li> </ul>	Advanced Microscopy Group (AMG), Mill Creek USA Zeiss, Oberkoch Deutschland
Spektralphotometer <ul style="list-style-type: none"> <li>• Omega plate-reader</li> </ul>	Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg Deutschland
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Heraeus Fresco 17 Zentrifuge</li> <li>• Heraeus Megafuge 40R</li> </ul>	Thermo Scientific, Waltham MA USA
Inkubator: <ul style="list-style-type: none"> <li>• CO<sub>2</sub>-Inkubator C150</li> </ul>	Binder GmbH, Tuttlingen Deutschland
LSE Vortex Mixer	Corning, New York NY USA
Präzisionswaage PCB 250-3 Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen Deutschland
Kühlager: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Liebherr Comfort +4°C/-20°C</li> </ul>	Liebherr GmbH, Bulle

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forma 900 Series -80°C</li> </ul>	Deutschland Thermo Scientific, Waltham MA USA
Sterilbank: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Safe 2020, Class 2, EN 12469</li> </ul>	Thermo Scientific, Waltham MA USA
Pipetten: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 -2,5 µl Research Pipette Lambda plus</li> <li>• 0,5-10 µl Research Pipette Lambda plus</li> <li>• 10-100 µl Research Pipette Lambda plus</li> <li>• 50-200 µl Research Pipette Lambda plus</li> <li>• 100-1000 µl Research Pipette Lambda plus</li> </ul>	Corning, New York NY USA
Waagen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Laborwaage: Kern PCB 250-3</li> <li>• Feinwaage: Kern ABJ 120 4M</li> </ul>	Kern & Sohn GmbH, Balingen Deutschland
Wasserbad: <ul style="list-style-type: none"> <li>• AQUAline AL 25 inkl. Thermostat</li> </ul>	Memmert GmbH, Schwabach Deutschland
CyFlow CUBE8 Durchflusscytometer	Sysmex GmbH

## Software

Tabelle 4: Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
EndNote X7	Japone/Team LnDL, Thomas Reuters
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software Inc.
Image J 1.48v	Wayne Rasband, National Institutes of Health
Excel 14.0.7147.5001	Microsoft Office Home and Student 2010

Omega Plate reader Software	BMG Labtech GmbH
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 THP1-Zellen

Der Einsatz von THP-1-Zellen dient der Nachahmung der Funktion von Monozyten. Einer der wesentlichen Vorteile der THP-1-Zellen gegenüber primären Monozyten ist ihre gleichartige genetische Herkunft, wodurch die Spendervariabilität vermieden wird [37]. Schon seit 1977 gelten die Monozyten als die primären Zellen, die durch Abriebpartikel aktiviert werden und am ehesten für den Entzündungsprozess verantwortlich sind [38]. Zudem sind die THP-1-Zellen einfach zugänglich, wohingegen die Verfügbarkeit von primären humanen Monozyten limitiert ist [37]. Die Zellen werden im Kulturmedium (RPMI-1640-Medium, 10% FCS, 1% P/S) kultiviert. Vor der Verwendung des Mediums wird immer ein Mediumtest durchgeführt, um Kontaminationen vorzubeugen. Dazu werden drei Wells einer 24-Well-Mikrotiter-Platten mit einem Milliliter Medium gefüllt und für mindestens 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wird das Medium unter dem Mikroskop auf Kontaminationen untersucht. Das fertige Medium wird dann im Kühlschrank gelagert.

Ein Grund für die Wahl der THP-1-Zellen bzw. das von ihnen freigesetzte Zytokin TNF- $\alpha$  ist das Ergebnis der Studie von Schildberger et al., welche zeigte, dass eine Aktivierung von THP-1-Zellen zu einer signifikanten Ausschüttung von TNF- $\alpha$  führt [37] (Abb. 10). Es wurde die Zytokinfreisetzung von THP-1-Zellen, mononukleären Blutzellen (PBMC) und Monozyten nach der Stimulation mit LPS untersucht. Die Stimulation der THP-1-Zellen, PMBC und Monozyten mit LPS ergab ein vergleichbares TNF- $\alpha$  Expressionsmuster der Zellen mit einem Peak nach 4h und einer anschließenden Abnahme. TNF- $\alpha$  ist ein inflammatorisches Zytokin, welches von Makrophagen und Monozyten während einer akuten Entzündungsreaktion

freigesetzt wird [39, 40]. Das Zytokin ist für unterschiedlichste Signalereignisse zwischen den Zellen verantwortlich und leitet die Nekrose oder Apoptose ein [39]. Eine der Hauptfunktionen ist die Regelung der Aktivität von Immunzellen.

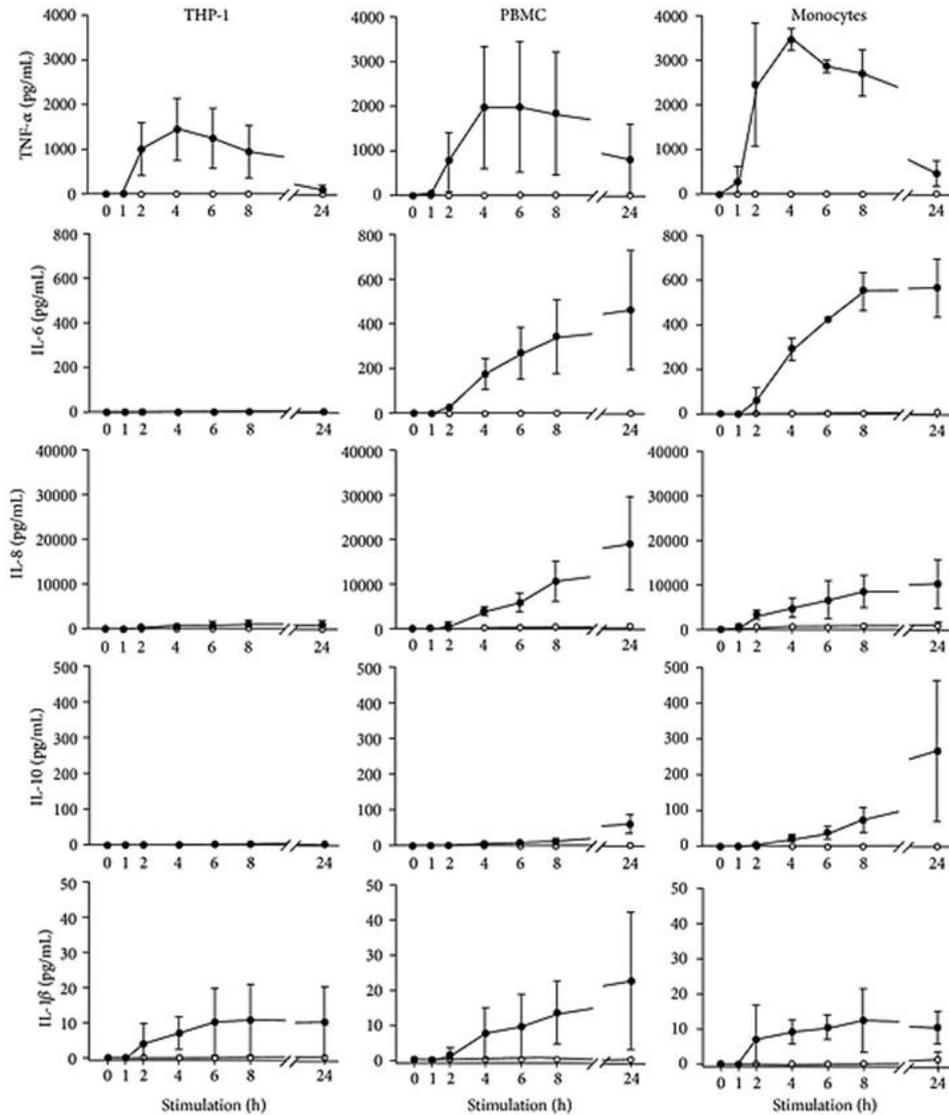


Abbildung 10: Messung der Zytokinfreisetzung (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, und IL-1 $\beta$ ) durch Stimulation mit 10 ng/ml LPS von THP-1-Zellen, PBMC und Monozyten. Eine Millionen Zellen pro Milliliter (n = 3) [37].

TNF- $\alpha$  spielt bei diversen therapeutischen Prozessen im Körper eine Rolle, hierzu zählen u.a. die Immunostimulation, die Abwehr gegen infektiöse Agentien und gegen Krebs, die Regulation des Schlafes und die Embryonalentwicklung [39, 41-43]. Diesem Zytokin wird eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort zugeschrieben. TNF- $\alpha$  ist ebenso entscheidend bei der Auslösung von Fieber, Induktion des septischen Schocks, Autoimmunkrankheiten, Rheumatoide Arthritis, Entzündungen und Diabetes. Es sind weitere Effekte auf die endotheliale Funktion, die Koagulation und den Fettstoffwechsel beschrieben [44]. THP-1-Zellen zeigten keine Freisetzung von IL-6 und IL-10, wohingegen IL-6 und IL-10 von Monozyten und PBMC freigesetzt wurde. Zudem wurde von den THP-1-Zellen deutlich weniger IL-8 freigesetzt als von den Monozyten und PBMC [37].

### **3.2.2 Differenzierung von THP1-Zellen zu Makrophagen durch PMA**

Makrophagen entwickeln sich aus den im Knochenmark gebildeten Monozyten. Nach deren Differenzierung entwickeln sie sich zu langlebigen und spezialisierten Zellen [45]. Sie sind Teil der zellulären Immunantwort. Monozyten zirkulieren im Blut und wandern unter dem Einfluss von Zytokinen und Antigenen ins Gewebe und differenzieren dort zu Makrophagen. Zu den Hauptaufgaben der Makrophagen gehört die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und die Reaktion auf Mikroorganismen [45]. Es ist erwiesen, dass PMA ein künstlicher Stimulator für die Monozyten – Makrophagen Differenzierung ist [46]. Durch die Wirkung von PMA wird die Proliferation von THP-1-Zellen gestoppt und die Zellen differenzieren zu Makrophagen [46]. Der Einsatz von PMA induziert ein starkes Ausmaß an Differenzierung in THP-1-Zellen, was mit einer starken Adhärenz und einer erhöhten Expression an Oberflächenmarkern sowie der Makrophagendifferenzierung verbunden ist [45]. Die Differenzierung zu Makrophagen ist z.B. an der Reduktion der Kern/Plasma Relation und einer dazu passenden Erhöhung des Zytoplasmas zu erkennen. Die Behandlung mit PMA

erhöht ebenfalls das Zytoplasmavolumen der THP-1-Zellen im Verhältnis zu Monozyten [45]. Bei den Versuchen werden die THP-1-Zellen deshalb immer 24 Stunden vor der Inkubation mit den verschiedenen Substanzen mit PMA (200 nM) versetzt und dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Kultiviert werden die Zellen im Kulturmedium (RPMI-1640-Medium, 10% FCS, 1% P/S).

### **3.2.3 HL-60-Zellen**

Eine herausragende Eigenschaft der HL-60 Zellen ist die Fähigkeit, sich *in vitro* in viele unterschiedliche Zelltypen der myelomonozytischen Linie zu differenzieren, z.B. durch Gabe von DMSO zu Granulozyten [47]. Die Zellen werden im Kulturmedium (RPMI-1640 Medium, 10%FCS, 1% P/S, DMSO) kultiviert. Die Granulozyten werden als Teil des Immunsystems als eigenständige Zellreihe untersucht. Auf der Oberfläche der HL-60-Zellen befinden sich spezielle Rezeptoren, die entscheidend für die proliferative Kapazität sind [47]. Dazu gehören die Insulin- und Transferrinrezeptoren. Diese Rezeptoren sind charakteristisch für ein kontinuierliches Wachstum der HL-60-Zellen in Suspension [47]. HL-60-Zellen können auch in nährstofffreiem Medium, z.B. RPMI-1640, proliferieren, vorausgesetzt es ist Transferrin oder Insulin zugesetzt [47]. Jedoch kann die Expression der Rezeptoren nicht alleine für die ungewöhnliche Proliferation der Zellen verantwortlich gemacht werden, da es auch eine gewisse Zahl von Zellen gibt, die Rezeptoren exprimieren, jedoch kein kontinuierliches Wachstum in Zellkultur aufweisen [47]. Es wird eine Verdopplungszeit von 36 bis 48 Stunden beschrieben. Anders als die morphologische Veränderung der unreifen Promyelozyten weisen die reifen Zellen nach der Behandlung mit DMSO die Fähigkeit zur Phagozytose auf [48]. Der Zusatz von induzierenden Agenzien zu den HL-60-Zellkulturen, wie DMSO, führt zu einer deutlichen Erhöhung der spontanen Differenzierungsrate [47]. Die meisten Zellen erwerben bei der Differenzierung morphologische, funktionelle, enzymatische und Oberflächenantigen-Eigenschaften von reifen Granulozyten. Eine Vielzahl von Agenzien induziert die Differenzierung von HL-60-Zellen zu Granulozyten, z.B.

DMSO oder Retinsäure [47]. Die genaue Wirkungsweise der Induktoren ist nicht bekannt. Für eine Differenzierung der Zellen ist eine Mindestexpositionsdauer der Induktoren von 12 Stunden notwendig [47]. In Abwesenheit von DMSO sind HL-60-Zellen überwiegend Promyelozyten mit großen runden Zellkernen, die jeweils 2 bis 4 Nukleoli enthalten [48]. Bei diesen Promyelozyten erkennt man eine hohe Zellkern/Zytoplasma Relation. Die Zugabe der entsprechenden Menge an DMSO induziert bei der Mehrheit der Zellen eine auffallende morphologische Veränderung, die charakteristisch für die Differenzierung von myeloiden Zellen ist [48]. Die induzierten Zellen zeigen folgende Veränderungen: kleinere Größe, eine verminderte Zellkern/Zytoplasma Relation, weniger zytoplasmatische Granula und deutliche Einbuchtungen, Faltung und Segmentierung der Zellkerne [48] (Abb. 11).

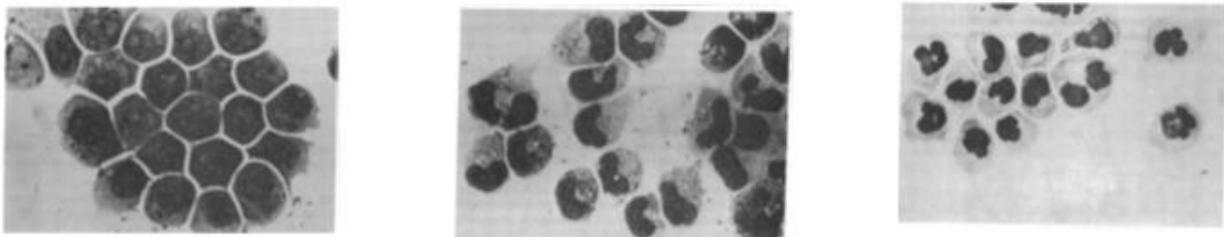


Abbildung 11: Differenzierung der HL-60-Zellen durch die Induktion mit DMSO. Morphologische Veränderungen wie verminderte Zellgröße, verminderte Zellkern/Zytoplasma Relation und deutliche Einbuchtungen sind erkennbar [48].

### 3.2.4 Zellzahlbestimmung mit Trypanblau

Um standardisierte Bedingungen zu gewährleisten, wird zur Bestimmung der Zellzahl, die Trypanblau Methode angewendet. Ziel ist es, eine Zellsuspension herzustellen, die eine Million Zellen pro Milliliter enthält. Der Farbstoff Trypanblau ist nicht zellwandpermeabel und färbt damit tote Zellen blau, lebende hingegen werden nicht gefärbt. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes (2 ml), 10  $\mu$ l Zellsuspension und 30  $\mu$ l Trypanblau (0,125%) (Verdünnung 1:4), werden vor der Zählung gut gemischt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Am Mikroskop wird das 10er Objektiv eingestellt, da mit diesem ein ganzes Eckquadrat ausgezählt werden kann. Da die Eckquadrate eine definierte Fläche von 1 mm<sup>2</sup> haben, ergibt sich ein

Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{l}$ . Dann werden die lebenden Zellen ausgezählt. Die ausgezählte Zellzahl von 4 Eckquadraten wird mit  $10^4$  multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten (Abb. 12). ( $10^4 * 0,1 \text{ }\mu\text{l} = 1 \text{ ml}$ )

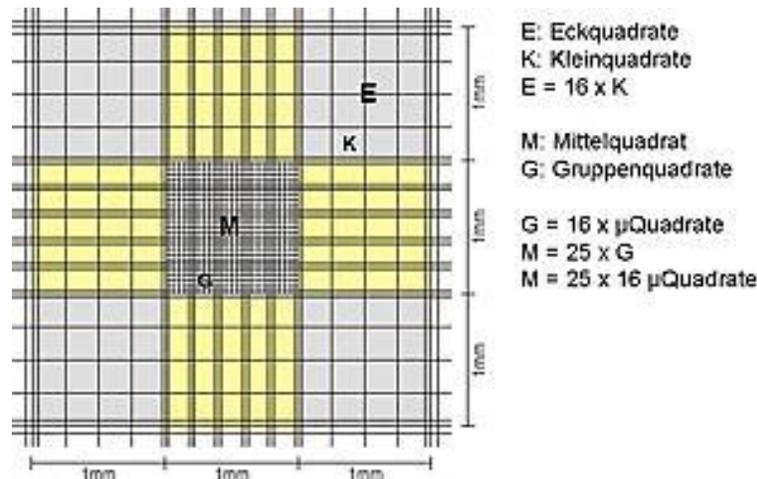


Abbildung 12: Zellzahlbestimmung mit Trypanblau (Quelle: <http://www.incelligence.de/zellkultur/zellzaehlung/zellzaehlunganleitung>)

### 3.2.5 Fluoreszenzfärbung

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen photophysikalischen Prozess. Hierbei kommt es nach Anregung eines Elements zur spontanen Emission von Licht. Durch Absorption von Photonen liegt das Element kurzzeitig in einem angeregten Zustand vor. Durch diese Absorption werden Elektronen in ein energetisch höheres Niveau versetzt. Beim Abfallen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau kommt es zur Emission von Wärme und elektromagnetischer Strahlung [49, 50]. Die Wellenlänge des ausgesandten Lichts ist größer, also energieärmer, als die des absorbierten Lichts [50].

Die Fluoreszenzfärbung wird angewendet, um die Morphologie und die Zellstrukturen mit dem Fluoreszenzmikroskop (EVOS fl) zu untersuchen. Diese Methode weist sehr gute Ergebnisse bei der Darstellung des Zellkerns und des Zytoplasmas auf. Calcein AM ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zellmembranpermeabel ist und somit in lebende Zellen transportiert wird. Nach

dem Transport in die Zelle wird Calcein AM durch Esterasen umgesetzt und bindet an Calciumionen. Diese Komplexbildung führt zu einer grünen Fluoreszenz. Hoechst 33342 ist ein Fluoreszenzfarbstoff und wird zur Anfärbung der DNA genutzt [51]. Der Farbstoff ist zellwandpermeabel und somit in der Lage, die DNA (Zellkern) anzufärben [52].

Durchführung:

Es werden 2 ml einer Zellsuspension in ein Well einer 24-Well-Mikrotiter-Platte pipettiert. Dazu werden 2 µl Calcein AM (2 µM) und 2 µl Hoechst (2 ng/ml) pipettiert. Die 24-Well-Mikrotiter-Platten wird 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe wird mit dem Fluoreszenzmikroskop (EVOS fl) kontrolliert (bei schwacher Färbung wird die Inkubationszeit auf 30 min verlängert). Anschließend wird der Inhalt des Wells in ein Reaktionsgefäß (2 ml) pipettiert. Dieses wird nun 10 Minuten zentrifugiert (600 g). Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet mit wenigen Mikrolitern THP-1-Medium resuspendiert. Ein Tropfen der Lösung wird auf ein Deckglas (20\*20 mm) pipettiert und es erfolgt ein Ausstrich, welcher dann luftgetrocknet wird. Auf einen Objektträger wird ein Tropfen Fluoromount-G pipettiert. Das Deckglas mit dem luftgetrockneten Ausstrich wird nun mit einer Pinzette umgekehrt (Ausstrich nach unten) auf den mit Fluoromount bedeckten Objektträger gelegt. Wichtig ist hierbei, dass das gesamte Deckglas mit Fluoromount benetzt ist. Der Objektträger kann jetzt mit dem Fluoreszenzmikroskop (EVOS fl) mikroskopiert werden. (Vergrößerung 100x)

Ob die durch DMSO zu Makrophagen differenzierten HL-60-Zellen die Abriebpartikel des Implants phagozytieren, wird nun untersucht. Dazu werden die Makrophagen mit den Abriebpartikeln für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit dem EVOS fl Mikroskop dokumentiert und analysiert.

### 3.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie hat sich in der Labordiagnostik als unverzichtbare Spezialmethode durchgesetzt [53]. Die Zellen durchlaufen einen Laserstrahl, was zu einer Emission von optischen Signalen führt. Das entstehende Streulicht wird dann von einem Detektor aufgenommen und ausgewertet. Je größer die Zelle ist, desto mehr Licht wird gestreut. Die Zellen mit rauer Oberfläche und großem Zellkern streuen mehr Licht als Zellen mit einer glatten Oberfläche. So werden die Größe und die Granularität der Zelle bestimmt. Die Durchflusszytometrie öffnet den Weg sowohl für die prädiktive Medizin wie auch für die vorhersagende Zytopathologie und Zytologie in der alltäglichen Klinik und medizinischen Praxis [54]. Für die Durchführung der Durchflusszytometrie wird der ‚CyFlow CUBE8‘ von Sysmex verwendet (Abb. 13).



Abbildung 13: Durchflusszytometer (CyFlow CUBE8, Sysmex) (Quelle: [www.sysmex-europe.com](http://www.sysmex-europe.com))

Es werden jeweils 2000 Zellen gemessen. Verwendet wird das Vorwärtsstreulicht (Forward Light Scatter, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) (Abb. 14). Das Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Zelloberfläche/-größe. Das Seitwärtsstreulicht spiegelt die Zellgranularität wider.

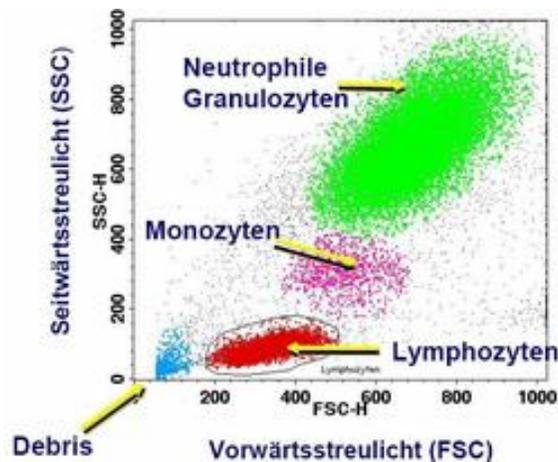


Abbildung 14: Durchflusszytometrie. Als Debris werden rote Blutzellen, tote Zellen und Zellfragmente bezeichnet. Neutrophile Granulozyten sind groß und besitzen viel Granula. Monozyten sind groß und besitzen wenig Granula. Lymphozyten sind klein und besitzen kaum Granula. (Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam MVZ GbR 12247 Berlin-Steglitz) (Quelle: [www.inflammatio.de/clinical-trials/cell-analyses-by-facs/das-testprinzip-der-durchflusszytometrie.html](http://www.inflammatio.de/clinical-trials/cell-analyses-by-facs/das-testprinzip-der-durchflusszytometrie.html))

Neben der Granularität und Zellgröße, wird die Zellkerngröße und Rundheit mikroskopisch bestimmt. Diese Parameter werden mit GraphPad Prism bestimmt und visualisiert. So gelingt der Vergleich von monozytischen, myelozytischen und granulozytischen Zellen. Die Analyse erfolgt mit dem Programm ImageJ. Zur Bestimmung der Rundheit der Zellen wird der Zelldurchmesser manuell bestimmt (Länge einer Gerade). Zur Bestimmung der Zellkerngröße und des Zellvolumens wird das Plugin ‚particle count‘ verwendet.

### 3.2.7 Toxizitätstest

Die eingesetzten Chemikalien und der unter Belastung entstehende Abrieb werden auf Ihre toxische Wirkung gegenüber den Zellreihen untersucht. Die Toxizitätstests werden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen durchgeführt und somit die  $LC_{50}$  (mittlere letale Konzentration) bestimmt. Sie ist die Konzentration, bei der 50% der Versuchsorganismen innerhalb des Beobachtungszeitraumes sterben (hier: 24 h). Es werden THP-1-Zellen, THP-1 + PMA und HL-60-Zellen +

DMSO verwendet. Die Toxizität von Substanzen, die Zellviabilität sowie die Zellproliferation können mit dem Redoxfarbstoff Resazurin indirekt bestimmt werden. Durch die Metabolisierung des Farbstoffes Resazurin zu dem Farbstoff Resorufin kann die mitochondriale Aktivität der Zellen und somit die Zellviabilität nachgewiesen werden [47] (Abb. 15). Die Reproduzierbarkeit und fehlende Zytotoxizität sind Vorteile des Farbstoffes. In der Fluoreszenzmessung wird mit Hilfe der Emission bei 590 nm und einer Anregungswellenlänge von 530-560 nm die Zellzahl bestimmt. Zur Fehleinschätzung der Zellzahl könnte es durch einen verstärkten Abbau des Farbstoffes und dessen Akkumulation kommen [47].

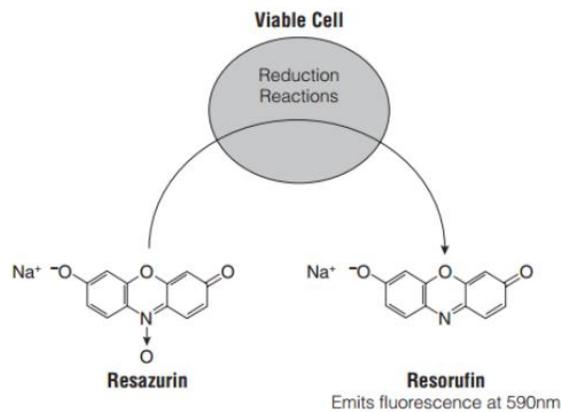


Abbildung 15: Zellviabilitätstestung mit Resazurin (Quelle: www.promega.com)

## Durchführung

Die Zellen werden auf 96-Well-Mikrotiter-Platten ausplattiert und mit abnehmenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen versetzt. Die THP-1-Zellen + PMA werden vor der Stimulation 24 h inkubiert bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Es wird versucht, jegliche Kontamination der Zellsuspensionen und der 96-Well-Mikrotiter-Platten zu vermeiden, daher werden die folgenden Arbeitsschritte soweit möglich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellsuspensionen aus den

Kulturflaschen (T175) werden in Reaktionsgefäße (50 ml) pipettiert. Die Reaktionsgefäße werden bei 600 g für 10 min zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet, das im Reaktionsgefäß verbleibt wird mit 10 ml Medium (THP-1) resuspendiert. Zur Verteilung der Zellen im Medium wird das Reaktionsgefäß leicht geschüttelt. Dann werden 10 µl der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß (2 ml) pipettiert und mit 30 µl Trypanblau (0,125%) versetzt (Verdünnung 1:4). Der Farbstoff wird mit einer 100 µl Pipette gleichmäßig verteilt. Nun werden die Zellen nach der ‚Methode von Neubauer‘ gezählt. In den folgenden Versuchen befinden sich im Zielansatz 1.000.000 Zellen in 1 ml. Die Anzahl der lebenden Zellen wird wie folgt berechnet.

Rechnung:

*Anzahl ausgezählter Zellen* \* 10<sup>4</sup> Zellen/ml

$$\frac{\text{Anzahl ausgezählter Zellen}}{1000000} = x \quad ; \quad \frac{1}{x} = y$$

*y \* 4 ml = Volumen der zu verwendenden Zellsuspension in ml*

*4 ml – Volumen der zu verwendenden Zellsuspension in ml  
= Volumen des des zuzugebendenen Mediums*

Die 96-Well-Mikrotiter-Platten werden für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit den verschiedenen Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen (Tabelle 5) inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit werden die 96-Well-Mikrotiter-Platten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Resazurin versetzt. 10 µl Resazurin (0,25% in PBS) wird in jedes Well pipettiert und dann wird die 96-Well-Mikrotiter-Platten 1 h inkubiert, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation erfolgt die Endpoint-Messung mittels des Omega Platereaders (ex/em = 544/590 nm). Die Stimulations- und

Inkubationszeiten wurden exakt eingehalten, um stets standardisierte Bedingungen zu gewährleisten. Zur Berechnung wird in der Excel Datei dann der Hintergrund abgezogen und der Mittelwert der Kontrolle gleich 100% gesetzt.

Tabelle 5: Konzentrationen der Substanzen für die Toxizitätstests

<b>IP2</b>	<b>EpOLF</b>	<b>Beize</b>	<b>Abrieb</b>
10%	0,3%	0,2%	10%
5%	0,15%	0,1%	5%
2,5%	0,075%	0,05%	2,5%
1,25%	0,0375%	0,025%	1,25%
0,625%	0,01875%	0,0125%	0,625%
0,3125%	0,009375%	0,00625%	0,3125%
0,15625%	0,0046875%	0,003125%	0,15625%

Untersucht wird die Toxizität folgender Substanzen:

- IP2, welches als Schmiermittel beim Pressen des Implantatdrahtes zum Einsatz kommt
- Elektropolierflüssigkeit, welche bei der Elektropolitur des Implantatdrahtes verwendet wird
- Beize, die zur Oberflächenbearbeitung des Implantatdrahtes vor der Elektropolitur eingesetzt wird
- Abriebpartikel, die bei Belastung des Implantats entstehen

### **3.2.8 DNA laddering**

Das DNA laddering ist eine zuverlässige Methode, um zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden. Die durch Apoptose entstandenen DNA Fragmente können nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese anhand von DNA laddering

visualisiert werden. Bei der Agarosegelelektrophorese wird die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld ausgenutzt. Die Porengröße des Gels und die Masse der Fragmente bestimmen die Wanderungsgeschwindigkeit und die Wanderungstrecke der Moleküle. Nach der Auftrennung der Fragmente werden diese durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die DNA Basen und kann mittels UV-Licht nachgewiesen werden. So können im Gel helle, vorhandene DNA von dunklen Bereichen ohne DNA, unterschieden werden. Die DNA ist negativ geladen und wird von den Agarosemolekülen gebunden. Bei hohen Temperaturen haben die Agarosemoleküle eine ungeordnete, gewundene Struktur [55]. Bei Abkühlung bilden die Agaroseketten helikale Faserbündel, die durch nichtkovalente Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden [55]. Bei weiterer Temperaturabsenkung tritt die Verfestigung und somit die Gelbildung ein.

Die herkömmliche Methode des DNA ladderings weist einige Mängel, wie z.B. Verlust von DNA Fragmenten während des Prozesses, viele verschiedene Teilschritte und die Verwendung von teuren Reagenzien auf [56]. Arakawa beschreibt in seiner Studie eine schnelle, leicht durchzuführende und kosteneffektive Methode, um DNA Fragmente zu detektieren [57]. Die angewendete Methode zeigt eine erhebliche Verbesserung in Bezug auf die Anfälligkeit beim Verlust von DNA Fragmenten [56]. Ein Bestandteil des Lysepuffers ist DMSO. Dieses inhibiert die Nukleasenaktivität, was zu einer Reduzierung falscher DNA Fragmentierung während der Probenverarbeitung führt [56, 57].

### **3.2.8.1 Apoptose**

Bei der Apoptose handelt es sich um einen programmierten Zelltod. Sie ist ein streng regulierter zellulärer Prozess, welcher zur Aktivierung von unterschiedlichen biochemischen/molekularen Kaskaden führt [56]. Der Entzug von Wachstumsfaktoren und UV Strahlung können die Apoptose induzieren [58]. Exogene und endogene Stimuli wie ultraviolette Strahlung, oxidativer Stress und genotoxische

Chemikalien triggern die in biologischen Systemen essentielle Apoptose [58]. Der programmierte Zelltod ist ein entscheidender Faktor, sowohl bei der Ausbildung des Immunsystems, als auch bei diversen Erkrankungen. Bei vielen menschlichen Leiden, wie neurodegenerativen Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten, ischämischen Schäden und vielen Krebsarten spielt inadäquate Apoptose eine Rolle [59]. Typische histologische Merkmale der Apoptose sind der Volumenverlust der Zelle, Blasenbildung der Plasmamembran, Kondensation des Chromatins und der Zerfall des Zellkerns [60]. Im Gegensatz zur Nekrose führt die Apoptose nicht zu einer Entzündungsreaktion [61].

### **3.2.8.2 Nekrose**

In der jüngsten Literatur wird die Nekrose als der unregelmäßige Zelltod bezeichnet [60]. Nekrose ist ein unkontrollierter und passiver Prozess, der gewöhnlich eine große Anzahl von Zellen betrifft. Änderungen der äußeren physiologischen Umstände, wie chemische Faktoren, pH-Wertveränderungen oder Sauerstoffmangel können zur Nekrose führen [60]. Zur Nekrose führen zwei wesentliche, unterschiedliche Mechanismen: zum einen die Beeinflussung der Energieversorgung und zum anderen der direkte Zellmembranschaden [59]. Zu den ersichtlichsten morphologischen Veränderungen, die mit der Nekrose einhergehen, zählen die Zellschwellung, angeschwollene oder rupturierte Mitochondrien, zerrissene Membrane der Organellen, aufgetriebenes Endoplasmatisches Retikulum und letztendlich das Zerreißen der Zellmembran [59, 62, 63]. Der Verlust der Membranintegrität führt zur Freisetzung von zytoplasmatischem Inhalt in das umgebende Gewebe und damit schließlich zur Rekrutierung von Entzündungszellen durch die Entsendung chemotaktischer Signale [59]. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion.

Ob die mit dem Implantat in Beziehung stehenden Substanzen in den verwendeten Zellreihen eine Apoptose oder Nekrose hervorrufen, wird mit der DNA laddering Methode untersucht. Durch die Toxizitätstests ist der EC<sub>50</sub>-Wert der Substanzen aus dem Herstellungsprozess und der Elektropolitur bekannt. Die Konzentration

der Substanzen wird auf die jeweilige Zellreihe abgestimmt und liegt knapp unter dem EC<sub>50</sub>-Wert. Es werden Monozyten, Makrophagen und Granulozyten untersucht. Um die Unabhängigkeit zu gewährleisten, werden von jeder Zellreihe vier unterschiedliche Ansätze verwendet, wobei der Zielansatz 1.000.000 Zellen/ml beträgt. Nach der Zellzählung mit der ‚Methode nach Neubauer‘ werden zwei 48-Well-Mikrotiter-Platten mit den verschiedenen Ansätzen der Monozyten und Granulozyten versetzt. Die Makrophagen werden in vier 6-Well-Mikrotiter-Platten angesetzt, da diese den adhärierenden Zellen eine größere Oberfläche bieten. Die Stimulation der Zellen erfolgt über zwei verschiedene Inkubationszeiten, 24 Stunden und 90 Minuten. Unstimulierte Zellen dienen als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle für die Apoptose wird Methanol in 1:10-Verdünnung verwendet. Die Zellen werden 40 Minuten inkubiert.

Tabelle 6: Konzentrationen über dem EC-<sub>50</sub> Wert

<b>Zellreihe</b>	<b>Monozyten</b>	<b>Makrophagen</b>	<b>Granulozyten</b>
<b>Konzentration Epol.FI.</b>	0,1%	0,1%	0,1%
<b>Konzentration Beize</b>	0,03%	0,08%	0,08%
<b>Konzentration IP2</b>	5%	5%	10%
<b>Konzentration Abrieb</b>	10%	10%	10%

Nach der Inkubation werden die Inhalte der Wells in Reaktionsgefäße (2 ml) pipettiert. Diese werden bei 600 g 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der klare Überstand abgenommen. Anstelle der Zellyse über Nacht wie bei der konventionellen Methode, werden 100 µl DMSO direkt auf das Zellpellet pipettiert und dann sofort „gevortext“ [56]. Ebenfalls werden 100 µl eines 2%-igen SDS TE Puffers (pH 7.4) dazugegeben und „gevortext“ [59]. Die Lösung wird zentrifugiert (13000 g, 10 Minuten) und in der Folge der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß (2ml) überführt. Um einen einheitlichen Nukleinsäuregehalt der Proben zu gewährleisten, wird dieser mit Hilfe des Platereaders bestimmt. Hierbei werden die Programme „LVIS DUST CHECK“ (500 nm) und LVIS

DNA“ (260 nm, 280 nm) des Plateraders verwendet. Anschließend wird mittels Gelelektrophorese die Analyse der DNA durchgeführt. Das Agarosegel setzt sich aus 100 ml TBE-Puffer (TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer), 1,7 g „Agarose Standard“ und 7,5 µl Ethidiumbromid zusammen. Das Gel wird mit insgesamt 20 µl Probe pro Gelkammer beladen, diese setzen sich aus 4 µl Ladepuffer und 16 µl Probe zusammen. Die Laufdauer beträgt 60 min bei 80 V angelegter Spannung. Mittels „INTAS“ wird die UV Spektroskopie durchgeführt und das Gel dokumentiert. Dabei wird der an die DNA bindende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid mittels UV Licht sichtbar gemacht und das Gel mit der CCD-Kamera fotografiert.

### **3.2.9 Phagozytose**

Mit der Stimulation der HL-60-Zellen gelingt die Differenzierung zu Makrophagen. Die Phagozytose von Abriebpartikeln spielt bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle [35]. Nun wird untersucht, ob die differenzierten Makrophagen die Abriebpartikel des Nucleusimplantats aufnehmen. Dazu werden die Makrophagen mit den Metallpartikeln für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Dokumentation und anschließende Analyse wird mit dem EVOS fl Mikroskop durchgeführt.

### **3.2.10 ELISA**

Ziel des ELISA Tests ist es, vorhandenes bzw. produziertes TNF-α nachzuweisen. Dieses Zytokin spielt sowohl bei der Entzündungsreaktion, wie auch bei der Immunreaktion des Organismus eine entscheidende Rolle [38, 40]. Beim Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) macht man sich die spezifische Erkennungsreaktion zwischen Antigen und Antikörper zunutze. Diese Reaktion wird dann mit einer Chemolumineszenzreaktion gekoppelt. Dieser Test ist ein Nachweisverfahren, welches mit Hilfe von Antikörpern in der Lage ist, Proteine, Viren, Hormone oder auch Toxine nachzuweisen. Es werden zwei spezifische Antikörper verwendet, die jeweils an unterschiedliche Epitope des Antigens binden.

Durch eine Lumineszenzmessung wird der Umsatz von an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzymen mit dem Platerader gemessen.

An Tag 1 wird eine 96-Well-Mikrotiter-Platte (ELISA) vorbereitet (Abb. 16). Dazu wird jedes Well mit 50 µl einer Lösung aus PBS und ‚capture TNF-α‘ versetzt (Verdünnung ‚capture‘ 1:100). Diese Platte wird über Nacht bei RT auf den DRS-12 Wippschüttler gestellt (Inkubationszeit ~12 h). Zudem werden der Waschpuffer, der Blockpuffer und das Verdünnungsmittel angesetzt. Der Waschpuffer besteht aus 0,05% Tween-20 in PBS. Der Blockpuffer ist zusammengesetzt aus 1% BSA in PBS und das Verdünnungsmittel ist eine Mischung aus Waschpuffer und Blockpuffer (10:1). Der Blockpuffer und das Verdünnungsmittel müssen im Kühlschrank gelagert werden. Der Tag 2 beginnt mit viermaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer. Dann folgt eine einstündige Blockade von unspezifischen Bindungsstellen mit Blockpuffer. Nun wird wieder viermal mit Waschpuffer gewaschen. Bei der Inkubation mit dem Standard-Antikörper wird mit einer Verdünnung von 1:500 (‚TNF-α standard antibody‘: Verdünnungsmittel) begonnen. Dann folgt eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:2. Im letzten Well befinden sich jeweils nur Verdünnungsmittel oder THP-1 Medium zur Kontrolle. Die Inkubation erfolgt mit 50 µl pro Well für 120 Minuten. Es folgen vier weitere Waschschrte mit Waschpuffer. Nun werden 50 µl des ‚detection antibody‘ mit einer Verdünnung 1:100 (‚detection antibody‘: Verdünnungsmittel) in alle Wells pipettiert und für 120 Minuten inkubiert. Es folgen vier weitere Waschschrte mit Waschpuffer. Um das Signal zu verstärken wird das ‚Avidin HRP Konjugat‘ mit einer Verdünnung von 1:2000 angesetzt (‚Avidin Peroxidase Conjugate‘: Verdünnungsmittel) und die Wells werden für 30 Minuten mit 50 µl inkubiert. Nun erfolgt der abschließende Waschschrte mit Waschpuffer. Im Folgenden wird die ELC Lösung (‚ELC detection‘) bereitet, wobei Lösung A und Lösung B jeweils in einem 25 ml Reaktionsgefäß angesetzt werden und erst kurz vor der Messung mit dem Platerader gemischt werden. 100 µl dieser Lösung werden auf alle Wells pipettiert. Mit Hilfe der Lumineszenz-Optik des Omega Plateraders wird die

Lumineszenzmessung durchgeführt und anschließend in eine Excel Datei überführt und gespeichert.

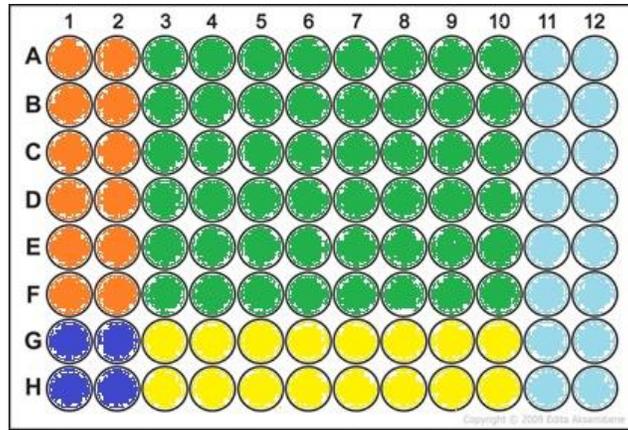


Abbildung 16: Pipetierschema (eigene Graphik). Gelb: THP-1-Medium. Orange: Verdünnungsreihe des Standards. Blau: nicht belegt. Dunkelblau: reines Verdünnungsmittel (diluent). Grün: 4 Ansätze, Überstände aus 4 verschiedenen Zellsuspensionsflaschen: A: Zellsuspension, B: IP2 (2%), C: EpofF (0,05%), D: Beize (0,01%), E: Abrieb (10%), F: LPS (Verdünnung 1:1000), G: PMA: 200 nM (Verdünnung 1:1000)

Tabelle 7: Lösungsansätze für die Fluoreszenzmessung

<b>Lösung A</b>	2,5 ml 100 mM TRIS Puffer (pH = 8,5)	25 µl 250mM Luminol Stock Lösung	11 µl 90 mM p-Coumaric Acid Stock Lösung
<b>Lösung B</b>	2,5 ml 100 mM TRIS Puffer (pH = 8,5)	5 µl 30% Lösung	

### 3.2.11 ROS und ROS Quantifizierung

Als ROS werden schädliche Formen des Sauerstoffs bezeichnet, die bei verschiedenen Erkrankungen sowie auch bei der Abwehrreaktion des Immunsystems eine Rolle spielen [64]. ROS sind Schlüsselsignalmoleküle, die eine wichtige Rolle im Verlauf einer Erkrankung spielen [65]. Im Organismus fallen ROS bei der Zellatmung in den Mitochondrien an. Außerdem produzieren die Zellen des Immunsystems ROS, sowohl bei einer Entzündungsreaktion, wie auch bei der Abwehr von Mikroorganismen und Parasiten. Makrophagen sind in der Lage, die produzierten Sauerstoffradikale zur Eliminierung der phagozytierten

Mikroorganismen zu nutzen. Die Freisetzung von ROS hat neben der toxischen Wirkung auch die Funktion eines Lockstoffes, welcher die Leukozyten anlockt und so den Ort der Entzündung anzeigt. Am Ort der Entzündungsreaktion führt eine verstärkte ROS Produktion von polymorphkernigen Neutrophilen zu endothelialer Dysfunktion und Gewebeschäden [65].

Zur Bestimmung der ROS (reactive oxygen species) Produktion der verwendeten Immunzellen wird eine Fluoreszenzmessung mit dem Farbstoff Dichlorofluorescein Diacetat (DCFH-DA) vorgenommen. Dieser Farbstoff ist zellwandpermeabel, gelangt also während der Inkubation in die Zelle. Die nichtfluoreszierenden Fluoresceinderivate werden von unterschiedlichen Oxidantien zu fluoreszierendem DCF (Dichlorofluorescein) oxidiert [64] (Abb. 17). Die Messung der Fluoreszenz ermöglicht die Quantifizierung des oxidativen Stresses [64]. Der Farbstoff besitzt ein Emissionsspektrum von 495 nm und 529 nm.

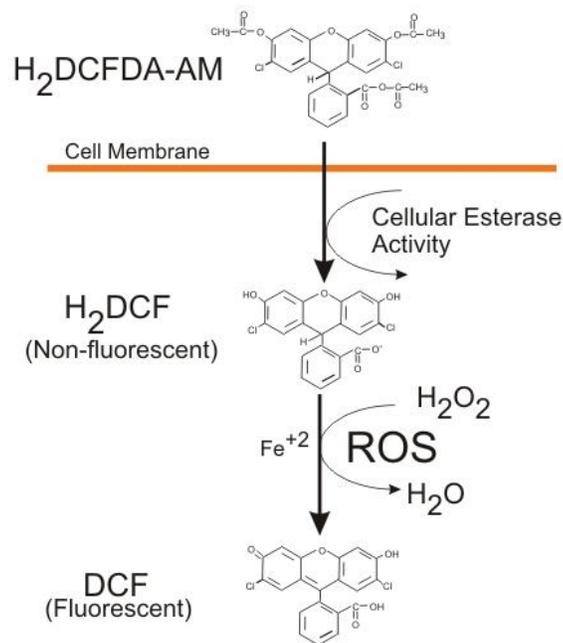


Abbildung 17: Umsatz von H<sub>2</sub>DCFDA-AM zu DCF (Quelle: [www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species-generation.html](http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species-generation.html))

Die Zellen werden mit dem Zielansatz von 1 Millionen Zellen pro Milliliter angesetzt. Für den Versuch werden die THP-1 Zellen + PMA in 96-Well-Mikrotiter-Platten ausplattiert, mit jeweils 100 µl Zellsuspension pro Well. Diese Platte wird 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Danach werden die adhärenen Zellen mit DCHF-DA-Reaktionslösung inkubiert (60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>). Nach der Inkubation werden die Zellen mit PBS gewaschen. Die THP-1 und HL-60 Zellen in Suspension hingegen werden vor dem Ausplattieren auf die 96-Well-Mikrotiter-Platten mit DCHF-DA inkubiert (60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>). Nach der Inkubation werden die Zellen mit PBS gewaschen (Zentrifugiert 10 min, bei 600 g). Nach Resuspendierung der Pellets in PBS werden die Zellen wie bereits zuvor beschrieben ausplattiert, um eine einheitliche Zellmenge pro Well zu gewährleisten. Die mit DCFH-DA beladenen und gewaschenen Zellen werden nun mit den Substanzen (in PBS – siehe Tabelle 7) stimuliert und die gebildete Fluoreszenz wird innerhalb der nächsten 15 Minuten erfasst. Die Fluoreszenzmessung erfolgt mit dem Omega Platereader mit den Wellenlängen ex/em = 485/520 nm [56]. Die Analyse und Dokumentation wird mit dem Programm GraphPad Prism 5.04 durchgeführt.

Tabelle 8: Konzentrationen der Substanzen für die ROS Messung

<b>Abrieb</b>	<b>IP2</b>	<b>Beize</b>	<b>Epol.FI.</b>	<b>PMA</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *</b>	<b>PBS °</b>
20%	4%	0,02%	0,01%	200 nM	0,3%	

\* Positivkontrolle; ° Negativkontrolle

### **3.2.12 Monozytenaktivierungstest ELISA TNF $\alpha$ / IL-6**

Das Verhalten der isolierten Immunzellen bei Inkubation mit verschiedenen Substanzen des Herstellungsprozesses wurde bereits betrachtet. Bei diesem Versuch wird nun das Verhalten der Immunzellen im Vollblut untersucht. Somit können Interaktionen der verschiedenen Zellen beobachtet und analysiert werden. TNF- $\alpha$  und IL-6 sind typische inflammatorische Zytokine, die bei einer Entzündungsreaktion von Immunzellen freigesetzt werden. Daher wird bei diesem

Monozytenaktivierungstest explizit deren Expression analysiert. Der Vorteil bei der Verwendung von Vollblut, anstatt von isolierten Zellen, ist, dass alle Zelltypen des Immunsystems und die Serumbestandteile in ihrer natürlichen Zusammensetzung vorhanden sind, sodass das Risiko der Kontamination oder Voraktivierung der Zellen reduziert wird und somit die Isolierung der Zellen nicht erforderlich ist [66]. Die Verwendung von zwei Antikörpern garantiert dabei hohe Spezifität. Durch die Bindung des Zweitantikörpers wird, direkt oder via Biotin Streptavidin Bindung an die Enzym Meerrettich Peroxidase, ein hohes Maß an Sensitivität garantiert [66]. Der ‚Sandwich ELISA‘ ist eine hochspezifische und sensitive immunologische Untersuchung, mit der auch sehr geringe Konzentrationen an Zytokinen detektiert werden können.

Es wird Vollblut von fünf verschiedenen Spendern in Heparinröhrchen abgenommen. Die im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte werden, um Kontaminationen vorzubeugen, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In Reaktionsgefäßen (25 ml) werden 5 ml PBS und 1 ml des Spenderblutes gemischt. 90 µl dieses Gemisches werden in zwei sterile 96 Well-Platten pipettiert. Zu diesen vorgelegten 90 µl werden 90 µl der zuvor verdünnten Substanzen pipettiert. Nachdem das Blut mit den Substanzen versetzt wurde, ergeben sich folgende Verdünnungen:

Tabelle 9: Konzentrationen der Substanzen für die ELISA Tests

<b>Abrieb</b>	<b>IP2</b>	<b>EpoI.FI</b>	<b>Beize</b>	<b>PMA</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
10%	10%	0,3%	0,2%	200 nM	1 µM	2 µM

Diese Well Platten werden dann 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit werden die Well Platten zentrifugiert (600 g, 10 Minuten) und anschließend der klare Überstand in Reaktionsgefäße (2 ml) pipettiert. Mit diesem Überstand wird dann der ELISA Test durchgeführt (siehe TNF-α ELISA). Es werden die produzierten Zytokine TNF-α und IL-6 gemessen. Bei der Stimulation des Blutes mit den zu untersuchenden Substanzen färbt sich

das Blut bei zwei Substanzen dunkel. Die farbveränderten Wells sind den Chemikalien Beize und Elektropolierflüssigkeit zuzuordnen. Aufgrund des Verdachts auf eine Hämolyse der Blutzellen wird ein Chemolumineszenztest durchgeführt.

### **3.2.13 Hämolyse nachweis mittels Chemolumineszenz**

Ein Hämolyse nachweis wird mittels Luminolmessung durchgeführt. Beim Monozytenaktivierungstest färbt sich das mit Beize und Epol.FI stimulierte Blut dunkel. Dadurch besteht der Verdacht, dass diese Substanzen in gewissen Konzentrationen eine Hämolyse der Erythrozyten induzieren. Die einfache Durchführbarkeit, das geringe Detektionslimit und die hohe Sensitivität sind Vorteile der Chemolumineszenzmessung gegenüber anderen Methoden [67].

Es werden 2 µl der beim Monozytenaktivierungstest verwendeten Proben (1-8) in eine 96-Well-Mikrotiter-Platte pipettiert. Dazu werden jeweils 100 µl ECL pipettiert. Luminol, welches ein Bestandteil von ECL ist, wird durch das Oxidationsmittel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in seine oxidierte Form überführt [68]. Bei dieser Reaktion kommt es zur Chemolumineszenz, welche dann mit dem Omega Platereader gemessen wird. Der Katalysator dieser Reaktion ist das bei der Hämolyse freigesetzte Häm aus dem Hämoglobin. Ohne diesen Katalysator läuft die Reaktion nicht ab.

### **3.2.14 Zytokin Array**

Das Zytokin Array ermöglicht es gleichzeitig mehrere Zytokine von verschiedenen Quellen, wie z.B. Blutplasma, Blutserum oder Zelllysaten zu detektieren. Es wird das Aktivitätsniveau der aktivierten sezernierten Zytokine gemessen. Für die Detektion der Zytokine sind spezifische Antikörper notwendig, welche auf einer Membran gebunden sind. Diese Antikörper sind in spezifischen Feldern sog. „spots“ immobilisiert. Die Membran wird mit der zu untersuchenden Probe inkubiert und die Zytokine von den fixierten Antikörpern gebunden. Durch die Zugabe eines zweiten biotinkoppelten Antikörpers, der nun an den bereits bestehenden

Antikörper-Zytokin Komplex bindet, wird ein sog. „Antikörper-Sandwich-Komplex“ gebildet (Abb. 18). Dieser besteht aus dem Zytokin, dem Erst- und Zweitantikörper. Mit Hilfe dieser Markierung wird dann der Komplex detektiert und quantifiziert.

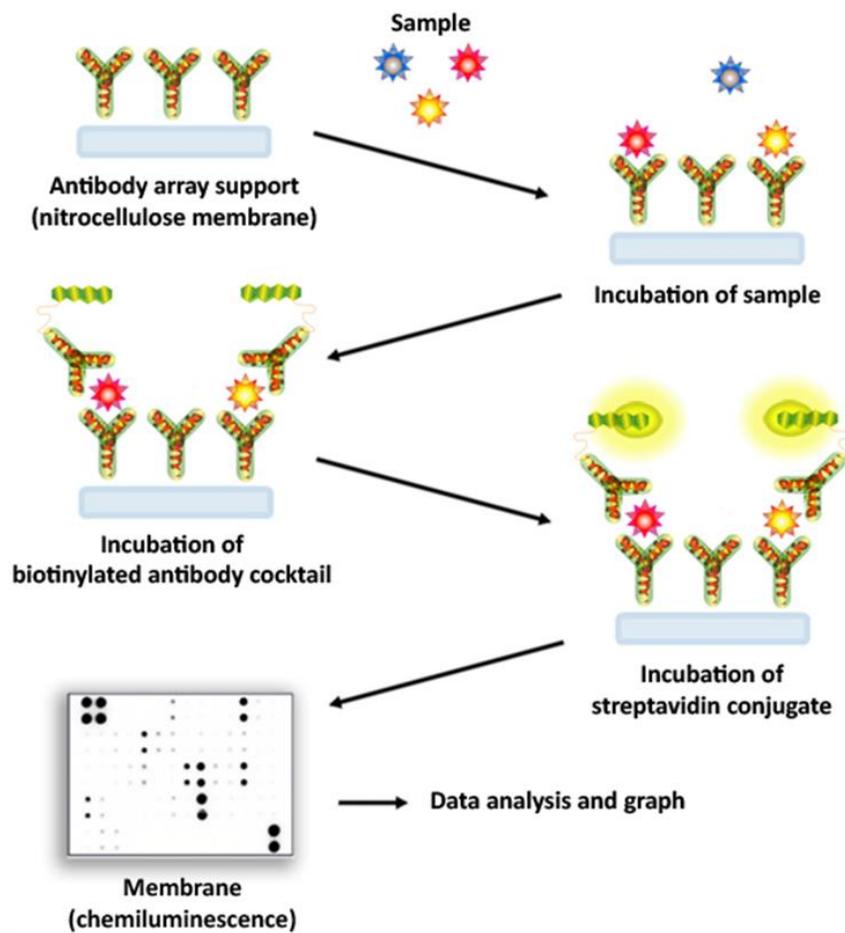


Abbildung 18: Zytokin Array RayBiotech C-Series (Quelle: [www.raybiotech.com/c-series-membrane-based-antibody-arrays.html](http://www.raybiotech.com/c-series-membrane-based-antibody-arrays.html))

Bestandteile des ‚Array Kit‘ (RayBiotech Human inflammation Array C3) :

- Array Membranen
- Biotin gekoppelte anti-Zytokin Antikörper
- Streptavidin-HRP Konjugat
- Block- und Waschlösungen
- HRP Detektionsreagenzien

Es wird Blut von 5 verschiedenen Spendern in ein Heparin Röhrchen abgenommen. Dann werden unter sterilen Bedingungen jeweils 2 ml Blut von den jeweiligen Spendern mit 10 ml PBS in einem Reaktionsgefäß (15 ml) gemischt. Aus diesen Reaktionsgefäßen werden dann jeweils 600 µl in ein Well einer 24-Well-Mikrotiter-Platte pipettiert. Diese Wells werden nun mit verschiedenen Substanzen inkubiert:

- Unbehandelt (600 µl Blut-PBS Gemisch + 600 µl PBS)
- Abrieb 5% und 10%
- IP2 5% und 10%
- Beize 0,01% und 0,02%
- Epol.FI 0,02%, 0,05% und 0,1%
- gereinigte und sterilisierte Drahtstücke des Implantats
- LPS 10 µM (1:100)

Die 24-Well-Mikrotiter-Platten werden dann 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird der Inhalt der Wells in Reaktionsgefäße (2 ml) pipettiert. Diese werden anschließend zentrifugiert (10 min, 600 g). Der klare Überstand wird abgenommen und in neue Reaktionsgefäße (2 ml) pipettiert. Nun erfolgt ein Hämolysetest, um hämolytische Konzentrationen der Substanzen zu detektieren. Des Weiteren erfolgt die Messung des Absorptionsspektrums. Anhand

der gemessenen Werte wird dann bestimmt, welche Konzentrationen für die weitere Versuchsdurchführung geeignet sind. Epol.FI 0,1% und Epol.FI 0,05% sind hämolytisch und werden nicht weiterverwendet (Abb. 19).

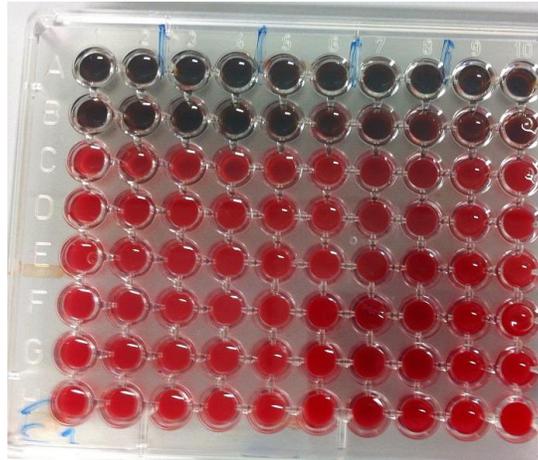


Abbildung 19: Stimulation von Spenderblut mit verschiedenen Substanzen, Hämolysezeichen bei Epol.FI 0,1% und Epol.FI 0,05% (Well A1 bis A10 und B1 bis B10) (eigene Photographie).

Im weiteren Versuch verwendete Konzentrationen:

- unbehandelt
- Abrieb 5% und 10%
- IP2 5%
- Beize 0,02%
- Epol.FI 0,02%
- gereinigte und sterilisierte Drahtstücke des Implantats
- LPS 10  $\mu$ M (1:100)

Die ‚Zytokin Array Membranen‘ werden auf dem Schüttler zuerst geblockt und anschließend mit der Probe inkubiert. Das ‚Blocking‘ erfolgt für 30 min bei RT. Dabei werden 2 ml Blockpuffer in jedes Well pipettiert. Dann wird der Blockpuffer wieder entfernt und 100  $\mu$ l der Probe in jedes Well pipettiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die Probe wieder entfernt und es erfolgen mehrere Waschschrte. Es wird 3x mit Puffer1 und 3x mit Puffer2 gewaschen, wobei die Probe bei jedem Waschschrte 5 min auf dem Schüttler steht. Nun erfolgt

die Inkubation mit dem biotinkoppelten Antikörper für 1,5 h. Danach wird erneut gewaschen und es folgt die Inkubation mit HRP-Streptavidin für 2 h. Nach Entfernung des HRP-Streptavidins wird ein weiterer Waschschrift durchgeführt und anschließend erfolgt die Chemolumineszenzdetektion im Chemidoc (Intas). Die Intensität der Signale wird mit Hilfe der ImageJ Software ermittelt. Bei der Auswertung wird der Blank und die Negativkontrolle abgezogen und die Positivkontrolle gleich 100% gesetzt. Die ausgewerteten Daten werden dann mit den Werten der unbehandelten Zellen verglichen.

### **3.2.15 Statistische Auswertung**

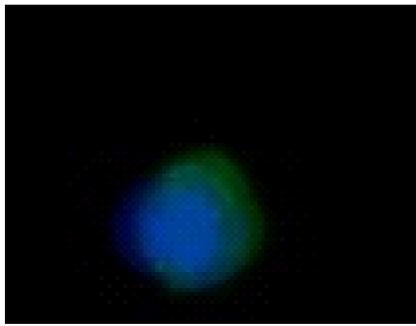
Die statistische Auswertung erfolgt in GraphPad Prism<sup>®</sup>. Die Unabhängigkeit wird durch die Auswertung von 5 unabhängigen Blutproben erreicht (N = biologische Replikate). Die technischen Replikate (n) werden z.B. als Duplikate durchgeführt. Die exakten Angaben zu den technischen und biologischen Replikaten der einzelnen Tests befinden sich in den jeweiligen Legenden.

Bei der Auswertung wird aufgrund der Größe der Gruppen keine Normalverteilung angenommen. Da mehr als zwei Gruppen verglichen werden wird der ‚Kruskal-Wallis-Test‘ angewendet. Der ‚Duns multiple comparison test‘ wird für die signifikante Unterscheidung der Mittelwerte der einzelnen Gruppen verwendet. Das festgelegte Signifikanzniveau ist  $p = 0,05$ .

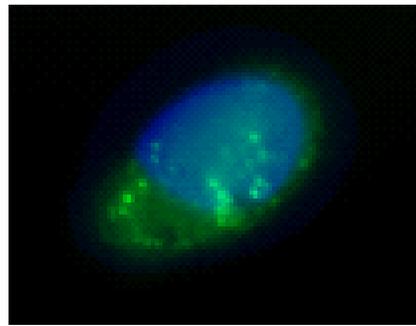
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Charakterisierung der Zellmorphologie mittels Fluoreszenzfärbung**

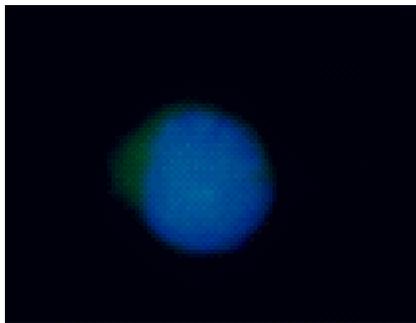
Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung werden die verschiedenen Zellreihen und ihre morphologischen Besonderheiten dokumentiert. Mit den Farbstoffen Calcein AM und Hoechst 33342 wird das Zytoplasma grün und der Zellkern blau angefärbt (Abb. 20).



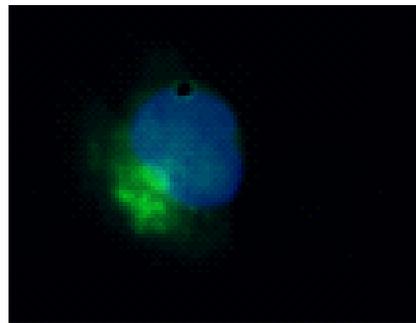
THP-1-Zelle



THP-1-Zelle + PMA



HL-60-Zelle



HL-60-Zelle + DMSO

Abbildung 20: Calcein AM und Hoechst 33342 Färbung, dokumentiert mit dem Fluoreszenzmikroskop EVOS FI (100x Vergrößerung). Der Zellkern erscheint blau, das Zytoplasma grün.

Hier ist die Entwicklung der HL-60-Zellen zu Granulozyten durch die Gabe von DMSO dokumentiert. Diese Differenzierung wurde schon 1978 von Collins postuliert [47]. Die HL-60-Zelle ist rund und weist eine eindeutige hohe Zellkern/Zytoplasma Relation auf. Die durch DMSO induzierte Zelle weist eine deutliche verminderte Zellkern/Zytoplasma Relation auf. Zudem sind typische Einbuchtungen des Zellkerns zu erkennen.

Die morphologische Veränderung der Zellen wird zusätzlich mit GraphPad Prism visualisiert (Abb. 21). Dazu werden die zuvor mit Hoechst angefärbten Zellen/Zellkerne verglichen. Die Zellkerngröße der Granulozyten ist signifikant geringer als die der monozytischen und der myeloiden Zellen. Auch die über den

Durchmesser erfasste Rundheit der Zellen zeigte im Vergleich zu den monozytischen signifikant verkleinerte granulozytische Zellen.

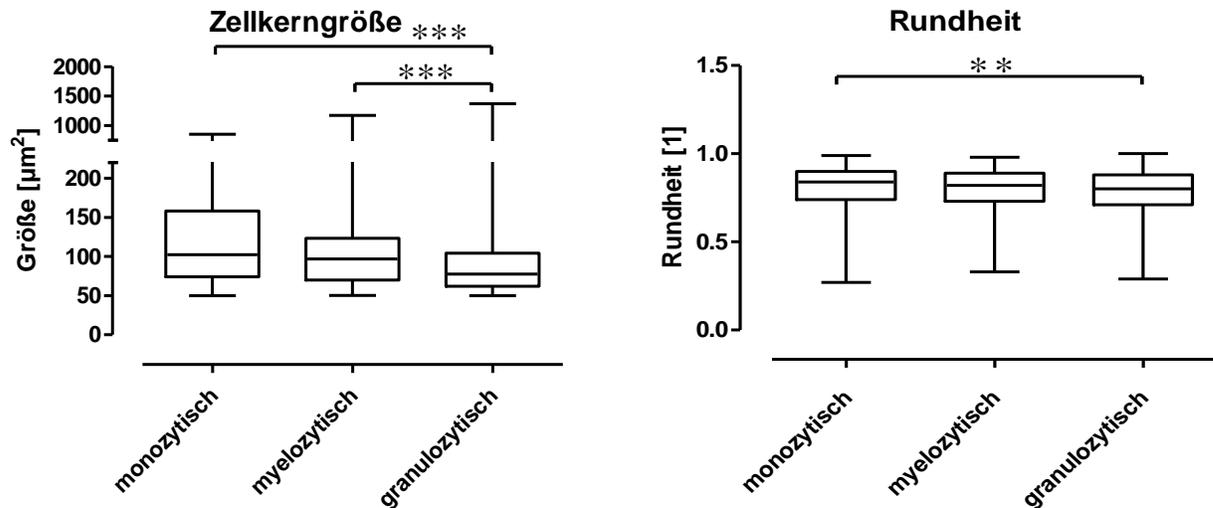


Abbildung 21: Bestimmung der Zellkerngröße und der Rundheit von monozytischen, myeloiden und granulozytischen Zellen mittels Hoechst-Färbung. Die Färbung wurde viermal durchgeführt (N = 4). Für die Bestimmung der Zellkerngröße und Rundheit wurden je Färbedurchgang mindestens zwanzig Zellen (n ≥ 20) mit ImageJ vermessen.

## 4.2 Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Zellveränderungen der HL-60-Zellen werden neben der Fluoreszenzfärbung auch mit der Durchflusszytometrie dokumentiert. Die Charakterisierung der HL-60-Zellen nach der Inkubation mit DMSO erfolgt mittels des ‚CyFlow CUBE8‘ von Sysmex (Abb. 22). Damit werden Informationen über die Größe und Granularität der Zellen ermittelt. Die morphologische Veränderung der Zellen, wie sie in der Fluoreszenzfärbung zu sehen ist, wird durch dieses quantitative Verfahren unterstützt.

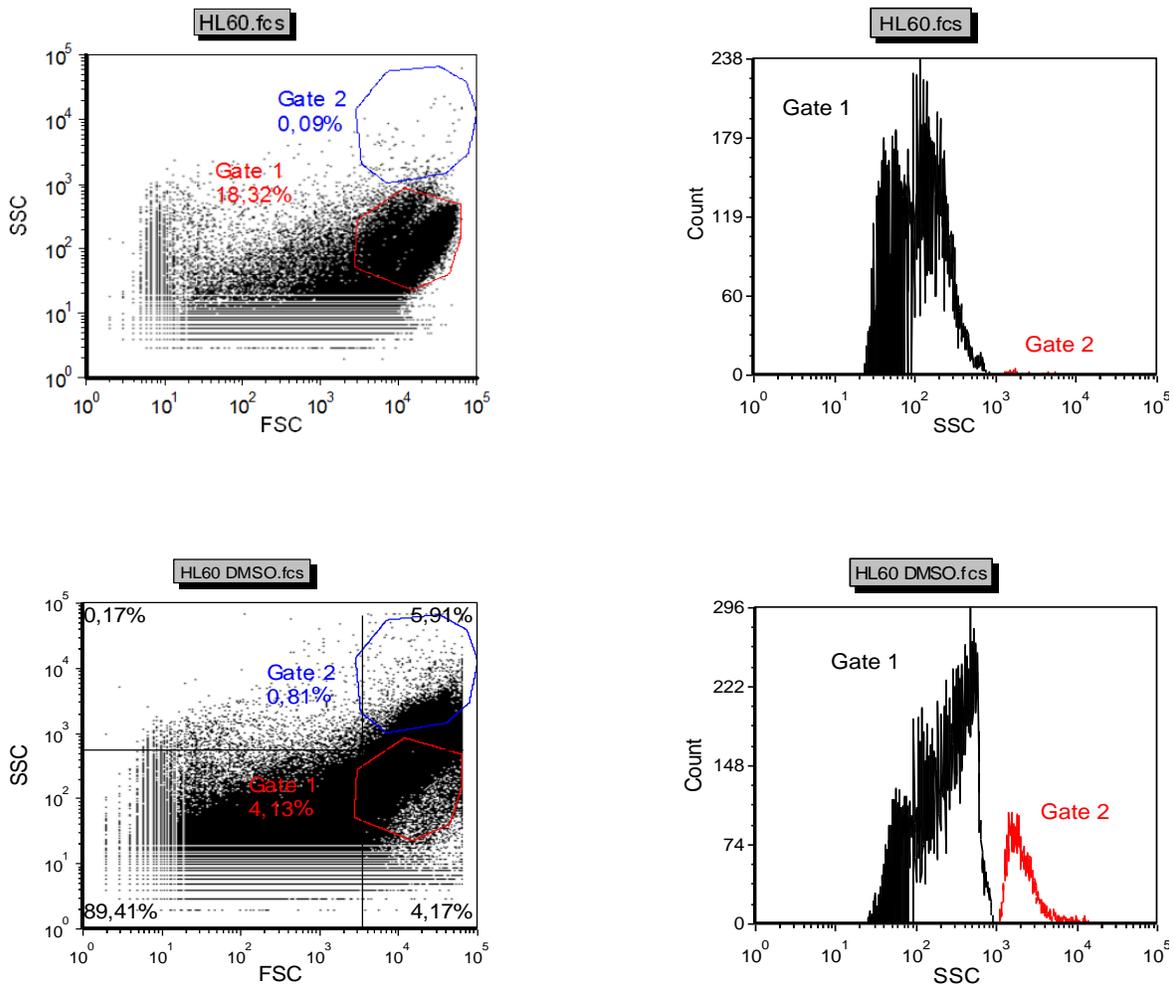


Abbildung 22: Durchflusszytometrie mit ‚CyFlow CUBE8‘ von Sysmex. HL-60-Zellveränderungen durch Inkubation mit DMSO. Die Messung wurden viermal durchgeführt (N = 4). Dabei wurden jeweils zweitausend Zellen gemessen.

SSC (side scatter) beschreibt die Granularität der Zelle. FSC (forward scatter) ist ein Maß für das Volumen der untersuchten Zellen. Die Ergebnisse nach der Messung von 2000 Zellen zeigen, dass die durch DMSO induzierten HL-60-Zellen im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen ein größeres Volumen und eine höhere Granularität aufweisen.

### 4.3 Keine Toxizität des Abriebs messbar

Die beim Herstellungsprozess und der anschließenden Elektropolitur eingesetzten Substanzen sowie der bei Belastung entstehende Abrieb werden auf ihre toxische Wirkung untersucht. Die Substanzen werden in unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Wirkung auf die drei verschiedenen Zellreihen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten untersucht (Abb. 23).

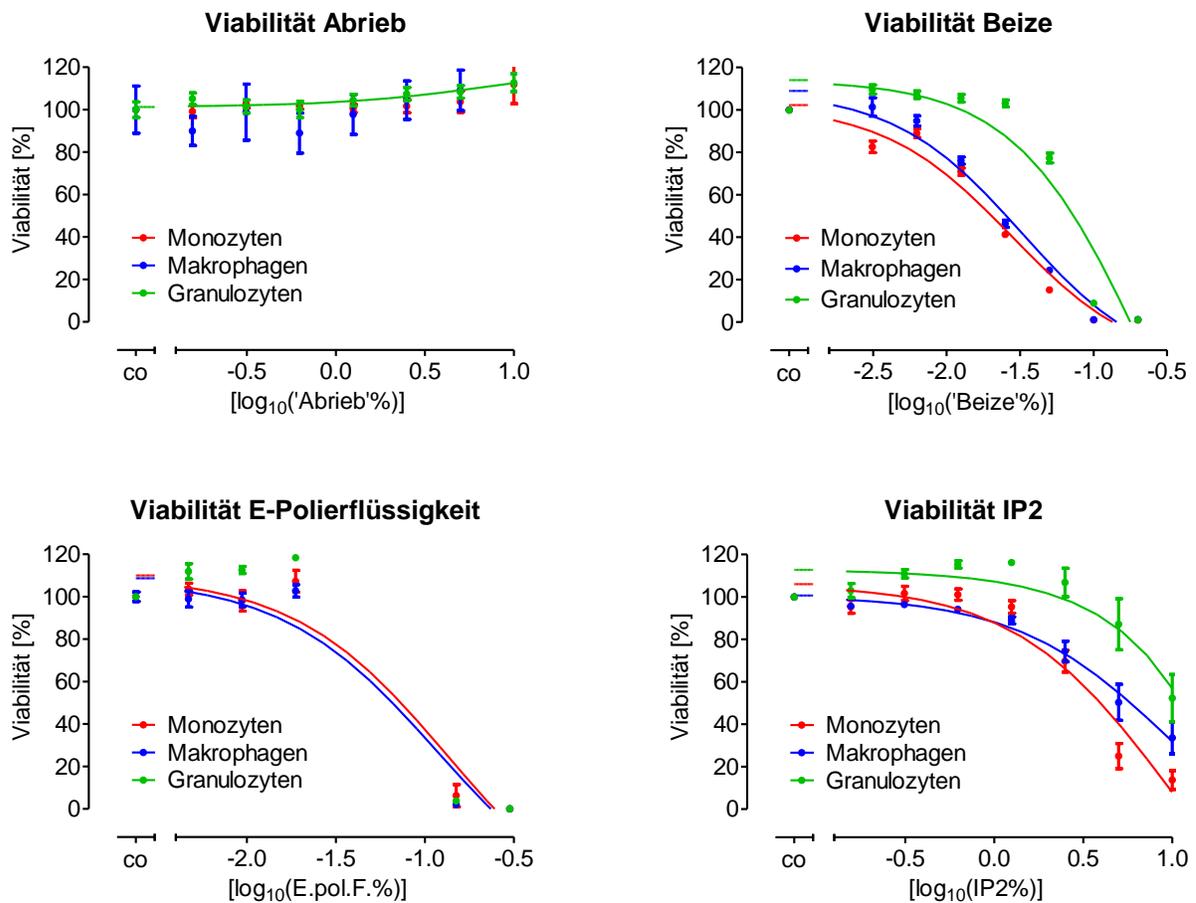


Abbildung 23: Toxizitätstests (N=4, n=4), Viabilitätstest der Substanzen Abrieb, Beize, Epol.FI und IP2 auf die Zellreihen. Inkubationszeit 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Konz. Abrieb (10% - 0,15625%), Konz. Beize (0,2% - 0,003125%), Konz. Epol.FI (0,3% - 0,0046875%), Konz. IP2 (10% - 0,15625%).

Es wird deutlich, dass der Abrieb keine Toxizität gegenüber den verwendeten Zellen zeigt. Bei Untersuchung der Elektropolierflüssigkeit erkennt man, dass die

Zellviabilität bei höheren Konzentrationen geringer ist. Des Weiteren steigt in allen drei Zellreihen die mitochondriale Aktivität vor dem Absterben an. Den größten Anstieg beobachtet man bei den Granulozyten. Die Analyse der IP2 Toxizität zeigt, dass die Granulozyten weniger sensitiv gegenüber IP2 sind als Monozyten und Makrophagen. Im Graphen der Beize ist ein sigmoidaler Kurvenverlauf bei den Monozyten und Makrophagen zu beobachten. Dieser lässt eine direkte toxische Wirkung der Beize auf die Zellen vermuten. Die Granulozyten sind gegenüber der Beize weniger sensitiv als die beiden anderen untersuchten Zellreihen.

#### **4.4 Keine Apoptoseinduktion im DNA laddering detektierbar**

Das DNA laddering dient der Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose. Durch Agarosegelelektrophorese werden die erzeugten DNA Fragmente aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Der  $EC_{50}$ -Wert ist durch die vorher durchgeführten Toxizitätstests bekannt. Die Konzentration der Substanzen wird auf die jeweilige Zellreihe abgestimmt und liegt im toxischen Bereich knapp über dem  $EC_{50}$ -Wert. Um die Unabhängigkeit zu gewährleisten, werden von jeder Zellreihe vier unterschiedliche Ansätze verwendet, wobei der Zielansatz  $10^6$  Zellen/ml beträgt. Es werden Inkubationszeiten von 24 h und 1,5 h untersucht.

Exemplarisch wird eine Membran der Zellreihe der Makrophagen (Abb. 24) dargestellt. Die Ergebnisse der weiteren Spender und Zellreihen entsprechen der hier dargestellten Membran.

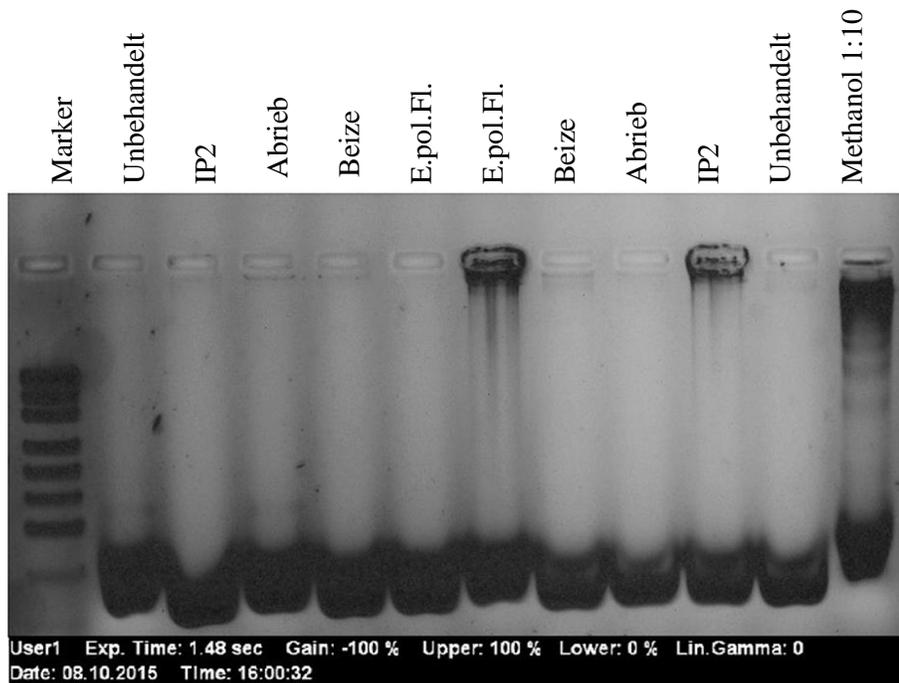


Abbildung 24: UV Spektroskopie mit INTAS (Zellreihe: Makrophagen). Inkubationszeit: 1,5 h. Konz. Abrieb: 10%, Konz. IP2: 10%, Konz. Beize: 0,08%, Konz. Epol.FI: 0,1%. (N = 3, n = 2).

Man sieht bei der Positivkontrolle Methanol 1:10 eine durch Apoptose hervorgerufene ‚DNA-Leiter‘. Keine der untersuchten Substanzen induziert in den verwendeten Konzentrationen eine für die Apoptose charakteristische ‚DNA-Leiter‘.

#### 4.4.1 Wirkung der Beize auf die THP-1-Zellen

Nach der Inkubation der THP-1-Zellen mit der Beize sind deutliche Zellveränderungen sichtbar (Abb. 25). Es sind viele kleine Zellfragmente und dazwischen einige große, geschwollene Zellen zu erkennen. Abb. 25b zeigt eine

typische Zellschwellung. Durch die Einwirkung der Beize auf die Zellen kommt es zudem auch zur Ruptur der Zellmembran und damit zur Freisetzung des Zellinhaltes (Abb. 25c).

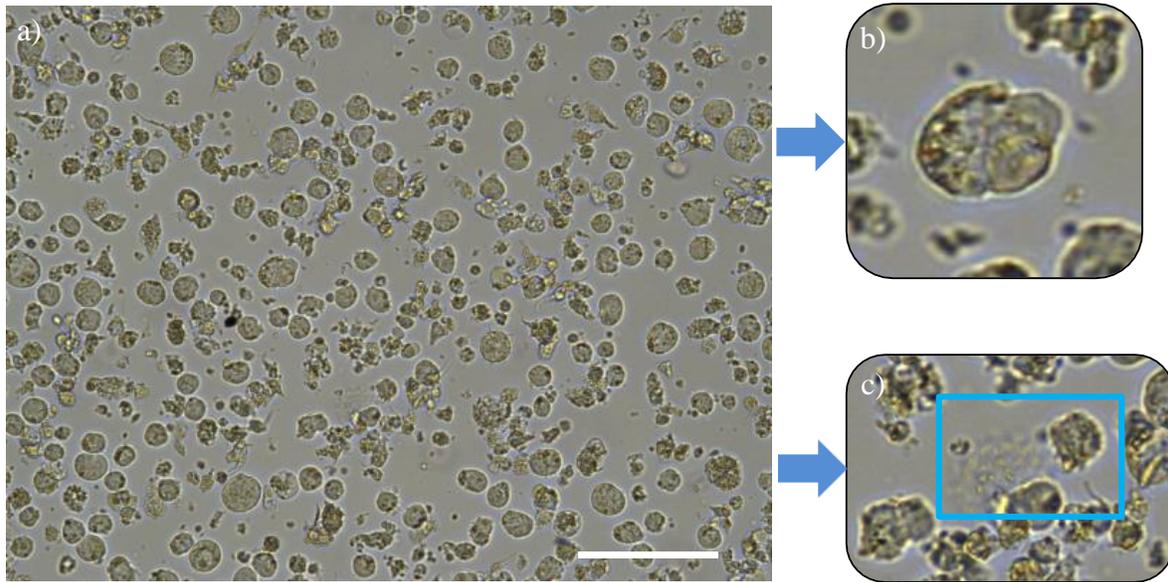


Abbildung 25: Wirkung der Beize (60 min) auf die THP-1-Zellen (Vergrößerung 20x). Der Versuch wurde dreimal wiederholt (N = 3) und jeweils vier Bildausschnitte analysiert. b) zeigt eine geschwollene Zelle. c) zeigt die Freisetzung von Zellinhalt.

#### 4.5 Phagozytose der Abriebpartikel

Es wird untersucht, ob die bei Belastung entstehenden Abriebpartikel von den Makrophagen phagozytiert werden. Dazu werden die Zellen 24 h lang mit den Abriebpartikeln inkubiert und anschließend mit dem EVOS fl Mikroskop dokumentiert (Abb. 26).

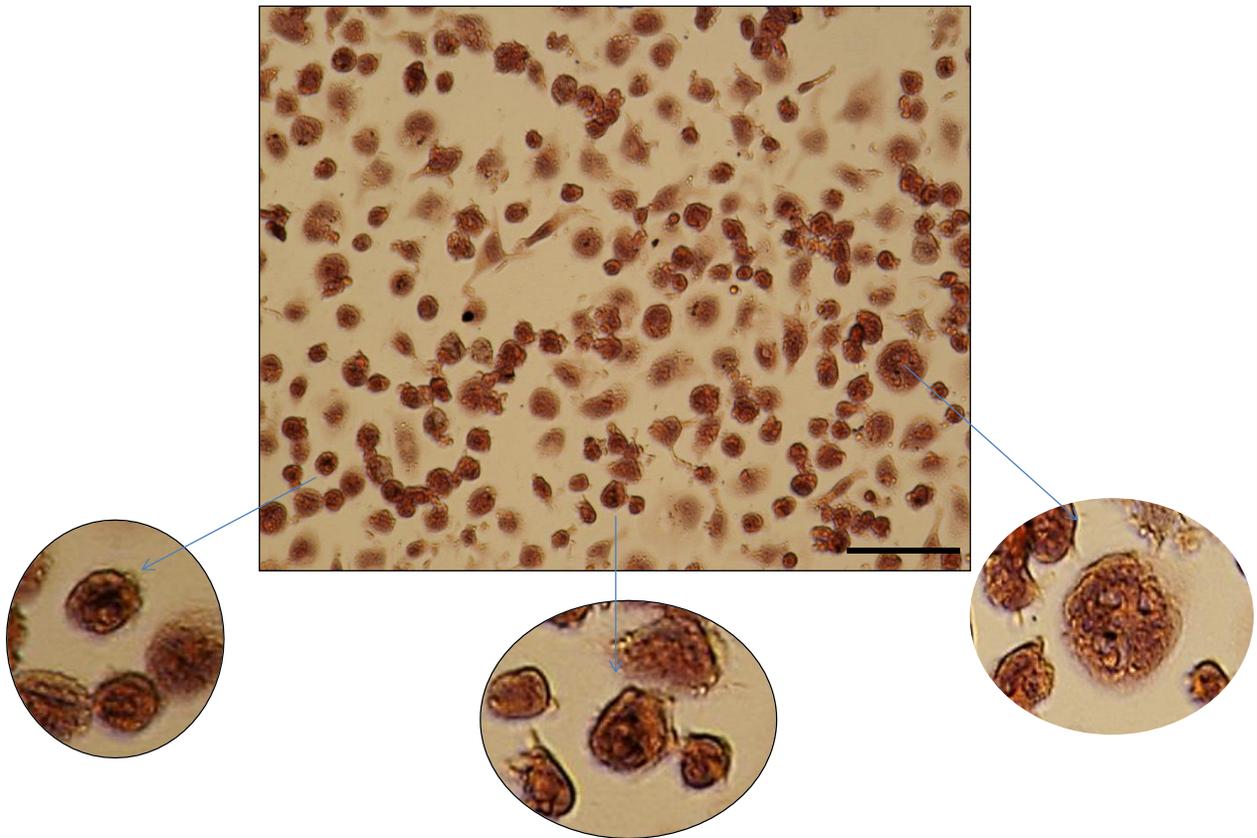


Abbildung 26: Phagozytose der Abriebpartikel durch Makrophagen (Vergrößerung 20x). Die Makrophagen wurden dreimal (N = 3) mit den Abriebpartikeln inkubiert. Es wurden jeweils vier Bildausschnitte analysiert.

Einige Makrophagen weisen schwarze Abriebpartikel in ihrem Zellinneren auf. In einigen davon sind auch zwei oder mehrere Partikel zu erkennen.

#### **4.6 Keine erhöhte TNF- $\alpha$ Sekretion durch die getesteten Substanzen**

Um die Expression des charakteristischen inflammatorischen Markers, TNF- $\alpha$ , zu untersuchen, wird ein ELISA in den isolierten Zellreihen der Monozyten und Granulozyten durchgeführt. Da TNF- $\alpha$  ein typischer Marker für Makrophagen ist, werden diese hier nicht gesondert untersucht. Es erfolgt eine Stimulation der Zellen mit IP2, Epol.FI, Beize, Abrieb und PMA, welches als Positivkontrolle dient. Unstimulierte Zellen fungieren als Negativkontrolle.

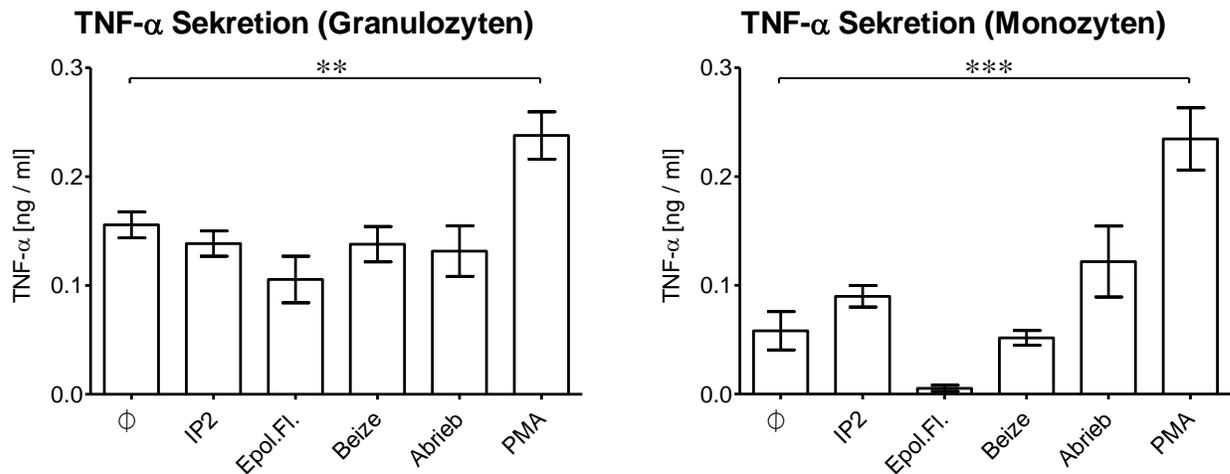


Abbildung 27: TNF $\alpha$  Sekretion (N = 4, n = 2) der DMSO behandelten HL-60 Zellen (Granulozyten) und THP.1 Zellen (Monozyten) nach Behandlung mit den verschiedenen Testsubstanzen. Konz. IP2: 2%, Konz. Epol.FI: 0,05%, Konz. Beize: 0,01%, Konz. Abrieb: 10%, Konz. PMA: 0,1%.

Keine der untersuchten Substanzen induziert eine signifikante TNF- $\alpha$  Sekretion. In beiden Zellreihen ist die Positivkontrolle, PMA, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen wie erwartet signifikant erhöht. Werden die Monozyten mit Epol.FI stimuliert, zeigt sich keine bzw. eine sehr geringe TNF- $\alpha$  Sekretion. Bei den Monozyten ist bei IP2 und beim Abrieb die TNF- $\alpha$  Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle leicht erhöht, jedoch nicht signifikant (Abb. 27).

#### 4.7 Keine erhöhte ROS Produktion durch die getesteten Substanzen

ROS spielen eine wichtige Rolle bei Abwehrreaktionen des Immunsystems. Zur Bestimmung der ROS Produktion wird eine Fluoreszenzmessung mit dem Farbstoff Dichlorofluorescein Diacetat durchgeführt. Diese ermöglicht die Quantifizierung des oxidativen Stresses, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hier als Positivkontrolle dient.

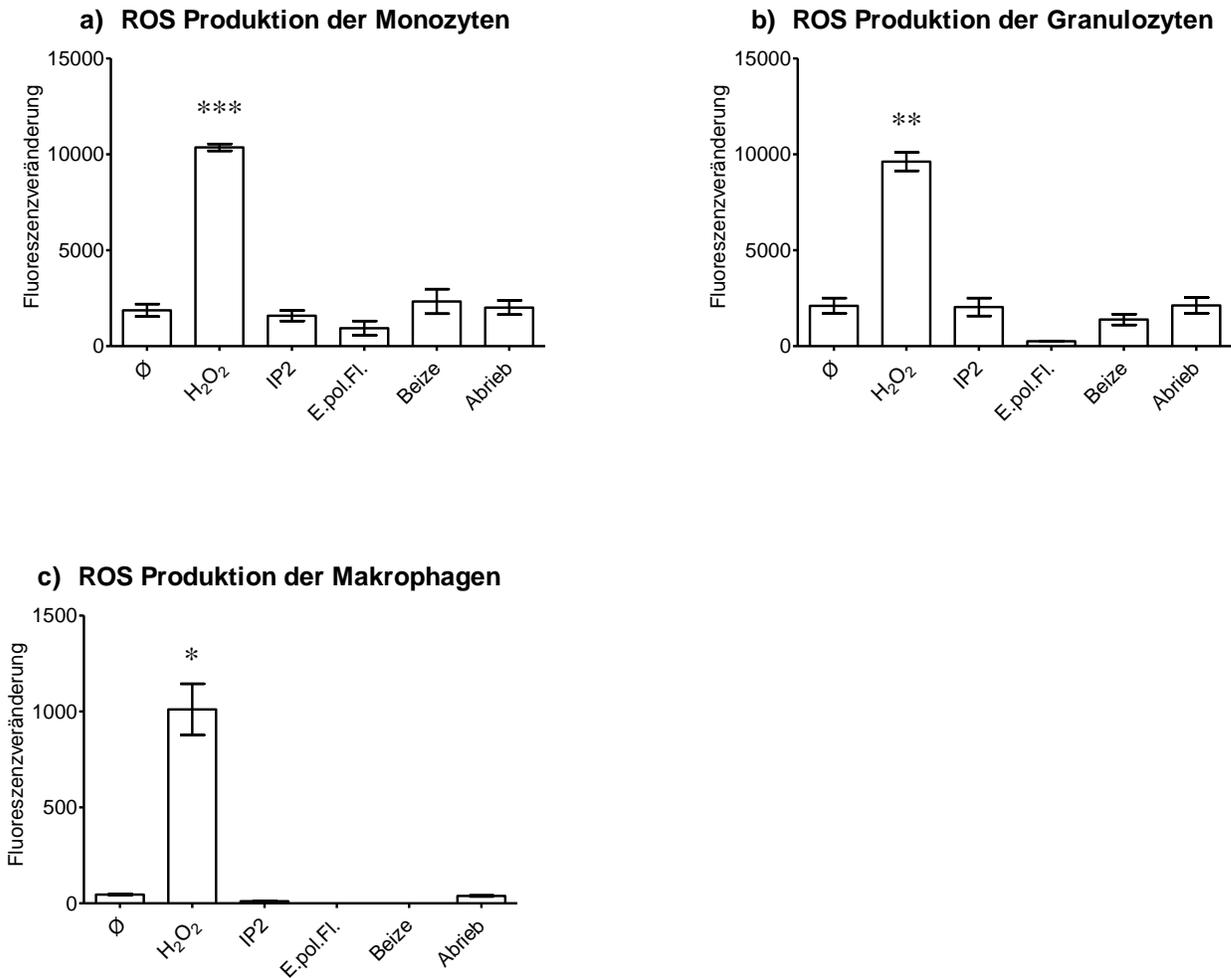


Abbildung 28: Messung der ROS Produktion durch die verschiedenen Testsubstanzen. Konz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,1%, Konz. IP2: 4%, Konz. Epol.FI: 0,01%, Konz. Beize: 0,02%, Konz. Abrieb: 20%. In (a) THP-1 Zellen (Monozyten), (b) DMSO behandelten HL-60 Zellen (Granulozyten) und (c) PMA behandelten THP-1 Zellen (Makrophagen) (N = 3, n = 4).

Die Analyse der drei Zellreihen zeigt, dass jeweils nur die Positivkontrolle eine erhöhte ROS Produktion induziert. Die Elektropolierflüssigkeit weist in allen drei Zellreihen (Abb. 28) eine geringere ROS Produktion als die unbehandelten Zellen auf.

#### 4.8 Keine erhöhte TNF- $\alpha$ und IL-6 Expression im Vollblut

Die Entzündungsmediatoren, wie TNF- $\alpha$  und IL-6, sind ein Nachweis der Aktivierung des Immunsystems. Der TNF- $\alpha$  und IL-6-ELISA wird im Vollblut durchgeführt. Hier ist die Interaktion der Immunzellen untereinander möglich. Das Blut von fünf unterschiedlichen Spendern wird untersucht. LPS dient als Positivkontrolle.

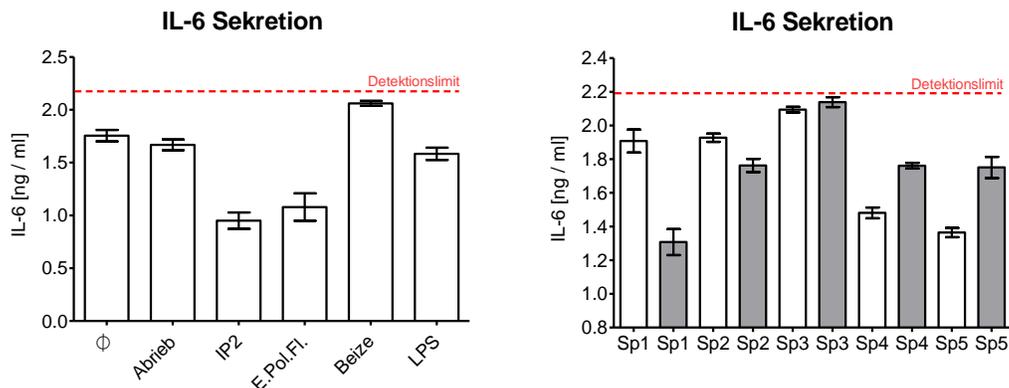


Abbildung 29: Messung der IL-6 Sekretion im Vollblut (N = 5, n = 2) nach Behandlung mit den Testsubstanzen. Konz. Abrieb: 10%, Konz. IP2: 10%, Konz. Epol.FI: 0,3%, Konz. Beize: 0,2%, Konz. LPS: 1  $\mu$ M. Darstellung der fünf unterschiedlichen Spender: weiß: unbehandelt und grau: LPS behandelt.

Die Graphik zeigt, dass schon die Negativkontrolle (unbehandelte Zellen) nahe an das Detektionslimit heranreicht (Abb. 29). Man erkennt, dass der Abrieb, die Elektropolierflüssigkeit, IP2 und die Positivkontrolle als Mittelwert der IL-6 Produktion der fünf Spender einen erniedrigten Wert gegenüber den unbehandelten Zellen aufweisen. Nur bei der Beize misst man erhöhte, nahe an das Detektionslimit heranreichende Zytokinwerte (Abb. 29). Die Positivkontrolle (LPS) und die Negativkontrolle (unbehandelte Zellen) sind sich in ihrem Zytokinexpressionsmuster sehr ähnlich. Diese Tatsache wird durch den direkten Vergleich der Positiv- und Negativkontrollen von Spender 1 bis 5 analysiert. Es ist eine große Spendervariabilität zu beobachten.

Die Positivkontrollen der Spender 1 und 2 sind gegenüber der Negativkontrolle erniedrigt. Spender 4 und 5 weisen hingegen eine gesteigerte Zytokinexpression

im Vergleich zu den Positivkontrollen auf. Bei Spender 3 sind die Expressionswerte der beiden Kontrollen nahezu auf demselben Niveau.

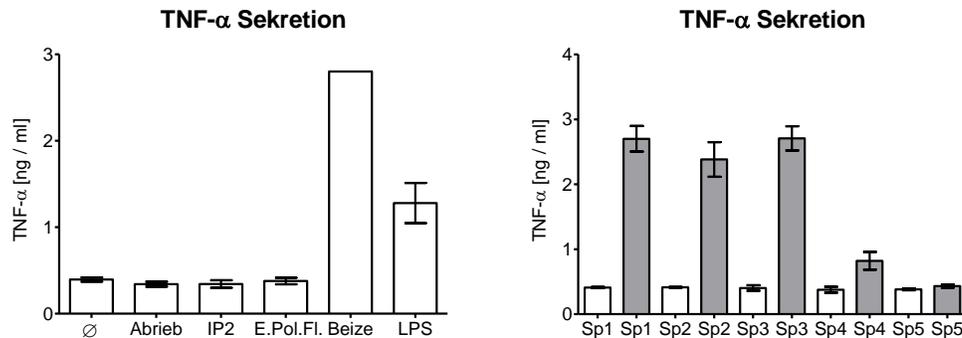


Abbildung 30: Messung der TNF- $\alpha$  Sekretion im Vollblut (N = 5, n = 2) nach Behandlung mit den Testsubstanzen. Konz. Abrieb: 10%, Konz. IP2: 10%, Konz. Epol.FI: 0,3%, Konz. Beize: 0,2%, Konz. LPS: 1  $\mu$ M. Darstellung der fünf unterschiedlichen Spender: weiß: unbehandelt, grau: LPS behandelt.

Die Auswertung der TNF- $\alpha$  Produktion im Vollblut zeigt eine erhöhte Zytokinexpression nach Stimulation mit der Beize (Abb. 30). Hier ist im Vergleich zum IL-6 keine Spendervariabilität erkennbar. Bei den Spendern eins bis vier sind die Positivkontrollen gegenüber den unbehandelten Zellen eindeutig erhöht. Nur bei Spender fünf ist die Zytokinproduktion annähernd gleich der bei den unbehandelten Zellen.

#### 4.9 Beize und Elektropolierflüssigkeit induzieren bereits in geringsten Mengen eine schwache Hämolyse

Schon einige Sekunden nach der Stimulation des Blutes mit den Substanzen färben sich die mit der Beize und Epol.FI stimulierten Wells dunkel. Dies könnte ein Zeichen einer stattfindenden Hämolyse sein. Um eine Hämolyse nachzuweisen, wird ein Chemolumineszenztest mittels Luminol durchgeführt. Die Chemolumineszenz wird mit dem Platerader gemessen und mit GraphPad Prism dargestellt (Abb. 31).

In den vorangegangenen Toxizitätstests wurden die toxischen Konzentrationen der einzelnen Substanzen ermittelt. Der Hämolyseachweis wird mit Substanzen in nicht toxischen Konzentrationen durchgeführt.

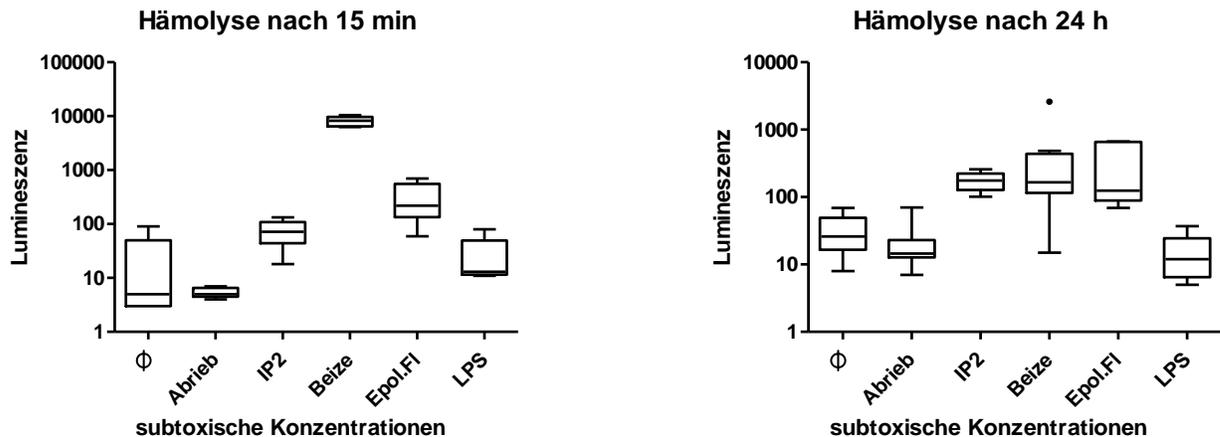


Abbildung 31: Hämolyseachweis im Blut nach 15 Minuten und 24 Stunden Inkubation mit den verschiedenen Testsubstanzen. Konz. Abrieb: 10%, Konz. IP2: 10%, Konz. Beize: 0,01%, Konz. Epol.FI: 0,02%, Konz. LPS: 10 µM. (N = 5, n = 2)

Nach 15 Minuten ist die Lumineszenz erwartungsgemäß bei der Elektropolierflüssigkeit und der Beize am höchsten (Abb. 32). Nach 24 Stunden sind die Beize, die Elektropolierflüssigkeit und IP2 auf einem ähnlichen Niveau. Das Lumineszenzniveau des Abriebs ist zu beiden Zeiten vergleichbar mit den unbehandelten Zellen. Der Abrieb induziert weder nach 15 Minuten noch nach 24 Stunden eine Hämolyse.

#### 4.10 Abrieb aktiviert die Immunzellen

Die Frage, ob der Abrieb und die Chemikalien des Herstellungsprozesses und der Elektropolitur die Immunzellen aktivieren, wird durch ein Zytokin Array untersucht. Einige Zytokine werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt (Abb. 32). Diese sind entweder nicht detektierbar, oder sie liegen im Fehlerbereich (Varianz) des Assays, sind also kleiner als der SEM – 2\*SEM.

Folgende Zytokine werden daher nicht mehr aufgeführt: IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-11, IL-13, IL-16, IL-17, IL-1 $\alpha$ , IL-12p70, IL-12p40, Eotaxin, sTNFR, INF $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIG, G-CSF, ICAM1, MCSF, GMCSF, sTNFR1, RANTES, PDGF BB, MIP-1 $\delta$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\beta$ , MCP-1, MCP-2).

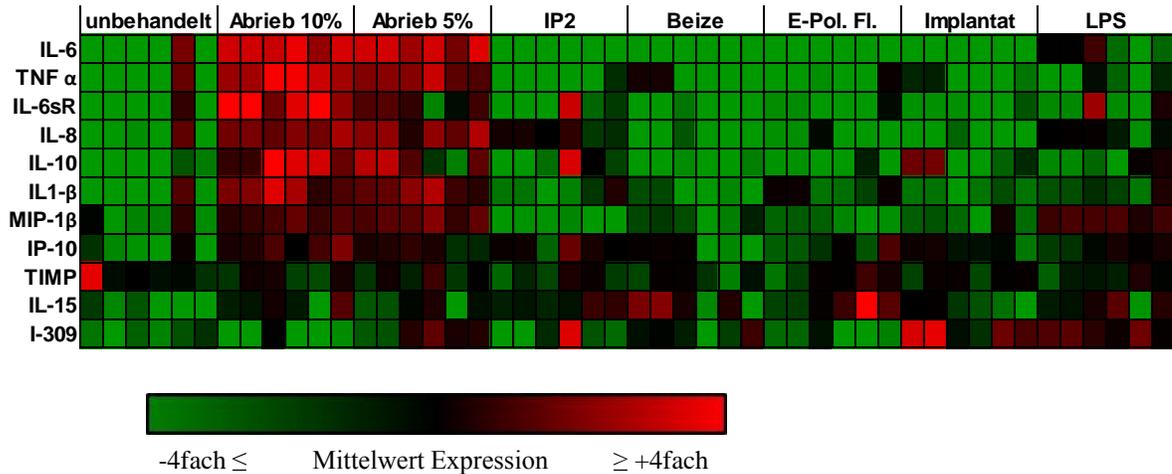


Abbildung 32: Heat Map des Zytokin Arrays. Analyse der fünf Proben (N = 5, n = 2) auf Zytokinexpression (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-6sR, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10, TIMP, IL-15, I-309) bei Stimulation mit Abrieb 10%, Abrieb 5%, IP2 5%, Beize 0,02%, Epol.FI 0,02%, Implantatdraht, LPS (10  $\mu$ M) ist Positivkontrolle, unbehandeltes Blut ist Negativkontrolle.

Fasst man die fünf Spender (N = 5) zusammen, zeigt sich, dass beide unterschiedlichen Konzentrationen des Abriebs zu einer deutlichen Zytokinexpression führen. Besonders die pro-inflammatorischen Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$  weisen ein hohes Expressionsmuster auf (Abb. 32). Durch die im Anschluss an den Herstellungsprozess durchgeführte Elektropolitur wird die Menge an Abriebpartikeln deutlich reduziert. Allerdings induzieren die dabei verwendeten Chemikalien vereinzelt die Expression von Zytokinen im Vollblut, wie z.B. IL-10 und IP-10. Die anschließende Reinigung des Implantats mit dem in unserem Institut etablierten Reinigungsprotokoll entfernt jedoch suffizient die im Herstellungsprozess und bei der Elektropolitur eingesetzten Chemikalien von der Drahtoberfläche. Der Vergleich des polierten und gereinigten Implantats mit den durch Abriebpartikeln stimulierten Zellen zeigt eine eindeutige Reduktion

der Zytokinexpression beim oberflächenbehandelten Implantat. Die Zytokinexpressionswerte des polierten und gereinigten Implantats sind vergleichbar mit den Werten der unbehandelten Zellen. Dies bestätigt die Effizienz der Elektropolitur und des Reinigungsprozesses.

Der Spender 5 weicht hinsichtlich des Expressionsmusters deutlich von den anderen Spendern ab. Dieser zeigt schon bei den unbehandelten Zellen eine hohe (rot) Expression. Spender 4 weist Auffälligkeiten bei der Stimulation mit IP2 auf. Viele Zytokine sind hier, im Vergleich zu den anderen Spendern, vermehrt exprimiert.

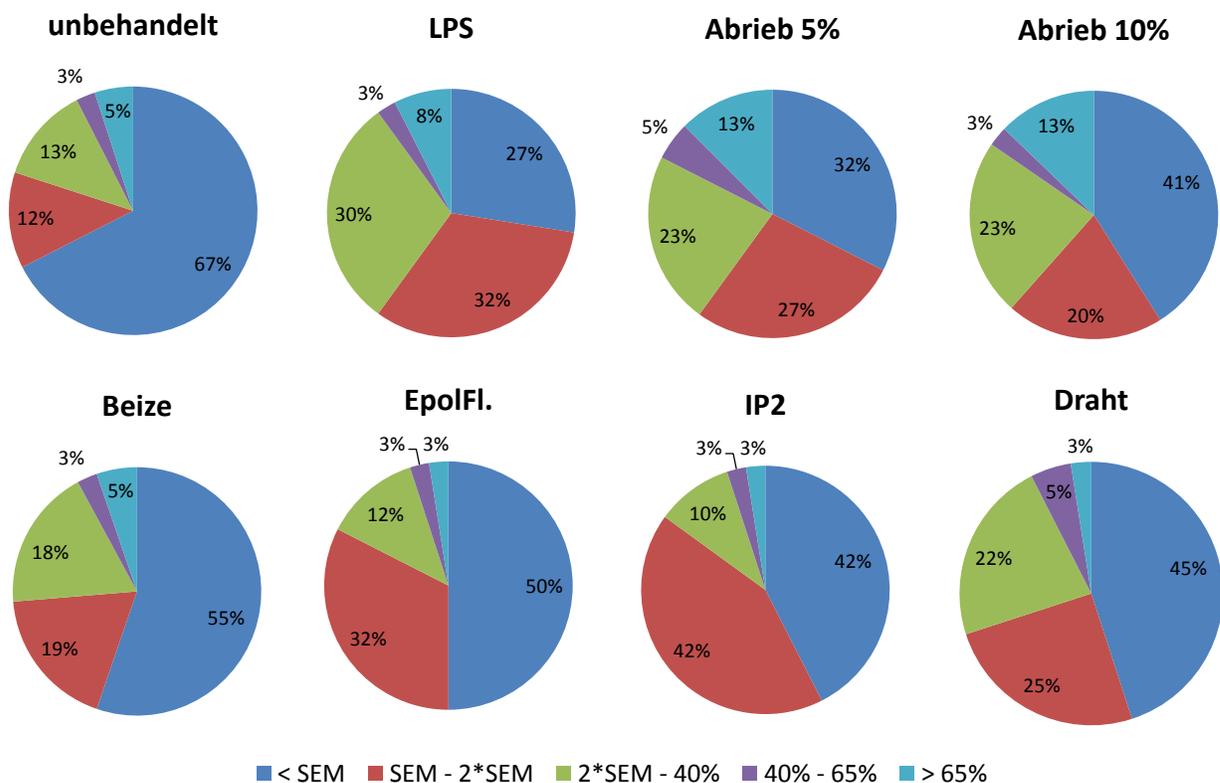


Abbildung 33: Übersicht über die Zytokinexpression der fünf Spender (N = 5, n = 2) bei Stimulation mit den verschiedenen Substanzen (Abrieb 10%, Abrieb 5%, IP2, Beize, Epol.FI, Implantatdraht, LPS. Unbehandelte Blutproben sind die Negativkontrollen. Unterscheidung von hoher Expression (>65%), mittlerer Expression (40-65%), geringer Expression (2\*SEM-40%), keine- oder nicht detektierbare Zytokinexpression.

Der Überblick über das Zytokinexpressionsmuster der unbehandelten Zellen zeigt, dass bezogen auf alle untersuchten Zytokine bei 79% der untersuchten Zytokine keine oder eine so geringe Zytokinexpression induziert wird, dass diese nicht detektierbar bzw. im Fehlerbereich des Assays liegt (Abb. 33). Eine geringe Expression kann bei 13% der Zytokine beobachtet werden. Die mittlere und hohe Zytokinexpression zeigt sich bei 3% bzw. 5%.

Der höher konzentrierte Abrieb führt bei 61% der Zytokine der niedriger konzentrierte Abrieb bei 59% zu keiner bzw. nicht detektierbaren Freisetzung der Zytokine. Bei beiden Konzentrationen beobachtet man bei 23% der Zytokine eine geringe Zytokinexpression. Eine durch Abriebpartikel induzierte hohe (18%) und mittlere (16%) Zytokinexpression zeigt eine Immunzellaktivierung an (Abb. 33). Im Vergleich dazu sind die Zytokinexpressionswerte beim gereinigten, elektropolierten und sterilisierten Implantat geringer. Dieses induziert bei 70% der untersuchten Zytokine keine detektierbare Zytokinexpression. Der Wert ist nahe an dem der unbehandelten Zellen und zeigt eine merkliche Verbesserung gegenüber den mit Abriebpartikeln stimulierten Zellen im Zytokinexpressionsmuster an. Die geringe Expressionsrate liegt bei 22%. Zusammengefasst betragen die Werte der hohen und mittleren Expression 8%. Dieser Wert ist identisch mit dem der Kontrolle (unbehandelte Zellen). Die entscheidenden hohen Expressionswerte des polierten Implantates sind jedoch geringer als der Vergleichswert bei den unbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis dokumentiert die Effizienz der Oberflächenbearbeitung des Implantatdrahtes.

Im Folgenden werden die für eine Immunzellaktivierung ausgesprochen relevanten Zytokine, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 genauer betrachtet. Der Abrieb wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die Zytokinexpression untersucht. Beide Konzentrationen führen zu einem signifikant erhöhten Serumspiegel der ausgewählten Zytokine (Abb. 34).

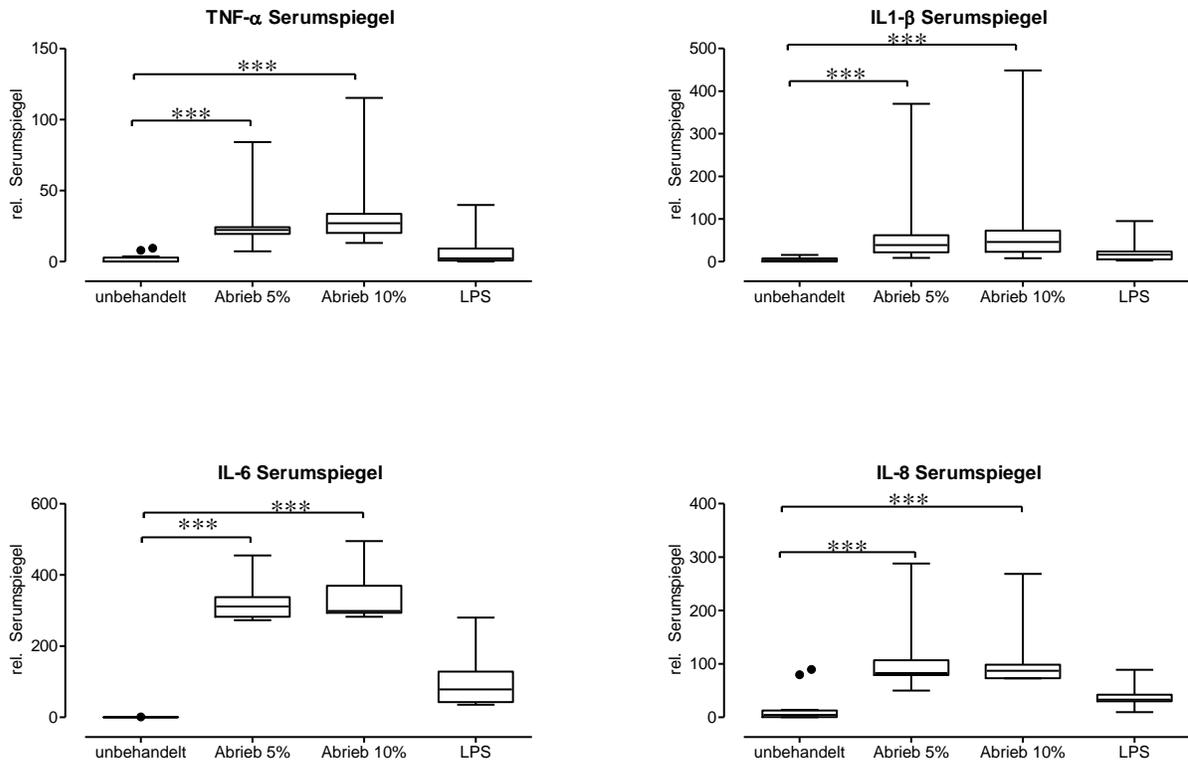


Abbildung 34: Expression der typischen Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 bei Inkubation mit Abriebpartikeln und LPS (10  $\mu$ M). (N = 5, n = 2)

#### 4.11 Geringere Immunzellaktivierung durch die Testsubstanzen zeigt die Bedeutung eines geeigneten Reinigungsprotokolls auf

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Substanzen aus dem Herstellungs- und Elektropoliturprozess die Immunzellen ebenfalls aktivieren. Nur die Positivkontrolle, LPS, führt zu einer signifikant erhöhten TNF- $\alpha$ -Sekretion (Abb. 35). Die untersuchten Chemikalien induzieren aber gegenüber den unstimulierten

Zellen auch eine geringe TNF- $\alpha$  Expression. Die IL-1 $\beta$  Produktion wird durch LPS und Epol.FI signifikant erhöht. IP2 und die Beize zeigen ebenfalls eine leicht erhöhte Expression. Die IL-6 Plasmaspiegel steigen signifikant bei der Stimulation mit LPS. Die Inkubation mit IP2 führt zu einer erhöhten IL-8 Sekretion. Diese ist höher als die der Positivkontrolle mit LPS.

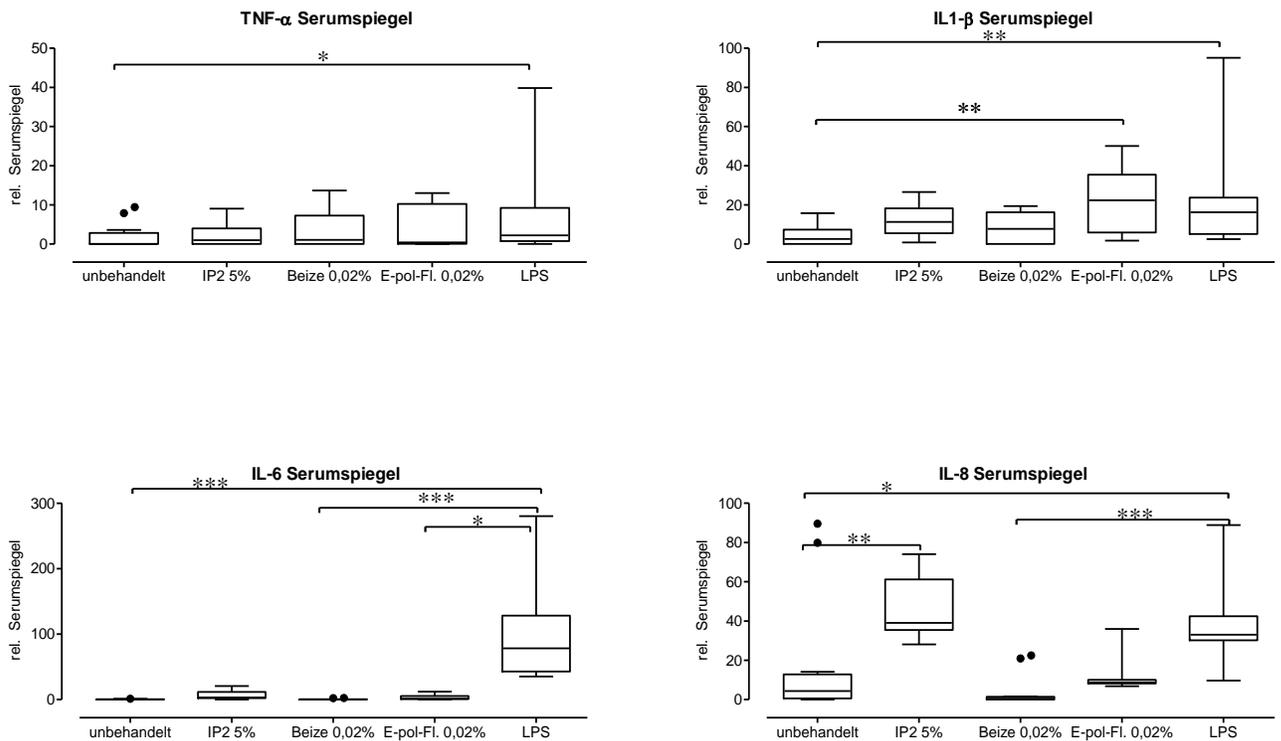


Abbildung 35: Expression der typischen Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 bei Inkubation mit Chemikalien des Herstellungsprozesses. IP2 5%, Beize 0,02%, Epol.FI 0,02%, LPS (10  $\mu$ M). (N = 5, n = 2)

#### 4.12 Ausbleibende Immunzellaktivierung durch das gereinigte und sterilisierte Implantat bestätigt die Effizienz des Reinigungsprotokolls

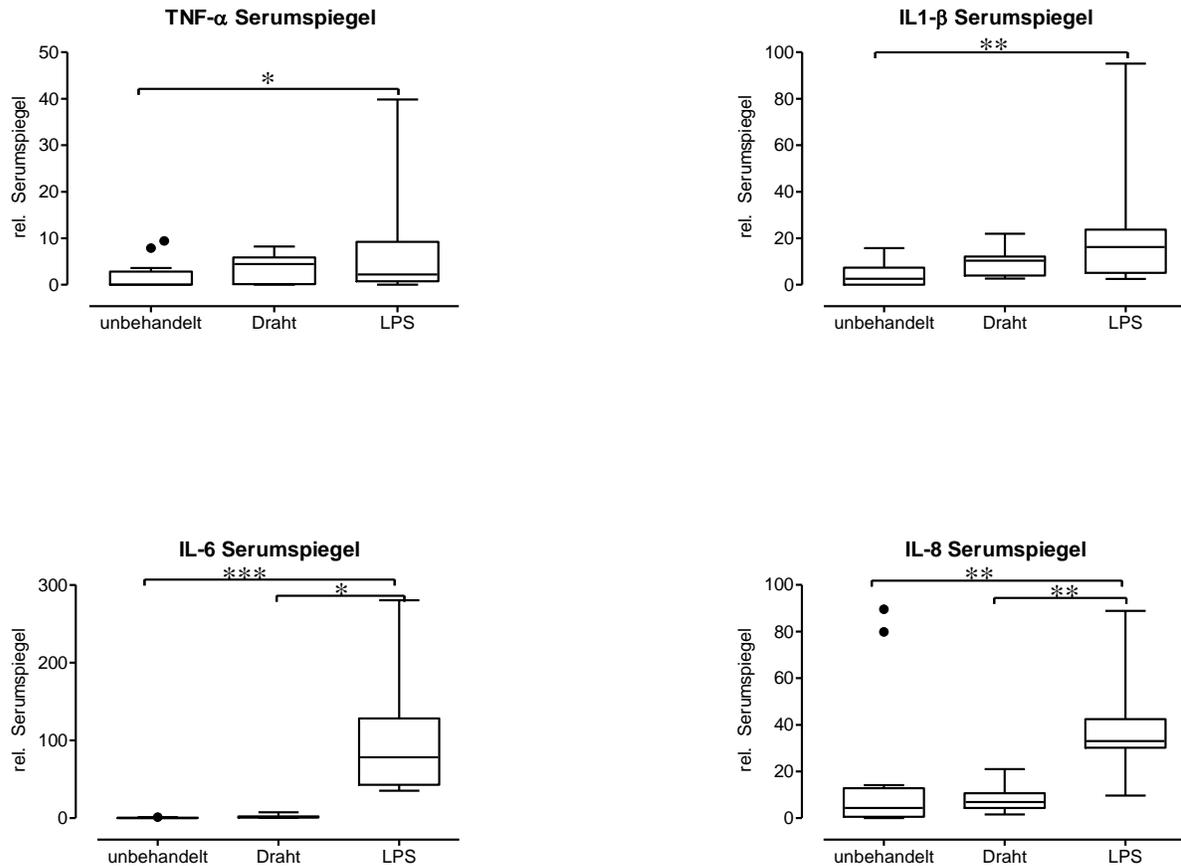


Abbildung 36: Expression der typischen Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 bei Inkubation mit dem gereinigten und sterilisierten Implantatdraht, LPS (10  $\mu$ M). (N = 5, n = 2)

Das gereinigte, elektropolierte und sterilisierte Implantat wird auf die Zytokinexpression, relativ zu den unbehandelten Zellen, untersucht. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Zytokinexpression zwischen den unstimulierten Zellen und denen, die mit dem gereinigten Implantat in Kontakt sind (Abb. 36). Bei diesen vier Zytokinen ist jeweils nur eine signifikante Expression bei der Positivkontrolle LPS zu messen.

#### 4.13 Erhöhte Spiegel von MIP-1 $\beta$ , I-309, IP-10, IL-6sR und IL-10 nach Inkubation von Vollblut mit Abrieb und den Testsubstanzen

Im Folgenden sind die Zytokine aufgeführt, die signifikante Veränderungen in den Plasmaspiegeln zeigten.

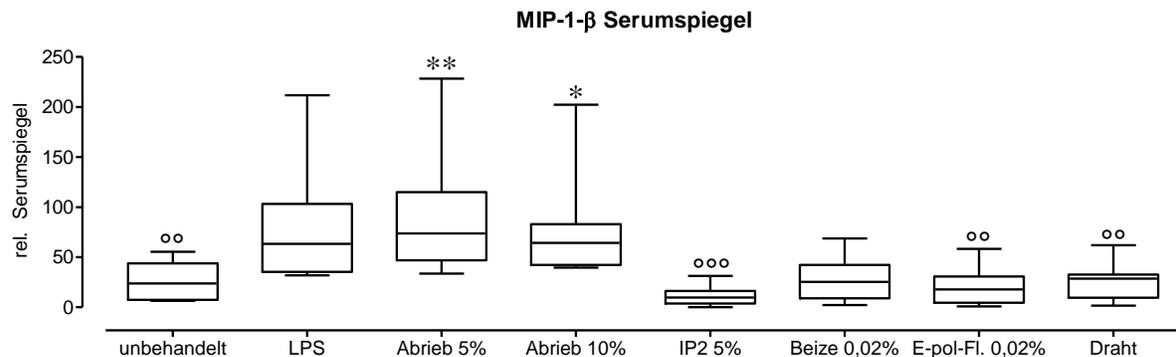


Abbildung 37: Zytokinarray: MIP-1-  $\beta$  Serumspiegel bei Inkubation mit LPS (10  $\mu$ M), Abrieb 5%, Abrieb 10%, IP2 5%, Beize 0,02%, Epol.FI 0,02% Implantatdraht (\* = signifikant erhöht gegenüber unbehandelt, ° = signifikant erniedrigt gegenüber LPS. (N = 5, n = 2)

Sowohl IP2 als auch die EpolFI. führen zu signifikant erniedrigten MIP-1 $\beta$  Plasmaspiegeln gegenüber LPS Stimulation. Man beobachtet, relativ zu den unbehandelten Zellen, eine signifikant gesteigerte Expression der mit Abrieb stimulierten Zellen. Die Zytokinproduktion beim gereinigten elektropolierten Implantatdraht ist vergleichbar mit der Produktion nicht-stimulierter Zellen (Abb. 37).

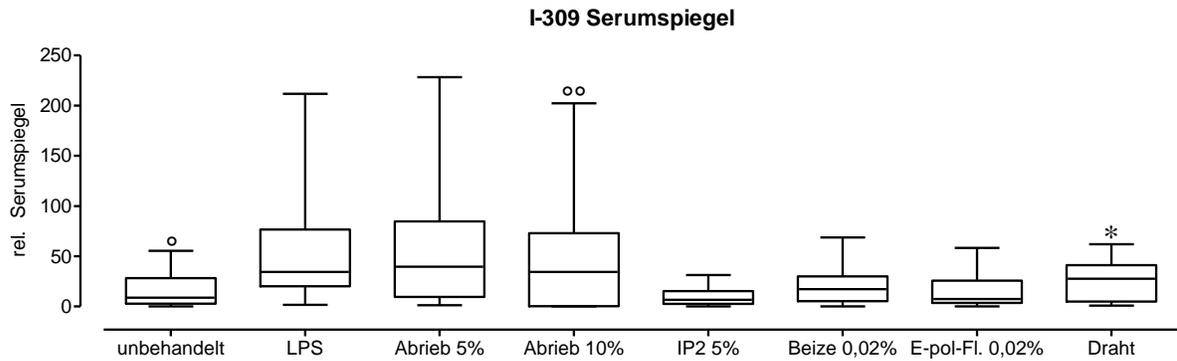


Abbildung 38: Zytokinarray: I-309 Serumspiegel LPS (10  $\mu$ M), Abrieb 5%, Abrieb 10%, IP2 5%, Beize 0,02%, Epol.FI 0,02% Implantatdraht (\* = signifikant erhöht gegenüber unbehandelt, ° = signifikant erniedrigt gegenüber LPS). (N = 5, n = 2)

Im Vergleich zur Positivkontrolle (LPS) zeigt die hohe Abriebkonzentration eine signifikant reduzierte I-309 Expression. Bei beiden untersuchten Abriebkonzentrationen ergibt sich ein erhöhtes Expressionsmuster gegenüber der Negativkontrolle. Bei der Analyse des gereinigten elektropolierten Titandrahtes zeigt sich relativ zu den unbehandelten Zellen eine gesteigerte Zytokinexpression (Abb. 38).

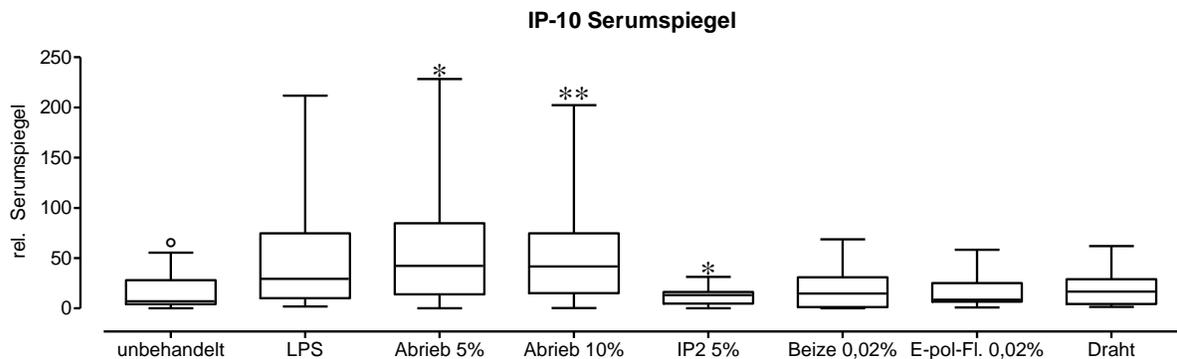


Abbildung 39: Zytokinarray: IP-10 Serumspiegel LPS (10  $\mu$ M), Abrieb 5%, Abrieb 10%, IP2 5%, Beize 0,02%, Epol.FI 0,02% Implantatdraht (\* = signifikant erhöht gegenüber unbehandelt, ° = signifikant erniedrigt gegenüber LPS). (N = 5, n = 2)

Die Analyse des Abriebs ergibt bei beiden Konzentrationen ein signifikant erhöhtes Zytokinexpressionsmuster (Abb. 39). Die Stimulation mit dem Schmiermittel IP2 bewirkt ebenso eine signifikante Steigerung des IP-10 Plasmapiegels.

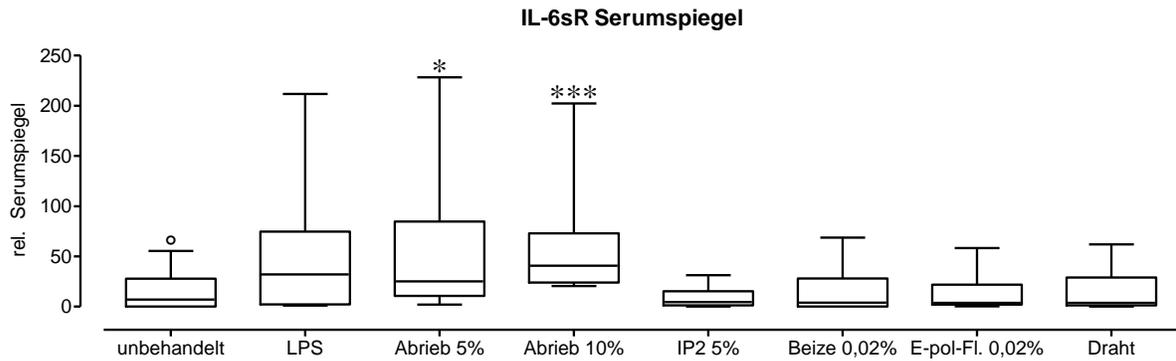


Abbildung 40: Zytokinarray: IL-6sR Serumspiegel LPS (10  $\mu$ M), Abrieb 5%, Abrieb 10%, IP2 5%, Beize 0,02%, Epol.FI 0,02% Implantatdraht (\* = signifikant erhöht gegenüber unbehandelt, ° = signifikant erniedrigt gegenüber LPS). (N = 5, n = 2)

Signifikant erhöhte IL-6sR Expressionsmuster sind bei beiden Abriebkonzentrationen zu detektieren. Die unbehandelten Zellen haben gegenüber der Positivkontrolle (LPS) eine signifikant erniedrigte Zytokinexpression (Abb. 40).

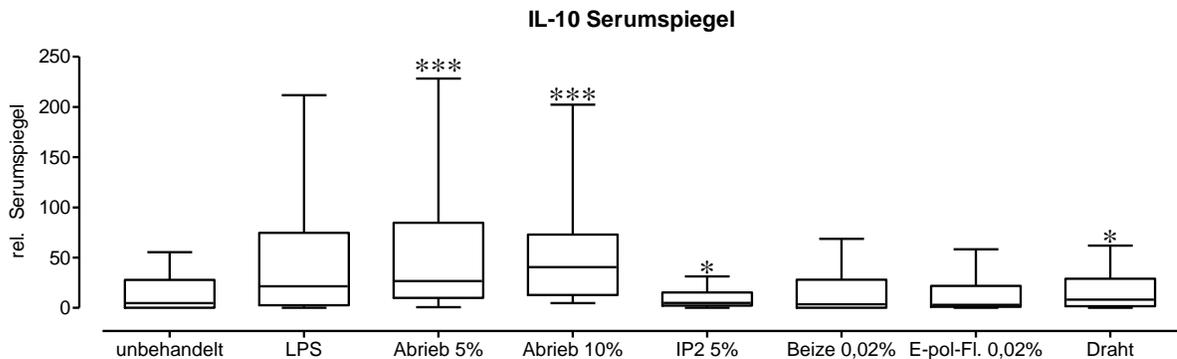


Abbildung 41: Zytokinarray:IL-10 Serumspiegel LPS (10  $\mu$ M), Abrieb 5%, Abrieb 10%, IP2 5%, Beize 0,02%, Epol.FI 0,02% Implantatdraht (\* = signifikant erhöht gegenüber unbehandelt, ° = signifikant erniedrigt gegenüber LPS). (N = 5, n = 2)

Die Analyse ergibt, dass die durch IP2 verursachte Steigerung der Zytokinfreisetzung von IP-10 und IL-10 signifikant ist. Des Weiteren ist festzustellen, dass beide Abriebkonzentrationen einen signifikant erhöhten IL-10 Serumspiegel hervorrufen. Der untersuchte gereinigte elektropolierte Implantatdraht zeigt ebenfalls eine gesteigerte Zytokinexpression IL-10 und I-309, die aber im Vergleich zu den mit Abriebpartikeln stimulierten Zellen deutlich geringer ist (Abb. 41).

## **5 Diskussion**

Die stetig steigende Anzahl von Patienten mit rücken- und wirbelsäulen-assoziierten Krankheitsbildern veranlasst die Wissenschaft kontinuierlich neue Therapieansätzen zu entwickeln. Neben der klinischen treibt auch die volkswirtschaftliche Relevanz die Forschung immer weiter voran. Die aktuellen chirurgischen Standardtherapien bei der Intervention eines Bandscheibenprolaps sind die Diskektomie und die interkorporelle Fusion [6, 21, 69]. Es existieren diverse Probleme bei diesen Operationstechniken, wie z.B. die fusionsspezifische Anschlussdegeneration, Funktionseinschränkungen und die Degeneration benachbarter Segmente [6, 11, 70]. Diese und weitere Schwächen der aktuellen Therapien sollen mit neuen Entwicklungen, wie den Nucleusprothesen, beseitigt werden. Die Zielgruppe für Nucleusimplantate stellen Patienten in einem frühen Stadium der Bandscheibendegeneration dar [20]. Die gestrickte Nucleusprothese der Firma Buck und Co. GmbH erfüllt die komplexen Anforderungen aus kombinierter Steifigkeit, Biokompatibilität und der Wiederherstellung der physiologischen Dämpfungseigenschaften der Bandscheibe. Zugleich weist die Prothese eine geringe Tendenz zur Migration auf, welche das Kernproblem der aktuell eingesetzten Nucleusimplantate darstellt. Der Abrieb von Metallimplantaten limitiert deren Einsatz [33]. Die durch moderne Techniken der Oberflächenbearbeitung von Prothesen ermöglichte Reduktion des Abriebs scheint der wesentliche Gesichtspunkt bei den mit Prothesen assoziierten Begleiterscheinungen, wie z.B. Osteolysen, zu sein [71]. Weitere Folgen des

Abriebs können Frakturen oder Implantatlockerungen sein, die durch die Akkumulation von Abriebpartikeln und der daraus resultierenden Entzündungsreaktion des Gewebes hervorgerufen werden [35]. Dieses Problem wird bei der hier untersuchten Nucleusprothese durch eine an den Herstellungsprozess anschließende Elektropolitur größtenteils behoben. Diese Elektropolitur des Implantatdrahtes führt zu einer signifikanten Reduktion des Abriebs.

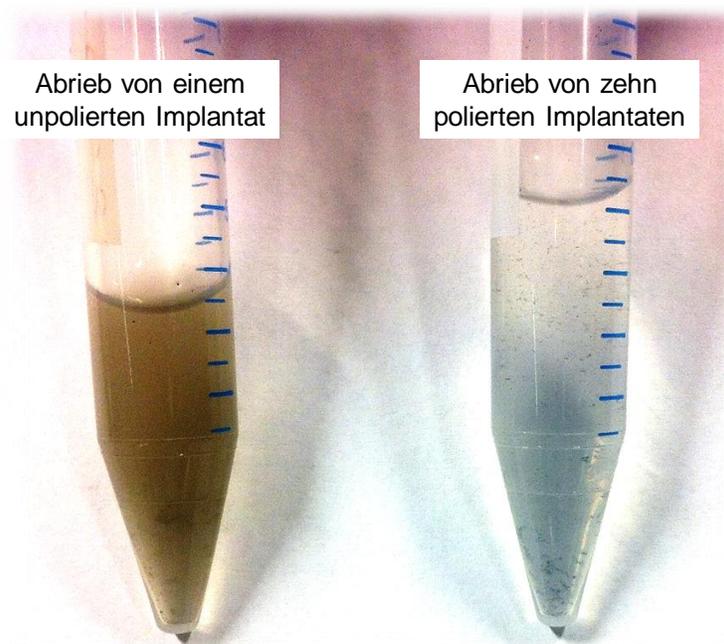


Abbildung 42: Es sind Abriebpartikel in Wasser dargestellt. Im Vergleich: Abriebpartikel von einem unpolierten Implantat (links) und Abriebpartikel von zehn polierten Implantaten (eigene Photographie)

Die Abriebpartikel werden derzeit von unserer Arbeitsgruppe bzgl. Menge und Größe charakterisiert. Wie der Abrieb und die verwendeten Chemikalien auf die isolierten Immunzellen *in vitro* sowie die Immunzellen im Vollblut wirken, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Zu Beginn wurde mittels Fluoreszenzfärbung die Morphologie der einzelnen Zellreihen visualisiert. Die schon von Collins [48] 1978 beschriebene

Differenzierung der HL-60-Zellen zu Granulozyten, durch Induktion mit DMSO, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Der Zusatz von DMSO führt zu einer deutlichen Erhöhung der spontanen Differenzierungsrate [47]. Hier sind eindeutige Zellveränderungen, wie z.B. die Veränderung der Zellkern/Zytoplasma Relation und die morphologischen Veränderungen des Zellkerns zu sehen [48]. Die sonst häufig durchgeführte HE (Hämatoxylin Eosin) Färbung wurde hier nicht durchgeführt, da bei dieser Methode kein deutlicher Unterschied zwischen Zellkern und Zytoplasma zu erkennen war. In gleicher Weise lieferte die ebenfalls durchgeführte Färbung nach Pappenheim keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Die Zellveränderungen wurden zusätzlich zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen noch durch das quantitative Verfahren der Durchflusszytometrie unterstützt. Mithilfe des ‚CyFlow CUBE8‘ von Sysmex konnten die Zellveränderungen der induzierten HL-60-Zellen, wie die Größenzunahme und eine erhöhte Granularität, gemessen werden. Zusätzlich wurden die Zellkerngröße und die Rundheit der verschiedenen Zellen bestimmt. Die granulozytischen Zellen zeigen erwartungsgemäß gegenüber den monozytischen und myeloiden Zellen eine signifikante Reduktion der Zellkerngröße. Gleichzeitig ist die Rundheit der Granulozyten im Vergleich zu den Monozyten signifikant verringert.

Unter Verwendung des Farbstoffes Resazurin, durch dessen Umsatz man die mitochondriale Aktivität und damit die Zellviabilität bestimmt, wurden Toxizitätstests durchgeführt. Die Vorteile des Resazurin Assays sind u.a. die günstige preisliche Komponente, die einheitliche und breite Verfügbarkeit und die hohe Sensitivität im Vergleich zu andern Methoden, wie z.B. dem Tetrazolium Assay [72]. Die Wirkung des Abriebs und der Chemikalien, IP2, Beize und Elektropolierflüssigkeit, auf die verschiedenen Zellreihen wurde untersucht. Der Abrieb zeigte weder in geringer noch in hoher Konzentration eine Wirkung auf die Zellviabilität. Somit ist festzustellen, dass der Abrieb keine Toxizität gegenüber den Zellen zeigt. Je höher die Konzentration der Elektropolierflüssigkeit gewählt wird, desto geringer ist die Zellviabilität. Außerdem ist ein Anstieg der mitochondrialen

Aktivität vor dem Absterben der Zellen zu beobachten. Man könnte vermuten, dass die Elektropolierflüssigkeit in den Zellen Stress, also einen Anstieg der mitochondrialen Aktivität induziert [73]. Mit einer Quantifizierung der ROS Produktion wurde diese Vermutung untersucht. Das Ergebnis der ROS Messung ist, dass keine ROS Produktion durch die Elektropolierflüssigkeit induziert wird. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Resorufin Fluoreszenz vor dem Absterben könnte der saure pH-Wert dieser Chemikalie sein. Das Substrat Resazurin, mit welchem die Zellviabilität gemessen wird, ist nämlich pH-abhängig [72]. Die Viabilitätskurve der Granulozyten bei Inkubation mit IP2 fällt später ab als die der Monozyten und Makrophagen. Demnach hat IP2 ein höheres toxisches Potential auf Monozyten und Makrophagen als auf Granulozyten. Bei Untersuchung der Beize zeigt sich ebenfalls, dass bei höherer Konzentration die Zellviabilität abnimmt. Der sigmoidale Kurvenverlauf bei den Monozyten und Makrophagen lässt eine direkte toxische Wirkung der Beize auf die Zellen vermuten. Der leichte Anstieg der Viabilitätskurven vor dem Absterben könnte ebenfalls, wie bei der Elektropolierflüssigkeit, durch den sauren pH-Wert erklärt werden. Zur Durchführung der Toxizitätstests wurde die mitochondriale Aktivität mittels des Substrats Resazurin gemessen. Es stehen auch andere Verfahren wie die LDH Messung zur Verfügung. Der sehr saure pH-Wert der Elektropolierflüssigkeit und der Beize inhibieren jedoch das Enzym und führen dazu, dass dieses Verfahren hier nicht eingesetzt werden kann [74]. Zudem wird die benötigte Absorptionsmessung durch IP2 und die Abriebpartikel des Implantats gestört [75].

Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose kann mittels DNA laddering dargestellt werden. Neben der inflammatorischen Antwort auf Fremdkörper spielt hier das Zytokin TNF- $\alpha$  eine entscheidende Rolle. Dieses ist u.a. für die Einleitung der Apoptose und Nekrose verantwortlich und wurde in den folgenden Versuchen genauer untersucht [39]. Die drei Zellreihen wurden mit den für sie toxischen Konzentrationen der Substanzen stimuliert. Um die Aussagekraft der Überprüfung

zu erhöhen, wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass die Substanzen in toxischen Konzentrationen in keiner der drei Zellreihen eine Apoptose induzieren. Es ist möglich, dass Chemikalien wie die EpolFI. oder die Beize durch ihren sauren pH-Wert die Membranintegrität stören und so eine Nekrose induzieren [60]. Die mikroskopischen Aufnahmen der mit Beize inkubierten Zellen stützen diese Vermutung. Die mikroskopische Dokumentation zeigt für die Nekrose typische Zellveränderungen, wie Zellschwellung und Freisetzung des Zellinhaltes [59, 62, 63].

Die Phagozytose der durch Belastung entstehenden Abriebpartikel wurde durch mikroskopische Bilder dokumentiert. Die Zellen wurden 24 h mit den Metallpartikeln inkubiert und anschließend mittels Mikroskop visualisiert. Die Makrophagen zeigen eine Phagozytose der Abriebpartikel. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Athanasou [76]. Die Aufnahme von Abriebpartikeln durch Makrophagen wird ebenfalls von Ciapetti beschrieben [38].

Um einen der relevantesten Vertreter der Entzündungsmediatoren zu detektieren, wurde ein TNF- $\alpha$ -ELISA eingesetzt. Die drei verschiedenen Zellreihen wurden mit den unterschiedlichen Substanzen stimuliert und anschließend ihre TNF- $\alpha$  Produktion analysiert. Die Elektropolierflüssigkeit induziert in den Monozyten nur eine minimale TNF- $\alpha$  Produktion. Der stark saure pH-Wert dieser Substanz und die daraus resultierende Zerstörung der Zellen ist eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis. Bei der Analyse der Monozyten zeigte sich, dass die mit Abrieb stimulierten Monozyten eine leicht erhöhte TNF- $\alpha$  Expression aufweisen. Diese Erhöhung ist jedoch nicht signifikant. Keine der untersuchten Substanzen induziert bei den Granulozyten eine TNF- $\alpha$  Expression.

Eine Induktion des Immunsystems und eine Stressreaktion der Zellen wurde durch die Messung der ROS Produktion analysiert. In allen Zellreihen führt die Positivkontrolle  $H_2O_2$  zu einer deutlichen ROS Produktion. Die mit Elektropolierflüssigkeit behandelten Zellen zeigen, im Vergleich zu den

unbehandelten Zellen, eine sehr geringe bis keine ROS Produktion. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die Elektropolierflüssigkeit durch ihren sehr sauren pH-Wert eine schnelle Nekrose der Zellen induziert. Die toten Zellen können direkt keine ROS mehr produzieren.

Um die Expression der wesentlichen entzündlichen Zytokine zu bestimmen, wurde ein Monozytenaktivierungstest (MAT) durchgeführt. Mit dem auf menschlichem Vollblut basierenden MAT können die relevanten Zytokine bestimmt werden und der Test hat den Vorteil, dass alle Immunzellen und Serumkomponenten in ihrer natürlichen Zusammensetzung vorhanden sind [66, 77]. Die bislang verwendeten Tests, der limulus amoebocyte (LAL) und der ‚Rabbit Pyrogen Test‘, weisen einige Limitationen auf [77]. Denn zum einen werden ethische Bedenken gegen diese Tests vorgebracht und zum anderen unterscheiden sich Menschen in ihrer Sensitivität gegenüber Kaninchen [66]. Beide Spezies reagieren sehr unterschiedlich auf Lipoteichonsäure (LTA); ferner wurden Differenzen im Ausmaß der Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-8 der beiden Spezies beobachtet [78]. Beim LAL wird zum einen das Blut vom Pfeilschwanzkreb verwendet und zum anderen liefert er falsch positive Reaktionen in Anwesenheit von Glucanen und einigen pflanzlichen Präparaten [66]. Von Schildberger und Daneshian wurde schon gezeigt, dass durch die Stimulation von Vollblut mit LPS typische Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und IL-8 freigesetzt werden [37, 66, 79]. Mit einem ELISA wurde die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 im Vollblut untersucht. In diesem Versuch liegt das Hauptaugenmerk auf TNF- $\alpha$  und IL-6, denn diese werden von Monozyten und Makrophagen während einer akuten Entzündungsreaktion freigesetzt [39, 40]. Sie zählen zu den relevantesten Zytokinen der Immunzellaktivierung [66, 79]. Das Blut stammt von fünf verschiedenen Spendern und wurde mit den Substanzen für 24 Stunden inkubiert.

Es ist festzustellen, dass die untersuchten Substanzen in den unterschiedlichen Blutproben, im Vergleich zur Kontrolle, eine erniedrigte IL-6 Produktion induzieren. Nur die Beize führt zu erhöhten IL-6 Werten, wobei diese, wie alle eingesetzten

Chemikalien, durch den Reinigungsprozess von der Implantatoberfläche entfernt wird. Die genauere Betrachtung der verschiedenen Spender lässt eine hohe Spendervariabilität erkennen. Diese ist daran zu erkennen, dass zwei Spender im Vergleich zur Positivkontrolle erhöhte IL-6 Werte, zwei Spender erniedrigte Werte und ein Spender annähernd identische Werte mit der Positivkontrolle aufweisen. Eine Spendervariabilität bei der Zytokinproduktion von unstimulierten Kontrollen wird auch von Schindler et al. und Helset et al. beschrieben [80, 81]. Der gemessene 'Basalwert' ist schon relativ hoch. Die stärkere Verdünnung der Blutproben wäre daher eine Möglichkeit, das Ergebnis zu verbessern. Es ist aber fraglich, ob dies zu einer Verbesserung des Ergebnisses führt, da die Spender untereinander so sehr verschieden sind. Eine weitere Option wäre die Wiederholung des Experiments mit einer größeren Anzahl an Spendern. Die Betrachtung der TNF- $\alpha$  Produktion im Vollblut zeigt dagegen keine Spendervariabilität. Alle mit LPS stimulierten Proben erhöhen im Vergleich zur Kontrolle die Zytokinexpression. Die Beize weist einen gesteigerten Zytokinplasmaspiegel auf, was jedoch aufgrund des effektiven Reinigungsprozesses eine untergeordnete Rolle spielt. Das Ergebnis deckt sich mit den Publikationen von Schildberger et al. [37].

Der Zytokin Array ist eine Methode, die es ermöglicht, neben den bisher im ELISA untersuchten Zytokinen weitere relevante Zytokine auf deren Expression zu untersuchen. Die fünf Blutproben stammen auch hier von fünf verschiedenen Spendern. Ob die bei der Implantatherstellung eingesetzten Chemikalien oder die entstehenden Abriebpartikel zu einer Aktivierung der Immunzellen führen, wurde hier untersucht.

Bei der Auswertung wurden viele der im Assay enthaltenen Zytokine nicht analysiert, da sie nicht detektierbar waren oder im Fehlerbereich des Assays lagen. Eine Immunzellaktivierung kann durch die Erhöhung verschiedener Zytokinserumspiegel aufgezeigt werden. Dazu gehörten TNF- $\alpha$ , IL-6,-IL-8, IL-10 und IL-1 $\beta$  [37, 40, 66, 79, 82]. Johnson et al. [13] postulierte, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$

zu den Schlüsselmediatoren der Bandscheibendegeneration und des Rückenschmerzes zählen. Bei der durch Abriebpartikel hervorgerufenen Entzündungsreaktion werden von Ciapetti et al. diverse Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ ) für die Entstehung und Aufrechterhaltung verantwortlich gemacht [38]. Auf diesen Zytokinen liegt der Fokus bei der Analyse der Ergebnisse. Die bei der Implantatbelastung entstehenden Abriebpartikel führen bei den hier ausgewählten Zytokinen zu einer signifikanten Serumspiegelerhöhung. Diese immunmodulierenden Abriebpartikel werden durch die Elektropolitur deutlich reduziert. Die hierbei und während des gesamten Herstellungsprozesses verwendeten Chemikalien induzieren alle keine signifikante TNF- $\alpha$  Expression. Eine durch IP2 induzierte, signifikante IL-6 Produktion ist auf den hohen Expressionswert eines Spenders zurückzuführen. Die Gesamtheit der hohen und die mittleren Expressionswerte des gereinigten und polierten Implantats sind äquivalent zu den Werten der Kontrolle, d.h. das gereinigte Implantat führt nicht zu einer Aktivierung der Immunzellen. Werden die für eine Entzündungsreaktion ausschlaggebenden hohen Expressionswerte isoliert betrachtet, zeigt sich, dass das oberflächenbehandelte Implantat geringere Werte als die Kontrolle aufweist. Das Resümee dieser Ergebnisse ist der Beleg für die Effizienz der durchgeführten Politur- und Reinigungsprozesse.

Durch die Abriebpartikel und teilweise auch durch die Chemikalien wird die Produktion einiger Zytokine (MIP-1 $\beta$ , I-309, IL-6sR, IP-10, IL-10) signifikant gesteigert. MIP-1 $\beta$  wird von zytotoxischen T-Zellen gebildet [83]. Das Zytokin ist für die Aktivierung von Granulozyten verantwortlich und ist Teil der akuten neutrophilen Entzündungsreaktion [84]. I-309 spielt eine Rolle bei verschiedenen entzündlichen Prozessen und wird von aktivierten Monozyten sezerniert [85, 86]. Es wird ebenso zu den Biomarkern gezählt, welche mit der Altersgebrechlichkeit (frailty syndrome) assoziiert werden [87]. Bei akuten Infektionen ist der IL-6sR Plasmaspiegel erhöht, daher wird dieses Zytokin zu den inflammatorischen Zytokinen gezählt [86]. Ferner wird eine signifikant erhöhte IP-10

Plasmakonzentration gemessen. IP-10 ist Bestandteil der Gruppe der entzündlichen Zytokine und führt zur Aktivierung des Immunsystems [88, 89]. Hingegen hat IL-10 einen anti-inflammatorischen Effekt und wird von Monozyten sezerniert [90]. Der IL-10 Spiegel wird durch die Abriebpartikel und den Implantatdraht signifikant gesteigert. Es wird postuliert, dass zirkulierendes IL-10 vorbeugend für vertebrale Frakturen sein könnte [91]. Zu dieser Annahme führen die Ergebnisse der Studie, wonach IL-10 defiziente Mäuse eine signifikant geringere totale und kortikale Knochenmasse haben und gleichzeitig die Anzahl der Trabekel erniedrigt ist [91].

Die Betrachtung aller untersuchten Zytokine zeigt, dass durch die Stimulation mit Abriebpartikeln die Plasmaspiegel einiger Zytokine wie MIP-1 $\beta$ , I-309, IL-6sR, IP-10, und IL-10 erhöht wurden. Die Zytokine MIP-1 $\beta$  und I-309 werden von aktivierten T-Zellen freigesetzt [92, 93]. Antigenpräsentierende Zellen wie z.B. Monozyten und B-Zellen sezernieren IP-10 [94]. Um diese Zytokine und deren Expression genauer zu analysieren, wäre eine Stimulation der exprimierenden Zellreihen (T-Zellen, Monozyten, B-Zellen) mit dem unpolierten und dem elektropolierten und gereinigten Implantat denkbar.

Die von Makrophagen und anderen Zellen aufgenommenen Abriebpartikel können über die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren eine Entzündungsreaktion triggern [95]. Abriebpartikel werden von Zellen nur über Phagozytose oder Pinozytose aufgenommen, wenn sie kleiner als 10  $\mu\text{m}$  sind (Bereich von 10  $\mu\text{m}$  bis 150  $\mu\text{m}$ ) [95-97]. Die bei Belastung des Implantats entstehenden Partikel sind überwiegend zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 30  $\mu\text{m}$  groß, z.T. auch größer. Allgemein gilt, dass Abriebpartikel kleiner 10  $\mu\text{m}$  phagozytierbar und damit potentiell pro-inflammatorisch sind [82]. Grundsätzlich gilt, dass bei höherer Dosis an Abriebpartikeln und kleinerer Partikelgröße die Reaktionen des Wirtsorganismus umso gravierender sind [38, 82]. Aus diesem Grund ist der Politurprozess so entscheidend, denn es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang die Menge an Abriebpartikeln deutlich reduziert. Die Analysen zur genauen Verteilung der

Partikelgrößen werden zurzeit von unserer Arbeitsgruppe am Siegfried-Weller-Institut der BGU Tübingen durchgeführt. Erste Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Größe der Abriebpartikel unverändert bleibt (Gauri Tendulkar unveröffentlichte Resultate).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die immunmodulierenden Abriebpartikel durch die Elektropolitur deutlich reduziert werden und durch den Reinigungsprozess (Reinigungsprotokoll) eine effektive Reinigung der Implantatoberfläche erreicht wird. Die für eine Entzündungsreaktion verantwortlichen Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$ , zeigen bei Kontakt mit dem gereinigten und polierten Implantat keine erhöhten Werte im Vergleich zur Kontrolle. Es ist keine Aktivierung von Immunzellen nachweisbar.

## **6 Ausblick**

Die Kombination der mechanischen und biologischen Eigenschaften der neuartigen Nucleusprothese qualifiziert diese für den Einsatz zur Behandlung von Bandscheibenvorfällen. Die Wirkung von Substanzen des Herstellungsprozesses sowie die der Abriebpartikel auf die Immunzellen wurde im Ergebnisteil beschrieben. Um das Implantat *in vivo* einzusetzen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Es wird eine Aktivierung von Osteoklasten durch Abriebpartikel von Implantaten postuliert [34, 38, 76]. Diese, sowie die Wirkung von Chemikalien des Herstellungsprozesses auf Osteoklasten, sollten in folgenden Arbeiten untersucht werden. Um eine bessere prognostische Aussage über das Verhalten der Nucleusprothese *in vivo* zu treffen, ist ebenso die Prüfung der Interaktion der Substanzen und der Abriebpartikel mit Chondrozyten in Erwägung zu ziehen. Die weitere Reduktion des Abriebs und der Abriebpartikelgröße sind zudem Parameter, die optimiert und analysiert werden sollten. Eine genauere Betrachtung der Phagozytose der Abriebpartikel ist ebenfalls empfehlenswert. Hierzu könnte das fluoreszierende Markerprotein EosFP eingesetzt werden, welches durch UV-

Induktion seine Farbe von Grün zu Rot wechselt [98]. In einem von Schreiner et al. beschriebenen Verfahren ist es möglich, die Phagozytose zu quantifizieren [99]. In diesem Verfahren wurden E.coli Bakterien mit EosFP transfiziert und der fluoreszierende Marker wechselte intrazellulär seine Farbe. Eine Kopplung dieses Fluoreszenzmarkers mit den Titanabriebpartikeln würde eine Quantifizierung der Phagozytose ermöglichen. Eine individuelle Anpassung der Drahtgestelle im Herstellungsprozess schafft die Voraussetzung für den Einsatz bei Knochentransplantationen und zur Überbrückung großer Knochendefekte. Trotz erfolgreichem Reinigungsprotokoll und Reduktion der Immunzellaktivierung bei den relevanten Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8) sind einige Zytokinplasmaspiegel noch erhöht (MIP-1 $\beta$ , I-309, IL-6sR, IP-10, und IL-10). Diese Zytokine zählen überwiegend zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und können zu einer Aktivierung des Immunsystems und allergischen Reaktionen führen [83-89]. Aus diesem Grund muss man die Untersuchung dieser Zytokine in späteren Arbeiten in Erwägung ziehen.

Der Organismus besitzt mehrere Möglichkeiten, um mit Nanopartikeln (Abriebpartikeln) umzugehen oder diese idealerweise zu eliminieren. Dazu zählen die Phagozytose, die Ausscheidung oder die Isolation der Partikel [100]. Neueste Arbeiten (PD Dr. med. Landgraeber DKOU 2016) postulieren, dass auch Neutrophile Granulozyten eine zentrale Rolle bei partikelinduzierten Osteolysen und inflammatorischen Vorgängen spielen. In einem Calvaria-Mausmodell wurde gezeigt, dass die Depletion von neutrophilen Granulozyten zu einer Minderung der partikelinduzierten Osteolyse führt. Eine Erklärung dafür könnte eine besondere Form des Zelltods (NETose) in Neutrophilen sein. Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, durch rasche Externalisierung von Chromatin sog. extrazelluläre Fallen zu bilden, wodurch Mikroorganismen und pro-inflammatorische Mediatoren abgebaut werden können [100]. Muñoz et al. [100] analysierte die Fähigkeit der Granulozyten, Nanopartikel mittels Netose zu neutralisieren und zu inaktivieren, mit dem Ergebnis, dass die Nanopartikel die Netose begünstigen. Diese aktuellen

Arbeiten von Muñoz und Landgraeber zeigen wie entscheidend die Neutrophilen Granulozyten an der Interaktion des Organismus mit Nanopartikeln beteiligt sind. Daher sollte in weiteren Arbeiten die Interaktion zwischen diesen Zellen und den Abriebpartikeln des Implantats sowie der zelluläre Mechanismus genauer untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

Der demographische Wandel und die damit einhergehende Häufung an Risikofaktoren führen zu stetig steigenden Patientenzahlen bei rückenassoziierten Krankheitsbildern wie dem Bandscheibenprolaps. Diese Tatsache und die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse bisheriger Therapien erfordern die Etablierung neuer Therapieansätze. Neben der bisherigen Fusionsoperation stellt die Nucleusprothetik ein innovatives und aussichtsreiches chirurgisches Verfahren zur Lösung bestehender Probleme dar. Ziel ist es, mit einer geringinvasiven Operation die fusionspezifischen Probleme, wie Pseudarthrose und Anschlussdegeneration, zu vermeiden, den Patienten die Schmerzen zu nehmen, sowie ein Maximum an Stabilität und physiologischer Beweglichkeit zu ermöglichen. Die Implantatmigration stellt das Kernproblem etablierter Nucleusimplantate dar, was deren Einsatz limitiert. Die bisherigen Untersuchungen der neuen Nucleusprothese der Firma Buck und Co. GmbH zeigen neben guten biomechanischen Eigenschaften auch eine eindrücklich geringe Implantatmigration. Des Weiteren können durch Modifikationen des Herstellungsprozesses eine individuelle Anpassung der Eigenschaften des Implantats ermöglicht werden. Wesentliche Voraussetzungen für die Anwendung von Implantaten *in vivo* ist die Immunkompatibilität. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von Abriebpartikel und Chemikalien des Herstellungsprozesses auf die Immunzellen zu untersuchen.

Eine Dokumentation der Zellmorphologie wurde mittels der Farbstoffe Calcein AM und Hoechst33342 durchgeführt. Die Differenzierung von HL-60-Zellen zu Granulozyten durch die Induktion mit DMSO wurde neben einer Fluoreszenzfärbung noch mit der Methode der Durchflusszytometrie analysiert. Es sind deutliche Änderungen der Zellmorphologie, wie die Veränderung der Zellkern/Zytoplasma Relation, zu erkennen. Die drei Immunzellarten wurden mit den Chemikalien, Elektropolierflüssigkeit, IP2, Beize sowie den Abriebpartikeln in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Es zeigte sich ein toxisches Potential der

Chemikalien gegenüber den Immunzellen, wohingegen die Abriebpartikel keine Toxizität gegenüber den Immunzellen aufwiesen. Durch die suffiziente Entfernung aller Chemikalien nach der Implantatherstellung tritt dieses toxische Potential jedoch in den Hintergrund. Die Frage, ob es bei der Inkubation der Zellen mit den Substanzen zur Induktion einer Apoptose oder einer Nekrose kommt, sollte mit der DNA laddering Methode geklärt werden. Die Abriebpartikel und die beim Herstellungsprozess eingesetzten Chemikalien führen nicht zur Induktion einer Apoptose. Aus den durchgeführten Experimenten lässt sich folgern, dass der Abrieb keine Toxizität gegenüber den isolierten Immunzellen aufweist. Ob der Abrieb von den Makrophagen phagozytiert wird, wurde durch 24 stündige Inkubation der Zellen mit den Abriebpartikeln untersucht. Bei der anschließenden mikroskopischen Untersuchung der Zellen beobachtet man eine Phagozytose der Abriebpartikel. Die Immunzellaktivierung wurde sowohl in den einzelnen Zellreihen als auch im Vollblut untersucht. Bei der Untersuchung des inflammatorisch sehr relevanten Markers TNF- $\alpha$  zeigte sich bei der Auswertung, dass die Stimulation der Zellreihen mit den Substanzen zu keiner signifikanten TNF- $\alpha$  Sekretion führt. Die IL-6 Produktion ist aufgrund der ausgeprägten Spendervariabilität nicht eindeutig als Marker zu bewerten. Wie sich das gereinigte, polierte und sterilisierte Implantat im Vergleich zu den Chemikalien und den Abriebpartikeln verhält, konnte mit einem Zytokin Array im Vollblut analysiert werden. Hierbei wurden alle für eine Entzündungsreaktion relevanten Zytokine untersucht. Das Ergebnis zeigt eine Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$ , bei Inkubation mit den Abriebpartikeln. Durch die Elektropolitur wird die Menge an Abriebpartikeln maßgeblich reduziert. Beim Vergleich der Zytokinpiegel des polierten und des unpolierten Implantats zeigt sich eine deutliche Reduktion der Expressionswerte nach der Politur. Diese Reduktion und die generelle Verminderung von Abriebpartikeln sind entscheidend bei der Vermeidung von Entzündungsreaktionen. Die mittleren und hohen Zytokinexpressionswerte der Kontrolle sind gegenüber denen des polierten und gereinigten Implantats sehr ähnlich, was eine effiziente Reinigung der Implantatoberfläche von den

Chemikalien anzeigt. Durch die Stimulation mit Abriebpartikeln kam es ebenso zur Produktion von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen (MIP-1 $\beta$ , I-309, IL-6sR, IP-10). Es bedarf der Untersuchung dieser Zytokine in weiteren Versuchen. Die Analyse des Zytokin Arrays zeigt, dass es zu einer Immunzellaktivierung durch den Abrieb im Vollblut kommt. Das gereinigte, elektropolierte und sterilisierte Implantat weist keinen signifikanten Unterschied im Zytokinexpressionsmuster gegenüber der Kontrolle auf. Daraus lässt sich folgern, dass die Substanzen durch das Reinigungsverfahren ausreichend vom Metallgerüst entfernt werden und keine Immunreaktion induziert wird.

## 8 Vorträge

- 1) Vortrag bei der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden und Unfallchirurgen e.V. in Baden-Baden (April 2016)  
Pro-inflammatory cytokine profile in response to wear particles generated by a novel knitted titanium nucleus implant  
Clemens Dorn, Gauri Tendulkar, Alfred Buck sen. & jun., Andreas Badke, H.P. Kaps, Andreas K. Nüssler  
([http://jahrestagung2016.vsou.de/fileadmin/user\\_upload/dateien/VSOU\\_Jahrestagung\\_2016/Programm/VSOU\\_Internetversion\\_Abstracts\\_2016.pdf](http://jahrestagung2016.vsou.de/fileadmin/user_upload/dateien/VSOU_Jahrestagung_2016/Programm/VSOU_Internetversion_Abstracts_2016.pdf))
  
- 2) Vortrag beim VI. Münchener Symposium für Experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und Muskuloskelettale Forschung (Juli 2016)  
The knitted disc – biocompatibility and cytotoxicity testing of a novel nucleus implant  
Gauri Tendulkar, Clemens Dorn, Philipp Grau, Munkhnaran Dorj, Alfred Buck sen. & jun., H.P. Kaps, Sabrina Ehnert, Andreas K. Nüssler  
([http://www.ortho.med.tum.de/sites/www.ortho.med.tum.de/files/2016-OU-Symposium-Muenchen-Programm\\_0.pdf](http://www.ortho.med.tum.de/sites/www.ortho.med.tum.de/files/2016-OU-Symposium-Muenchen-Programm_0.pdf))

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Krankheitskosten für die Volkswirtschaft bei verschiedenen Erkrankungen .....	1
Abbildung 2: Prävalenz von Rückenschmerzen in der deutschen Bevölkerung in den Jahren 2003 und 2009 .....	2
Abbildung 3: Aufbau der lumbalen Bandscheibe.....	4
Abbildung 4:Vergleich der physiologischen- und der pathologisch veränderten Bandscheibe .....	5
Abbildung 5: Dorsale interkorporelle Fusion in der Brustwirbelsäule .....	7
Abbildung 6: Prosthetic Disc Nucleus.....	13
Abbildung 7: Die gestrickte Titannucleusprothese .....	15
Abbildung 8: Überblick über das Immunsystem .....	20
Abbildung 9: Verschiedene SRB-Färbungen des Implantats .....	24
Abbildung 10: Messung der Zytokinfreisetzung.....	32
Abbildung 11: Differenzierung der HL-60-Zellen durch die Induktion mit DMSO....	35
Abbildung 12: Zellzahlbestimmung mit Trypanblau .....	36
Abbildung 13: ‚CyFlow CUBE8‘ von Sysmex .....	38
Abbildung 14: Die Durchflusszytometrie .....	39
Abbildung 15: Zellviabilitätstestung mit Resazurin .....	40
Abbildung 16: Pippetierschema.....	48
Abbildung 17: Umsatz von H <sub>2</sub> DCFDA-AM zu DCF .....	49
Abbildung 18: Überblick Zytokin Array .....	53
Abbildung 19: Stimulation von Spenderblut mit verschiedenen Substanzen,.....	55
Abbildung 20: Calcein AM und Hoechst 33342 Färbung .....	57
Abbildung 21: Bestimmung der Zellkerngröße und der Rundheit von verschiedenen Zellen .....	58
Abbildung 22: Durchflusszytometrie mit ‚CyFlow CUBE8‘ .....	59
Abbildung 23: Toxizitätstests .....	60

Abbildung 24: UV Spektroskopie mit INTAS .....	62
Abbildung 25: Nekrotische Wirkung der Beize auf die THP-1-Zellen.....	63
Abbildung 26: Phagozytose der Abriebpartikel durch Makrophagen .....	64
Abbildung 27: TNF $\alpha$ -Messung.....	65
Abbildung 28: ROS-Messung .....	66
Abbildung 29: IL-6-ELISA .....	67
Abbildung 30: TNF- $\alpha$ -ELISA .....	68
Abbildung 31: Hämolysenachweis im Blut.....	69
Abbildung 32: Heat map des Zytokin Array .....	70
Abbildung 33: Übersicht über die Zytokinexpression der fünf Spender .....	71
Abbildung 34: Expression von Entzündungsmediatoren bei Stimulation mit Abriebpartikeln .....	73
Abbildung 35: Expression von Entzündungsmediatoren bei Stimulation mit Chemikalien .....	74
Abbildung 36: Expression von Entzündungsmediatoren bei Stimulation mit dem gereinigten und sterilisierten Implantatdraht .....	75
Abbildung 37: Zytokinarray: MIP-1- $\beta$ Serumspiegel.....	76
Abbildung 38: Zytokinarray: I-309 Serumspiegel.....	77
Abbildung 39: Zytokinarray: IP-10 Serumspiegel .....	77
Abbildung 40: Zytokinarray: IL-6sR Serumspiegel.....	78
Abbildung 41: Zytokinarray:IL-10 Serumspiegel.....	78
Abbildung 42: Vergleich der Menge an Abriebpartikeln von unpoliertem und poliertem Implantat .....	80

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Chemikalienliste .....	27
Tabelle 2: Verbrauchs- und Gebrauchsmaterial .....	28
Tabelle 3: Geräteliste .....	29
Tabelle 4: Software.....	30
Tabelle 5: Konzentrationen der Substanzen für die Toxizitätstests.....	42

## Literaturverzeichnis

1. Schmidt, C.O. and T. Kohlmann, *What do we know about back pain? Epidemiological results on prevalence, incidence, course, and risk factors.* Zeitschrift Fur Orthopadie Und Ihre Grenzgebiete, 2005. 143(3): p. 292-298.
2. Neuhauser, H., U. Ellert, and T. Ziese, *Chronic back pain in the general population in Germany 2002/2003: Prevalence and highly affected population groups.* Gesundheitswesen, 2005. 67(10): p. 685-693.
3. Raspe, H., *Rückenschmerzen.* 2012, Robert Koch Institut Statistisches Bundesamt: Berlin. p. 13.
4. Krämer, J., *Bandscheibenbedingte Erkrankungen* 2006: Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York 15-31, 43-55, 63-75.
5. Health, P. *Slipped disk: Overview.* 2014 [cited 2016 31.03.2016]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072656/>.
6. Käfer, W., B. Cakir, and H.J. Wilke, *Bandscheibenendoprothetik und andere bewegungserhaltende Stabilisierungsverfahren der Lendenwirbelsäule – klinische Aspekte.* 2012: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York. 83-95.
7. O'Connell, G.D., J.K. Leach, and E.O. Klineberg, *Tissue Engineering a Biological Repair Strategy for Lumbar Disc Herniation.* Bioresearch Open Access, 2015. 4(1): p. 431-445.
8. Jacobs, W., et al., *Single or double-level anterior interbody fusion techniques for cervical degenerative disc disease.* Cochrane Database Syst Rev, 2011(1): p. CD004958.
9. Glocker, P.D.F.X., *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, in Neurotraumatologie und Erkrankungen von Wirbelsäule und Nervenwurzel Lumbale Radikulopathie.* 2012, Deutsche Gesellschaft für Neurologie Freiburg. p. 6-10.
10. Jacobs, W., et al., *Total disc replacement for chronic back pain in the presence of disc degeneration.* Cochrane Database of Systematic Reviews, 2012(9).
11. Dahl, M.C., et al., *The biomechanics of a multilevel lumbar spine hybrid using nucleus replacement in conjunction with fusion.* The Spine Journal, 2013. 13(2): p. 175-183.
12. Balsano, M., et al., *Nucleus disc arthroplasty with the NUBAC device: 2-year clinical experience.* Eur Spine J, 2011. 20 Suppl 1: p. S36-40.
13. Johnson, Z.I., et al., *DISC IN FLAMES: ROLES OF TNF-alpha AND IL-1 beta IN INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION.* European Cells & Materials, 2015. 30: p. 104-117.
14. Faustmann, P.M., *[Neuroanatomic basis for discogenic pain].* Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2004. 142(6): p. 706-8.
15. Boos, N., et al., *Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science.* Spine (Phila Pa 1976), 2002. 27(23): p. 2631-44.

16. Gravius, S., et al., *Die lumbale Bandscheibenprothese*. Deutsches Ärzteblatt, 2007: p. 2592-2598.
17. Goins, M.L., et al., *Nucleus pulposus replacement: an emerging technology*. Spine J, 2005. 5(6 Suppl): p. 317S-324S.
18. Joshi, A., et al., *Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement*. Biomaterials, 2006. 27(2): p. 176-84.
19. Bertagnoli, R., et al., *Mechanical testing of a novel hydrogel nucleus replacement implant*. Spine J, 2005. 5(6): p. 672-81.
20. Carl, A., et al., *New developments in nucleus pulposus replacement technology*. Spine J, 2004. 4(6 Suppl): p. 325S-329S.
21. Wirth, C.J., L. Zichner, and J. Krämer, *Orthopädie und orthopädische Chirurgie : Wirbelsäule, Thorax*. 2004: Thieme. 361-382.
22. Ambrosio, L., R. De Santis, and L. Nicolais, *Composite hydrogels for implants*. Proc Inst Mech Eng H, 1998. 212(2): p. 93-9.
23. Kettler, A., et al., *Biomechanical behavior of a new nucleus prosthesis made of knitted titanium filaments*. SAS J, 2007. 1(4): p. 125-30.
24. Sieber, A.N. and J.P. Kostuik, *Concepts in nuclear replacement*. Spine J, 2004. 4(6 Suppl): p. 322S-324S.
25. Pistorius, A. and B. Willershausen, *Biocompatibility of dental materials in two human cell lines*. Eur J Med Res, 2002. 7(2): p. 81-8.
26. Taksali, S., J.N. Grauer, and A.R. Vaccaro, *Material considerations for intervertebral disc replacement implants*. Spine J, 2004. 4(6 Suppl): p. 231S-238S.
27. Tang, L. and W. Hu, *Molecular determinants of biocompatibility*. Expert Rev Med Devices, 2005. 2(4): p. 493-500.
28. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Semin Immunol, 2008. 20(2): p. 86-100.
29. Anderson, J.M., *Inflammatory response to implants*. ASAIO Trans, 1988. 34(2): p. 101-7.
30. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system - First of two parts*. New England Journal of Medicine, 2000. 343(1): p. 37-49.
31. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. 125(2): p. S33-S40.
32. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. 357(9270): p. 1777-1789.
33. Dearnley, P.A., K.L. Dahm, and H. Çimenoğlu, *The corrosion–wear behaviour of thermally oxidised CP-Ti and Ti–6Al–4V*. Wear, 2004. 256(5): p. 469-479.
34. Jacobs, J.J., et al., *Wear particles*. J Bone Joint Surg Am, 2006. 88 Suppl 2: p. 99-102.
35. Muller, M., G. Wassilew, and C. Perka, *[Diagnosis and therapy of particle disease in total hip arthroplasty]*. Z Orthop Unfall, 2015. 153(2): p. 213-29.
36. Tendulkar, G., et al., *Imaging Cell Viability on Non-transparent Scaffolds - Using the Example of a Novel Knitted Titanium Implant*. J Vis Exp, 2016(115).

37. Schildberger, A., et al., *Monocytes, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and THP-1 Cells Exhibit Different Cytokine Expression Patterns following Stimulation with Lipopolysaccharide*. Mediators of Inflammation, 2013.
38. Ciapetti, G., *Wear of Orthopaedic Implants and Artificial Joints*. 2012, Cambridge: Woodhead Publishing.
39. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s)*. Microscopy Research and Technique, 2000. 50(3): p. 184-195.
40. Hoffmann, S., et al., *International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells*. Journal of Immunological Methods, 2005. 298(1-2): p. 161-173.
41. Goeddel, D.V., et al., *Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51 Pt 1: p. 597-609.
42. Krueger, J.M., et al., *Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha*. Ann N Y Acad Sci, 1998. 856: p. 148-59.
43. Wride, M.A. and E.J. Sanders, *Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development*. Anat Embryol (Berl), 1995. 191(1): p. 1-10.
44. Pirog, K.A., Y. Stabinsky, and R. Goldman, *Cytokine Index*. 2010, New Jersey: PreproTech Inc. 300.
45. Daigneault, M., et al., *The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages*. Plos One, 2010. 5(1).
46. Auwerx, J., *The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation*. Experientia, 1991. 47(1): p. 22-31.
47. Collins, S.J., *The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression*. Blood, 1987. 70(5): p. 1233-44.
48. Collins, S.J., et al., *Terminal Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia-Cells Induced by Dimethyl-Sulfoxide and Other Polar Compounds*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. 75(5): p. 2458-2462.
49. Wang, Y.L., *Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part A. Fluorescent analogs, labelling cells, and basic microscopy*. Methods Cell Biol, 1989. 29: p. 1-328.
50. Kiefer, J., *Ultraviolette Strahlen*. 1 ed. 1977, Berlin ; New York: de Gruyter. 660.
51. Reid, S., R. Cross, and E.C. Snow, *Combined Hoechst 33342 and merocyanine 540 staining to examine murine B cell cycle stage, viability and apoptosis*. J Immunol Methods, 1996. 192(1-2): p. 43-54.
52. Arndt-Jovin, D.J. and T.M. Jovin, *Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content*. J Histochem Cytochem, 1977. 25(7): p. 585-9.
53. Dorn-Beineke, A. and U. Sack, *Qualitätskontrolle und Validierung in der diagnostischen Durchflusszytometrie*. 2016.

54. Valet, G., *Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective*. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2003. 17(3): p. 213-222.
55. Stellwagen, N.C., *Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution*. Electrophoresis, 2009. 30: p. S188-S195.
56. Suman, S., A. Pandey, and S. Chandna, *An improved non-enzymatic "DNA ladder assay" for more sensitive and early detection of apoptosis*. Cytotechnology, 2012. 64(1): p. 9-14.
57. Arakawa, T., Y. Kita, and S.N. Timasheff, *Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide*. Biophys Chem, 2007. 131(1-3): p. 62-70.
58. Rastogi, R.P., Richa, and R.P. Sinha, *Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity*. Excli Journal, 2009. 8: p. 155-181.
59. Elmore, S., *Apoptosis: A review of programmed cell death*. Toxicologic Pathology, 2007. 35(4): p. 495-516.
60. Kanduc, D., et al., *Cell death: Apoptosis versus necrosis (review)*. International Journal of Oncology, 2002. 21(1): p. 165-170.
61. Kurosaka, K., et al., *Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages*. J Immunol, 2003. 171(9): p. 4672-9.
62. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. 26(4): p. 239-57.
63. Trump, B.F., et al., *The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis*. Toxicol Pathol, 1997. 25(1): p. 82-8.
64. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. 27(5-6): p. 612-6.
65. Mittal, M., et al., *Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury*. Antioxidants & Redox Signaling, 2014. 20(7): p. 1126-1167.
66. Daneshian, M., S. von Aulock, and T. Hartung, *Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay*. Nature Protocols, 2009. 4(12): p. 1709-1721.
67. Ensafi, A.A., T. Khayamian, and F. Hasanpour, *Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection*. J Pharm Biomed Anal, 2008. 48(1): p. 140-4.
68. Stoica, B.A., et al., *Improving Luminol Blood Detection in Forensics*. J Forensic Sci, 2016. 61(5): p. 1331-6.
69. Korge, A., et al., *A spiral implant as nucleus prosthesis in the lumbar spine*. European Spine Journal, 2002. 11: p. S149-S153.
70. Bridwell, K.H., et al., *What's new in spine surgery*. J Bone Joint Surg Am, 2013. 95(12): p. 1144-50.
71. Gallo, J., et al., *Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty*. Innate Immun, 2013. 19(2): p. 213-24.
72. Riss, T.L., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004: Bethesda (MD).

73. Nass, N., et al., *Oxidative stress and glyoxalase I activity mediate dicarbonyl toxicity in MCF-7 mamma carcinoma cells and a tamoxifen resistant derivative*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. 1860(6): p. 1272-80.
74. De Arriaga, D., J. Soler, and E. Cadenas, *Influence of pH on the allosteric properties of lactate dehydrogenase activity of *Phycomyces blakesleeanus**. *Biochem J*, 1982. 203(2): p. 393-400.
75. Sambur, J.B., et al., *Sub-particle reaction and photocurrent mapping to optimize catalyst-modified photoanodes*. *Nature*, 2016. 530(7588): p. 77-80.
76. Athanasou, N.A., *The pathobiology and pathology of aseptic implant failure*. *Bone Joint Res*, 2016. 5(5): p. 162-8.
77. Schindler, S., et al., *Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood*. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten*, 2009. 26(4): p. 265-277.
78. Schindler, S., et al., *Comparison of the reactivity of human and rabbit blood towards pyrogenic stimuli*. *ALTEX*, 2003. 20(2): p. 59-63.
79. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. *Journal of Infectious Diseases*, 1999. 179: p. S294-S304.
80. Schindler, R., et al., *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF*. *Blood*, 1990. 75(1): p. 40-7.
81. Helset, E., et al., *Endothelin-1 Stimulates Human Monocytes in-Vitro to Release Tnf-Alpha, Il-1-Beta and Il-6*. *Mediators of Inflammation*, 1993. 2(6): p. 417-422.
82. Bitar, D. and J. Parvizi, *Biological response to prosthetic debris*. *World J Orthop*, 2015. 6(2): p. 172-89.
83. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. 13(6): p. 455-81.
84. Lesinska, M., et al., *Procalcitonin and macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1beta) in serum and peritoneal fluid of patients with decompensated cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis*. *Adv Med Sci*, 2014. 59(1): p. 52-6.
85. Selvan, R.S., L.J. Zhou, and M.S. Krangel, *Regulation of I-309 gene expression in human monocytes by endogenous interleukin-1*. *Eur J Immunol*, 1997. 27(3): p. 687-94.
86. Chen, T., et al., *Profiling the human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* by human cytokine array*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016. 97: p. 108-17.
87. Lu, Y., et al., *Inflammatory and immune markers associated with physical frailty syndrome: findings from Singapore longitudinal aging studies*. *Oncotarget*, 2016. 7(20): p. 28783-95.
88. Willemse, S.B., et al., *Intrahepatic IP-10 mRNA and plasma IP-10 levels as response marker for HBeAg-positive chronic hepatitis B patients treated with peginterferon and adefovir*. *Antiviral Research*, 2016. 131: p. 148-155.

89. Passmore, J.A., H.B. Jaspan, and L. Masson, *Genital inflammation, immune activation and risk of sexual HIV acquisition*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2016. 11(2): p. 156-62.
90. Morita, Y., et al., *Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis patients*. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1997. 98(1): p. 19-33.
91. Dresner-Pollak, R., et al., *Biochemical markers of bone turnover reflect femoral bone loss in elderly women*. *Calcif Tissue Int*, 1996. 59(5): p. 328-33.
92. Cocchi, F., et al., *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. *Science*, 1995. 270(5243): p. 1811-5.
93. Miller, M.D. and M.S. Krangel, *The Human Cytokine-I-309 Is a Monocyte Chemoattractant*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. 89(7): p. 2950-2954.
94. Holm, L.L., et al., *A comparison of interferon-gamma and IP-10 for the diagnosis of tuberculosis*. *Pediatrics*, 2014. 134(6): p. e1568-75.
95. Hallab, N.J. and J.J. Jacobs, *Biologic effects of implant debris*. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2009. 67(2): p. 182-8.
96. Jacobs, J.J., et al., *Osteolysis: basic science*. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(393): p. 71-7.
97. Goodman, S.B., E. Gibon, and Z. Yao, *The basic science of periprosthetic osteolysis*. *Instr Course Lect*, 2013. 62: p. 201-6.
98. Wiedenmann, J., et al., *EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(45): p. 15905-15910.
99. Schreiner, L., et al., *Phagocytosis and digestion of pH-sensitive fluorescent dye (Eos-FP) transfected E. coli in whole blood assays from patients with severe sepsis and septic shock*. *J Cell Commun Signal*, 2011. 5(2): p. 135-44.
100. Munoz, L.E., et al., *Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(40): p. E5856-E5865.

## 9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Andreas Nüssler für die ausgesprochen gute Betreuung meiner Arbeit und deren Begutachtung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Sabrina Ehnert. Sie unterstützte mich vom Beginn bis zur Fertigstellung meiner Dissertation und stand mir zu jeder Zeit mit Ihrem Fachwissen und Ihrer Erfahrung zur Seite.

Der größte Dank geht an meine einmalige Familie. Die gegenseitige Unterstützung, der Zuspruch und unser Zusammenhalt sind einfach überragend!

