
Klinik und Poliklinik für
Orthopädie und Sportorthopädie der
Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe)

**Auswirkungen von Abriebprodukten
aus dem Interface zwischen Hüftendoprothesenstiel
und Knochenzement auf humane Knochenzellen**

Georg Simon Gattung

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart
2. Prof. Dr. Andreas B. Imhoff

Die Dissertation wurde am 23.03.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.12.2018 angenommen.

Für meine Eltern,
die mir den Weg zu einem der schönsten Berufe ermöglicht haben,
und für meine Frau Vanessa,
der ganz einfach mein Herz gehört.

“Willst du für ein Jahr vorausplanen, so baue Reis.
Willst du für ein Jahrzehnt vorausplanen, so pflanze Bäume.
Willst du für ein Jahrhundert vorausplanen, so bilde Menschen aus.“

Tschuang Tse
chinesischer Philosoph,
ca. 300 v. Chr.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen | 1 |
| 2 | Einleitung | 2 |
| 2.1 | Die aseptische Prothesenlockerung | 2 |
| 2.2 | Pathophysiologie der partikelinduzierten Prothesenlockerung | 4 |
| 2.3 | Morphologie und Größenverteilung von Abriebpartikeln in vivo | 5 |
| 2.4 | Zellbiologisches In-vitro-Modell der aseptischen Prothesenlockerung | 7 |
| 3 | Problemstellung und Zielsetzung | 8 |
| 4 | Material und Methoden | 10 |
| 4.1 | Verwendete Partikelarten | 10 |
| 4.1.1 | Generierte Abriebpartikel | 10 |
| 4.1.2 | Kommerzielle Referenzpartikel | 11 |
| 4.2 | Isolierung der metallischen Abriebprodukte | 11 |
| 4.2.1 | Partikelverlust sowie qualitative Veränderung der Abriebprodukte bei der Proben- Aufbereitung | 12 |
| 4.2.1.1 | Zentrifugation | 12 |
| 4.2.1.2 | Filtration und Resuspension des Filtrerrückstands | 13 |
| 4.2.2 | Proben-Aufbereitung | 14 |
| 4.2.2.1 | Auflösen des Knochenzements | 14 |
| 4.2.2.2 | Filtration | 14 |
| 4.2.2.3 | Inverse Spülung des Filtrerrückstands | 15 |
| 4.2.2.4 | Resuspension des Filtrerrückstands im Ultraschallbad | 16 |
| 4.3 | Herstellen der Stammlösungen und Sterilisation der Partikel | 17 |
| 4.4 | Quantitative und qualitative Analyse der Abriebprodukte | 17 |
| 4.4.1 | Atomabsorptionsspektrometrie | 17 |
| 4.4.2 | Ultrafine Particle Analyser | 18 |
| 4.4.3 | Cell-Counter | 19 |
| 4.5 | Zellbiologische Untersuchungen | 19 |
| 4.5.1 | Verwendete Zelllinien und Behandlung der Zellkulturen | 19 |
| 4.5.1.1 | Osteosarkomzellen (SAOS-2) | 20 |
| 4.5.1.2 | Primäre humane Knochenzellen (Osteoblasten) | 21 |
| 4.5.2 | Immunhistochemie | 23 |
| 4.5.3 | Einfluss von Abriebpartikeln auf humane Knochenzellen | 24 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.5.3.1 | Auswirkungen des Lösungsmittels DMSO auf die Proliferation von Osteosarkomzellen (SAOS-2) | 25 |
| 4.5.3.2 | Einfluss von kommerziellen Titan- und Zirkonpartikeln auf das Proliferationsverhalten von Osteosarkomzellen (SAOS-2) | 25 |
| 4.5.3.3 | Einfluss von generierten Abriebpartikeln aus dem Prothesen-Zement-Interface sowie kommerziellen Referenzpartikeln auf das Proliferationsverhalten und die Apoptoserate von humanen Osteoblasten | 26 |
| 4.5.4 | Proliferations- und Apoptose-Assays | 28 |
| 4.5.4.1 | MTT-Test | 28 |
| 4.5.4.2 | Hexosaminidase-Test | 29 |
| 4.5.4.3 | Annexin-V-Assay | 29 |
| 4.5.4.4 | Sytox-Assay | 30 |
| 4.5.5 | Lichtmikroskopie..... | 30 |
| 4.6 | Statistische Auswertung..... | 30 |
| 5 | Ergebnisse..... | 31 |
| 5.1 | Qualitative und Quantitative Analysen der Partikel und Abriebprodukte | 31 |
| 5.1.1 | Größenverteilung der kommerziellen Referenzpartikel | 31 |
| 5.1.2 | Einfluss der Methoden zur Isolierung des Metallabriebs auf ausgewählte Größen der Partikelzusammensetzung | 32 |
| 5.1.2.1 | Partikelverlust bei der Zentrifugation | 32 |
| 5.1.2.2 | Partikelverlust bei der Filtration und Resuspension | 33 |
| 5.1.2.3 | Größenverteilung der Partikel nach Filtration und Resuspension..... | 34 |
| 5.2 | Zellbiologische Untersuchungen..... | 36 |
| 5.2.1 | Zellbiologische Untersuchungen mit Osteosarkomzellen (SAOS-2) | 36 |
| 5.2.2 | Auswirkungen des Lösungsmittels DMSO auf das Proliferationsverhalten von Osteosarkomzellen (SAOS-2) | 36 |
| 5.2.3 | Auswirkungen der kommerziellen Partikel auf die Proliferation von Osteosarkomzellen (SAOS-2) | 37 |
| 5.2.4 | Auswirkungen der Abriebprodukte auf humane Knochenzellen | 38 |
| 5.2.4.1 | Immunhistochemische Charakterisierung der humanen Knochenzellen..... | 39 |
| 5.2.4.2 | Phagozytose der Abriebprodukte | 40 |
| 5.2.4.3 | Auswirkungen der nativen Abriebprodukte auf humane Osteoblasten..... | 42 |
| 5.2.4.4 | Auswirkungen der isolierten metallischen Abriebprodukte auf humane Osteoblasten | 43 |

| | | |
|---------|---|----|
| 6 | Diskussion..... | 48 |
| 6.1 | Qualitative und quantitative Analysen der Partikel und Abriebprodukte | 48 |
| 6.1.1 | Größenverteilung der kommerziellen Referenzpartikel | 48 |
| 6.1.2 | Einfluss der Methoden zur Isolierung des Metallabriebs auf ausgewählte Größen der Partikelzusammensetzung | 48 |
| 6.1.2.1 | Partikelverlust bei der Zentrifugation | 48 |
| 6.1.2.2 | Partikelverlust bei der Filtration und Resuspension | 49 |
| 6.1.2.3 | Größenverteilung der Partikel nach Filtration und Resuspension..... | 49 |
| 6.2 | Zellbiologische Untersuchungen..... | 50 |
| 6.2.1 | Zellbiologische Untersuchungen mit humanen Osteosarkomzellen (SAOS-2)..... | 50 |
| 6.2.1.1 | Auswirkungen des Lösungsmittels DMSO auf das Proliferationsverhalten von humanen Osteosarkomzellen (SAOS-2)..... | 50 |
| 6.2.1.2 | Auswirkungen der kommerziellen Partikel auf das Proliferationsverhalten von humanen Osteosarkomzellen..... | 51 |
| 6.2.2 | Auswirkungen der Abriebprodukte auf primäre humane Knochenzellen..... | 54 |
| 6.2.2.1 | Immunhistochemische Charakterisierung der primären humanen Knochenzellen..... | 54 |
| 6.2.2.2 | Phagozytose der Abriebprodukte | 55 |
| 6.2.2.3 | Auswirkungen der nativen Abriebprodukte auf primäre humane Knochenzellen..... | 55 |
| 6.2.2.4 | Auswirkung der isolierten metallischen Abriebprodukte auf primäre humane Knochenzellen..... | 58 |
| 7 | Zusammenfassung | 61 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 62 |
| 9 | Chemikalienverzeichnis..... | 72 |
| 10 | Danksagung | 74 |

1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| AAS | Atomabsorptions-Spektrometrie |
| AEC | 3-Amino-9-Ethylcarbazol |
| BaSO ₄ | Bariumsulfat |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| CoCr | Cobalt-Chrom |
| cp Ti | commercially pure Titanium (kommerziell hergestelltes Reintitanpulver) |
| DMEM | Dulbeccos Modified Eagles Medium (Zellkulturmedium) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetat |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| FCS | Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum) |
| HCl | Chlorwasserstoff (Salzäure) |
| HOB | Humane Osteoblasten |
| H-TEP | Hüft-Totalendoprothese |
| IL | Interleukin |
| LDH | Laktat-Dehydrogenase |
| MTT | 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid |
| NBT | Nitro blue tetrazolium chloride |
| OAF | Osteoclast activating factor |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PBMNC | Peripheral blood mononuclear cells |
| PC | Polycarbonat |
| PE | Polyethylen |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| PI | Propidium-Iodid |
| PK | Proteinase K |
| PMMA | Polymethylmetacrylat |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| REM | Raster-Elektronenmikroskop |
| SAOS-2 | humane Osteosarkomzelllinie |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| TGFβ | Transforming Growth Factor beta |
| Ti | Titan |
| TiAlV | Titan-Aluminium-Vanadium |
| TiO ₂ | Titanoxid |
| TNFα | Tumornekrosefaktor alpha |
| UPA | Ultrafine Particle Analyser |
| ZrO ₂ | Zirkonoxid |

2 Einleitung

In der Therapie der Coxarthrose stellt der endoprothetische Hüftgelenkersatz ein wesentliches Prinzip der modernen orthopädischen Chirurgie dar. Zurzeit werden weltweit jährlich etwa 750.000 Hüftgelenkendoprothesen implantiert [Lappalainen et al. 2003], allein für Deutschland wird die Anzahl der implantierten Hüftendoprothesen mit 150.000 pro Jahr angegeben [Katzner et al. 2003b].

Da zunehmend auch jüngere Patienten für einen künstlichen Gelenkersatz in Frage kommen, werden an die modernen Endoprothesen immer höhere Ansprüche bezüglich einer möglichst langen Standzeit gestellt. Aber gerade bei jungen und körperlich aktiven Patienten liegt die durchschnittliche Überlebensrate einer Hüftendoprothese deutlich unterhalb derjenigen bei älteren Patienten [Puolakka et al. 2001].

Aufgrund der guten Langzeitergebnisse ist die Verankerung des Hüftendoprothesenstiels im Femur mittels Knochenzement als Standardverfahren anerkannt, der hierbei meist verwendete Werkstoff für die Hüftendoprothesenstiele ist eine Cobalt-Basislegierung oder Cobalt-Chrom (CoCr). Wegen ihrer guten physikalischen Eigenschaften sowie der biologischen Verträglichkeit zählen neben diesen Materialien auch Titan-Legierungen zu den bevorzugt eingesetzten Werkstoffen in der Endoprothetik [Willert et al. 1996]. Im Gegensatz dazu zeigen jedoch einige zementierte Hüftendoprothesenstiel-Modelle aus Titan-Basis-Legierungen (Ti) zum Teil signifikant höhere Frühversagensraten als konventionelle zementierte Hüftstiele aus CoCr-Legierungen [Lichtinger et al. 2000; Massoud et al. 1997; Maurer et al. 2001]. Einige Autoren raten deshalb von der Verwendung zementierter Hüftendoprothesenstiele aus Titan ab [Willert et al. 1996] oder beurteilen deren Verwendung zumindest kritisch [Lichtinger et al. 2000]. In anderen Untersuchungen wiederum konnte kein signifikanter Unterschied in der mittel- und langfristigen Lockerungsrate von zementierten Hüftendoprothesenstielen aus Titan gegenüber solchen aus Cobalt-Legierungen beobachtet werden [Eingartner et al. 1997; Eingartner et al. 2002; Rader et al. 2000]. Die Frage, ob allein die Auswahl des Prothesenwerkstoffs für den langfristigen Erfolg einer Hüftendoprothese ausschlaggebend ist, gilt also noch als ungeklärt.

2.1 Die aseptische Prothesenlockerung

Die Hauptursache für eine erforderliche Wechseloperation der Hüftendoprothese ist die aseptische Endoprothesenlockerung. Demgegenüber sind andere Ursachen wie etwa Infektionen, Luxationen, Knochen- oder Implantatbrüche eher nachrangig [Andersson et al. 2000; Elke 2001;

Haynes et al. 1993; Mann et al. 1991; Puolakka et al. 2001; Rader et al. 1999; Shanbhag et al. 1995; Sun et al. 2000; Verdonschot et al. 1998]. Zu dieser Lockerung tragen neben patientenspezifischen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Knochenqualität sowie körperliche Aktivität [Amstutz et al. 1992; Katzer et al. 2003a] auch Einflüsse bei, die durch die Verankerungs- und Operationstechnik bedingt sind [Meek et al. 2002]. Besonders hervorzuheben sind prothesenspezifische Faktoren, deren Optimierung Gegenstand intensiver Forschungsarbeit ist. Hier spielen neben dem Werkstoff des alloplastischen Materials auch das Prothesendesign sowie die Oberflächenbeschaffenheit eine wesentliche Rolle [Meek et al. 2002].

Bei der aseptischen Endoprothesenlockerung scheinen Abriebpartikel eine wesentliche Rolle zu spielen, die sich im periprothetischen Gewebe ansammeln und dort durch eine zellbiologisch vermittelte Immunantwort eine Entzündungsreaktion aufrechterhalten, die letztlich zur periprothetischen Osteolyse führt [Amstutz et al. 1992; Doorn et al. 1996]. Bei weiterem Fortschreiten der Reaktion lockert sich der Hüftendoprothesenstiel und macht eine Wechseloperation erforderlich.

Die Abriebpartikel entstehen an allen Materialgrenzflächen, überwiegend an der Gleitpaarung zwischen künstlichem Hüftkopf und Pfannen-Inlay, aber auch an den Interfacegrenzen zwischen Knochen, Implantat und Zement sowie an allen Grenzflächen modular aufgebauter Implantate [Elke 2001]. Da vor allem für zementierte Hüftstiele aus Titan massive Frühlockerungen beobachtet wurden, richteten wir unser Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit auf die Interfacegrenze zwischen dem Hüftendoprothesenstiel und dem ihn umgebenden Zementmantel.

Eine Vielzahl von Autoren beschreiben zudem eine bei der Revisionsoperation deutlich sichtbare Schwärzung des umgebenden Granulationsgewebes [Agins et al. 1988; Haynes et al. 1993; Scholl et al. 2000; Witt et al. 1991]. In mehreren Arbeiten konnte histologisch nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um eine Ansammlung von Abriebpartikeln handelt.

Initiale Mikrobewegungen zwischen Implantat und Zementmantel führen zur von Willert et al. beschriebenen Spalt- und Reibkorrosion [Willert et al. 1996]. Für den anfänglichen Lockerungsprozess werden durch das Prothesendesign bedingte hohe Scherkräfte an der Implantat-Zement-Grenze sowie eine ungenügende Dicke des Zementmantels verantwortlich gemacht [Meek et al. 2002]. Kommt es zum Bruch des Zementmantels, gewinnen die als Folge der Reibkorrosion entstandenen Abriebpartikel Anschluss an die am Knochenmetabolismus beteiligten Zellen. Jedoch konnten Massin et al. in einer Untersuchung von im Rahmen einer Autopsie entnommenen Hüftendoprothesenstielen zeigen, dass auch bei intaktem Zementmantel und fest sitzendem Hüftendoprothesenstiel Abriebpartikel – in diesem Fall PE-Partikel aus den artikulierenden Oberflächen zwischen Prothesenkopf und Pfannen-Inlay – sowohl im Interface zwischen Kno-

chen und Zementmantel als auch zwischen Hüftendoprothesenstiel und Zementmantel nachweisbar waren [Massin et al. 2004].

2.2 Pathophysiologie der partikelinduzierten Prothesenlockerung

Pathogenetisch kommt den Makrophagen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der partikelinduzierten Osteolyse eine Schlüsselrolle zu [Amstutz et al. 1992; Goodman et al. 1998; Otto et al. 2006]. Wie in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte, erlaubt die Morphologie sowie die Größenverteilung der Abriebpartikel deren Phagozytose [Goodman et al. 2006; Neale et al. 2000; Pioletti et al. 1999; Shanbhag et al. 1994a; Shanbhag et al. 1995]. Die Phagozytose der Abriebpartikel führt durch zahlreiche parakrine Regulationsvorgänge zu einer verminderten Knochenneubildung und zu einer vermehrten Knochenresorption. Das von den Makrophagen sezernierte $\text{TNF}\alpha$ beispielsweise führt zu einer vermehrten Produktion von PGE_2 durch Osteoblasten, was wiederum zu einer vermehrten Osteoklastenaktivität führt [Horowitz et al. 1994]. Deshalb wird $\text{TNF}\alpha$ auch als „osteoclast activating factor“ (OAF) bezeichnet [Amstutz et al. 1992].

Demgegenüber führt das von den Makrophagen sezernierte $\text{TNF}\alpha$ und andere Interleukine wie IL-1 und IL-6 sowie das vermindert gebildete $\text{TGF}\beta$ zu einer Minimierung der Osteoblastenaktivität [Goodman et al. 1998; Horowitz et al. 1993; Sabokbar et al. 1995].

Wenngleich Makrophagen im Zentrum des zellbiologischen Geschehens bei der aseptischen Prothesenlockerung stehen, so sind die Interaktionen sowie die dabei beteiligten Zellpopulationen sehr vielgestaltig [Goodman et al. 1998; Horowitz et al. 1994]. Neben Makrophagen sind an der Pathogenese der aseptischen Prothesenlockerung auch alle anderen Zellarten des Knochenmetabolismus wie Osteoblasten, Osteoklasten und Fibroblasten beteiligt. Die Auswirkungen von Abriebpartikeln auf Makrophagen [Amstutz et al. 1992; Glant et al. 1993; Haynes et al. 1993; Horowitz et al. 1994; Ingham et al. 2000; Nakashima et al. 1999] bzw. Monozyten [Rogers et al. 1997; Shanbhag et al. 1997] sind in der Literatur gut untersucht.

Demgegenüber sind die Auswirkungen von Abriebprodukten auf Fibroblasten und Osteoblasten wenig untersucht.

2.3 Morphologie und Größenverteilung von Abriebpartikeln in vivo

Wie bereits erwähnt, entstehen Abriebpartikel überwiegend an der Gleitpaarung zwischen Prothesenkopf und Pfannen-Inlay, aber auch an allen anderen Materialgrenzflächen der Hüftendoprothese. Entsprechend finden sich in histologischen Untersuchungen von periprothetischem Gewebe Partikel unterschiedlichster Materialien. Quantitativ den größten Anteil haben hier bei PE-Gleitpaarungen PE-Partikel; den volumenmäßig weitaus geringeren Anteil haben Partikel aus dem Prothesenwerkstoff (meist Titan oder CoCr), dem Knochenzement (PMMA) einschließlich der Röntgenkontrastzusätze (meist ZrO_2 , früher auch $BaSO_4$).

Willert et al. berichtete über einen weiten Größenbereich von aus periprothetischem Gewebe gewonnenen PE-Partikeln von $0,5 - 300 \mu m$ [Doorn et al. 1996; Willert et al. 1993]; jedoch beobachtete er auch vermehrt kleinere Partikel ($0,5 - 20 \mu m$), wenn der Abriebpartner nicht Polyethylen, sondern Metall oder Knochenzement war. McGrath et al. konnten in histologischen Untersuchungen von periprothetischem Gewebe von gelockerten Titan-Hüftendoprothesenstielen Partikel überwiegend im Größenbereich von $1-5 \mu m$ nachweisen [Mcgrath et al. 2001]. Allerdings muss konstatiert werden, dass – wie im Fall der beiden vorgenannten Arbeiten – das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie beim Nachweis von Partikeln im Sub-Mikrometerbereich an seine methodischen Grenzen stößt [Goodman et al. 1998].

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Anteil der PE-Partikel unter $1 \mu m$ Größe misst. So berichten Shanbhag et al., dass 92% aller Partikel kleiner als $1 \mu m$ waren und eine mittlere Größe von $0,53 \pm 0,3 \mu m$ aufwiesen [Shanbhag et al. 1994b]. Des Weiteren wurden ca. 5-10% der Gesamt-Partikelmenge mittels quantitativer Energie-Dispersions-Radiografie (EDX) als Titanpartikel identifiziert. Deren Form war überaus vielgestaltig, meist in Form von länglichen Scheiben mit einer maximalen Länge von $10-400 \mu m$. Auch wird in der Arbeit von Shanbhag et al. erwähnt, dass der Großteil der Partikel in der Lichtmikroskopie nicht sichtbar gemacht werden konnte und es sich bei den Beobachtungen von anderen Autoren wahrscheinlich um Aggregate kleinerer Partikel handelte.

In den Arbeiten, die die zellbiologischen Auswirkungen von Abriebpartikeln in vitro untersuchten, wurden zumeist kommerziell hergestellte Metallpartikel verwendet. Diese werden in der Regel durch Reibverschleißverfahren hergestellt, indem durch Reibung von zwei oder mehr Werkstücken aus dem entsprechenden Metall gegeneinander der entsprechende Metallabrieb entsteht. Dieses Verfahren liefert zwar Metallpartikel mit einem konstanten und reproduzierbaren Größenspektrum, jedoch ist der Großteil der so hergestellten und eingesetzten Partikel im Größenbereich zwischen $1-5 \mu m$ oder noch größer [Glant et al. 1996; Haynes et al. 1993; Lee et al.

1997; Maloney et al. 1998; Neale et al. 2000; Palmboos et al. 2002; Pioletti et al. 1999; Rader et al. 1999; Rogers et al. 1997; Shanbhag et al. 1995; Shida et al. 2000; Tsutsui et al. 1999; Vermes et al. 2001; Yao et al. 1995]. Wie Analysen von periprothetischem Gewebe von aseptisch gelockerten Hüftendoprothesenstielen zeigten, sind die darin vorkommenden Abriebpartikel zum überwiegenden Teil deutlich unter 1 μm im Durchmesser [Akisue et al. 2002; Manlapaz et al. 1996; Mitchell et al. 2003; Shanbhag et al. 1994b; Shanbhag et al. 1997].

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die zellbiologische Reaktion der am Knochenmetabolismus beteiligten Zellen von unterschiedlichen Charakteristika der jeweiligen Abriebpartikel abhängt. Eine entscheidende Rolle spielt neben dem Material der Abriebpartikel auch deren Größenverteilung und Form [Amstutz et al. 1992; Choi et al. 2005; Goodman et al. 2006; O'Connor et al. 2004; Otto et al. 2006]. Anscheinend wird das Zellwachstum von Osteoblasten bzw. Fibroblasten *in vitro* durch Titanpartikel unter etwa 5 μm Größe mehr beeinträchtigt als durch Partikel von größerem Durchmesser [Goodman et al. 1998; Goodman et al. 2006; Papageorgiou et al. 2007; Sommer et al. 2005], gleichzeitig bewirken kleinere Partikel eine erhöhte Sekretion von inflammatorischen Zytokinen [Glant et al. 1996; Nakashima et al. 1999; Shanbhag et al. 1994a].

Jedoch sind die beobachteten Effekte von so genannten Nanopartikeln, das heißt Partikeln mit Durchmessern im Bereich unter 100 nm, auf das Zellwachstum von primären Knochzellen unterschiedlich. Zum Einen konnte gezeigt werden, dass CoCr-Nanopartikel bei Fibroblasten im Vergleich zu Mikropartikeln deutlich mehr Zellschäden hervorrufen [Papageorgiou et al. 2007]. Dies wurde unter anderem durch indirekte Effekte wie der vermehrten Bildung von freien Radikalen durch die Anwesenheit von Nanopartikeln im Zellkulturmedium erklärt.

Dem gegenüber wurde von Pioletti et al. die Beobachtung gemacht, dass der zellschädigende Effekt auf Osteoblasten, welcher durch Titanpartikel im Größenbereich von 1,5-5 μm verursacht wird, am größten ist und unterhalb dieses Größenbereichs wieder abnimmt [Goodman et al. 2006; Pioletti et al. 1999]. In einer Arbeit von Hou et al. wurden ähnliche Effekte an mesenchymalen Stammzellen beobachtet, wobei durch TiO_2 -Nanopartikel im Größenbereich von 196 nm die größten negativen Einflüsse auf die Zelladhäsion, -proliferation, -migration und -differenzierung zu beobachten waren und diese Effekte demgegenüber sich durch noch kleinere Partikel im Größenbereich von 108 nm bzw. 14 nm deutlich abgeschwächt darstellten [Hou et al. 2013].

Entsprechend dieser Beobachtungen werden die Mechanismen und die Rolle von Abriebprodukten im Größenbereich unter 100 nm bei der Entstehung der aseptischen Prothesenlockerung zur Zeit noch kontrovers beurteilt [Goodman et al. 2006; Hou et al. 2013; Papageorgiou et al. 2007].

Neben der oben genannten inflammatorischen Zellantwort werden hierbei auch direkte schädigende Mechanismen durch oxidativen Stress oder Veränderung des intrazellulären Säuremilieus durch phagozytierte Partikel diskutiert [Hou et al. 2013]. Darüber hinaus wird in einigen Arbeiten auch ein direkter zytotoxischer Effekt von Abriebpartikeln diskutiert, welcher über einen DNA-schädigenden Einfluss von Nanopartikeln zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt [Gallo et al. 2013].

2.4 Zellbiologisches In-vitro-Modell der aseptischen Prothesenlockerung

Sämtliche vorgenannten Arbeiten, in denen die zellbiologischen Auswirkungen von kommerziell hergestellten Partikeln untersucht wurden, bieten den Vorteil einer sehr differenzierten Betrachtungsmöglichkeit einzelner Teilaspekte des sehr komplexen Vorgangs der aseptischen Prothesenlockerung. Jedoch sind hiermit keine direkten Rückschlüsse auf die zellbiologischen und klinischen Auswirkungen von Änderungen einzelner Parameter des Prothesendesigns (z.B. Material, Oberflächenbeschaffenheit, Abriebverhalten etc.) möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein zellbiologisches In-vitro-Modell der aseptischen Hüftendoprothesenlockerung etabliert. Durch die Generierung des Abriebs zwischen verschiedenen Hüftendoprothesenstielen und Zementköchern unterschiedlicher Zusammensetzung bis zur Untersuchung der Auswirkungen des Abriebs auf primäre humane Knochenzellen können direkte Rückschlüsse von Unterschieden im Prothesendesign auf die zellbiologischen Auswirkungen gezogen werden. Darüber hinaus lassen sich durch die Extraktion und Untersuchung des metallischen Abriebanteils gesonderte Betrachtungen durchführen.

3 Problemstellung und Zielsetzung

Zur Behandlung der fortgeschrittenen Coxarthrose stellt der endoprothetische Hüftgelenkersatz ein wesentliches Prinzip der modernen orthopädischen Chirurgie dar, jedoch ist die aseptische Endoprothesenlockerung nach wie vor eine der Hauptversagensgründe der Hüftgelenksendoprothetik. Durch die Ansammlung von Abriebpartikeln im periprothetischen Gewebe wird dort durch eine zellbiologisch vermittelte Immunantwort eine Entzündungsreaktion aufrechterhalten, die letztlich zur periprothetischen Osteolyse führt. Durch zahlreiche parakrine Regulationsvorgänge kommt es zu einer Störung des physiologischen Gleichgewichts zwischen Knochenneubildung und Knochenabbau, wobei neben Macrophagen und Osteoklasten auch Osteoblasten eine wesentliche Rolle spielen.

Die Zellantwort auf derartige Abriebprodukte scheint neben der Abriebmenge nicht unwesentlich vom Material der Abriebpartikel sowie von deren Morphologie und Größenverteilung abhängig zu sein. Vor allem dem metallischen Anteil der Abriebprodukte kommt für die zellulären Auswirkungen eine besondere Bedeutung zu. Für in-vitro-Versuche bietet die Verwendung von kommerziell hergestellten Partikeln praktische Vorteile. Um jedoch ein möglichst realitätsnahes in-vitro-Modell der partikelinduzierten Hüftendoprothesenlockerung von zementierten Hüftendoprothesenstielen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit in einem Prothesenprüfstand generierte Abriebpartikel verwendet. Neben der Morphologie der Abriebprodukte wurden auch die zellulären Auswirkungen auf primäre humane Knochenzellen untersucht. Zudem wurde eine Methode zur Isolation des metallischen Anteils des generierten Gesamtabriebs in einer für spätere Zellversuche kompatiblen Form etabliert. Durch die Untersuchung der zellulären Auswirkungen speziell des metallischen Anteils des Abriebs auf primäre humane Knochenzellen ergibt sich die Möglichkeit einer gesonderten Betrachtung der Rolle des metallischen Abriebs in der Entstehung der aseptischen Endoprothesenlockerung. Im Speziellen wurden die zellbiologischen Auswirkungen der Abriebprodukte von zementierten Hüftendoprothesenstielen aus Titan-Aluminium-Vanadium-Legierungen (TiAlVa) sowie aus Cobalt-Chrom-Legierungen in jeweils unterschiedlicher Oberflächenbehandlung und -rauheit auf die Proliferation, Nekroserate und Apoptoserate von Osteosarkomzellen sowie von primären humanen Knochenzellen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollen die folgenden Fragen näher betrachtet werden:

- Ist der klinisch beobachtete Effekt der Frühlockerung von zementierten Hüftendoprothesenstielen aus Titanlegierungen durch Unterschiede in der Zellantwort auf Abriebpartikel unterschiedlicher Legierungen zu erklären?

- Inwieweit zeigen sich Unterschiede oder Gemeinsamkeiten in der Zellreaktion auf Abriebpartikel von Hüftendoprothesenstielen unterschiedlicher Legierungen und unterschiedlicher Knochenzement-Arten?
- Welche Rolle spielt die Oberflächenrauheit der Hüftendoprothesenstiele in der Zusammensetzung des entstehenden Abriebs und welche zellulären Auswirkungen werden hierdurch hervorgerufen?
- Inwieweit lassen sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Verbesserungen in der Produktion und Entwicklung der Hüftendoprothesen-Werkstoffe ableiten?

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Partikelarten

Um die zellbiologischen Auswirkungen von Abriebprodukten aus dem Interface zwischen Hüftendoprothesen-Stiel und Knochenzement untersuchen zu können, wurden neben den eigens in einem speziellen Prüfstand generierten Abriebpartikeln auch kommerziell hergestellte Partikel zum Vergleich herangezogen.

4.1.1 Generierte Abriebpartikel

Die Herstellung der für die späteren Zellversuche verwendeten Abriebprodukte aus dem Prothesenstiel-Zement-Interface erfolgte in einem eigens angefertigten Prüfstand (siehe Abbildung 1) Hierbei wird in einem realitätsnahen Modell der Zustand eines im Zementköcher gelockerten und reibenden Hüftendoprothesen-Stiels simuliert, indem nach vorausgegangener partieller distaler Stiel-Zementierung und anschließendem „Lockern“ des Interfaces zwischen Implantat und Zement definierte Relativbewegungen von 0,55 mm zwischen Stiel und fixiertem Zementköcher bei definierten Flächenpressungen von 0,64 kN mit Hilfe regelbarer Hydraulikzylinder appliziert werden. Relativbewegung und Flächenpressung orientieren sich an aus der Literatur bekannten Werten [Mann et al. 1991; Ramaniraka et al. 2000].

Als Prüfobjekte dienten Hüftendoprothesenstiele unterschiedlicher Legierungen und Oberflächenrauheiten (Tab. 1) Zur Herstellung der Zementköcher wurde handelsüblicher

Tabelle 1: Getestete Hüftendoprothesen-Stiele bzw. Knochenzement-Arten zur anschließenden Isolierung des metallischen Anteils des Abriebs zur Durchführung von Zellversuchen mit primären humanen Knochenzellen.

| Hüftendoprothesen-Stiel | | Knochenzement | Stiel-Nr. | Menge |
|-------------------------|------------|---|----------------|--------|
| Legierung | Oberfläche | | | |
| CoCrMo | glatt | Palacos [®] R mit ZrO ₂ | 9, 21, 22, 55a | 32 mg |
| CoCrMo | rau | Palacos [®] R mit ZrO ₂ | 14, 15 | 57 mg |
| CoCrMo | rau | CMW | 35 | 622 mg |
| TiAlV | rau | Palacos [®] R mit ZrO ₂ | 19, 27, 44 | 195 mg |
| TiAlV | glatt | CMW | 24 | 92 mg |

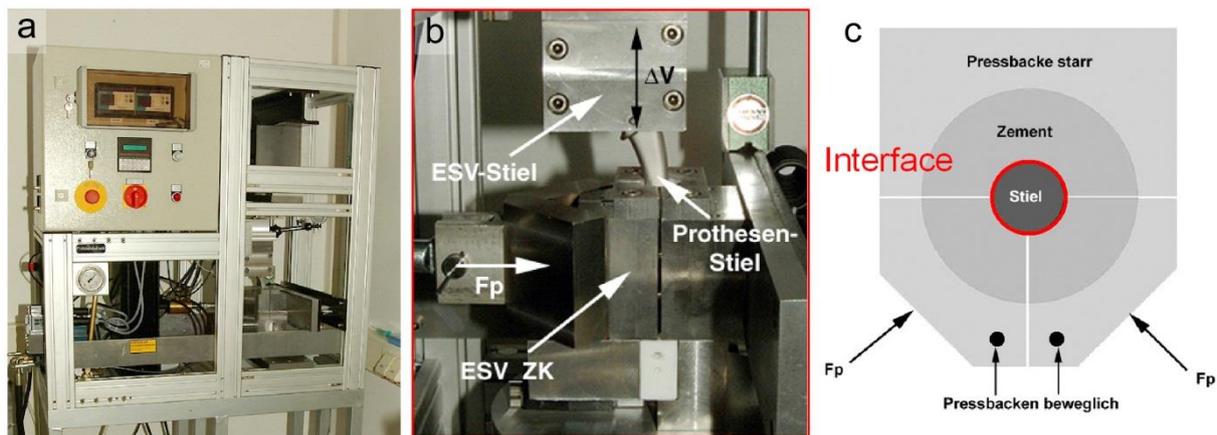


Abbildung 1 Partikelprüfstand zur Generierung der Abriebpartikel aus dem Interface zwischen Hüftendoprothesen-Stiel und Knochenzement (a). (b): Detailvergrößerung aus (a): ESV-Stiel = Einspannvorrichtung für den Hüftendoprothesen-Stiel; ESV ZK = Einspannvorrichtung für den Zementköcher; F_p = Anpresskraft [0,64 kN] (c): Einleitung der Anpresskraft auf den dreiteiligen Zementköcher über zwei drehbar gelagerte Pressbacken mittels kraftregelbarer Hydraulikzylinder (aus [Bader et al. 2004])

Knochenzement mit ZrO_2 (Palacos R[®]) sowie ein speziell auf Palacos R Basis angefertigter Knochenzement ohne ZrO_2 verwendet. Nach Anmischen und Ausformung in einer speziell angefertigten Zementiervorrichtung wurde der Stiel aus dem Zementköcher entfernt und der Köcher im Anschluss zur Realisierung einer gleichmäßig verteilten Flächenpressung in der Grenzfläche reproduzierbar in drei Teile aufgetrennt. Die Einzementierung des Stieles erstreckte sich aus versuchstechnischen Gründen über das mittlere und distale Stiel-Drittel. Die freigesetzten Abriebpartikel wurden in einem speziellen Behälter aus Polytetrafluorethylen (PTFE) aufgefangen. Eine Testung des Prothesenstiels bzw. Zementköchers erfolgte jeweils über 3 Mio. Bewegungszyklen.

4.1.2 Kommerzielle Referenzpartikel

Für vergleichende zellbiologische Untersuchungen wurden zudem folgende kommerziell hergestellte Referenzpartikel verwendet: Reintitan ($cpTi$; Körnung: 3 μm , Fa. Chemetall), zwei Titanoxid-Pulver unterschiedlicher Körnung (TiO_2 ; Körnung: 0,5 μm bzw. 1,8 μm , Fa. Sachtleben, Duisburg) sowie reines polykristallines ZrO_2 (Fa. Heraeus Kulzer, Wertheim).

4.2 Isolierung der metallischen Abriebprodukte

Wesentliches Ziel dieser Arbeit ist neben der zellbiologischen Untersuchung über die Auswirkung von unaufbereitetem (nativem) Grenzflächen-Abriebprodukt auf humane Knochenzellen die gesonderte Untersuchung der biologischen Wirkung der metallischen Abriebprodukte. Der überwiegende Anteil des im Prüfstand entstehenden Abriebpulvers besteht aus Knochenzement-

Abrieb und nur ein verschwindend geringer Anteil des Gesamtabriebs rührt von der Werkstoffoberfläche des Hüftendoprothesen-Stiels bzw. dem ZrO_2 -Anteil des Knochenzements her. ZrO_2 -Partikel dienen der Kontrastierung des Zementköchers für radiologische Untersuchungen. Um die zellulären Auswirkungen der metallischen Abriebpartikel im Gesamtabrieb gesondert betrachten zu können, musste eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, den PMMA-Anteil im generierten Abrieb in einer für spätere Zellversuche kompatiblen Weise zu eliminieren bzw. den metallischen Abrieb-Anteil zu extrahieren. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf einer größtmöglichen Ausbeute an metallischen Partikeln.

4.2.1 Partikelverlust sowie qualitative Veränderung der Abriebprodukte bei der Proben-Aufbereitung

Um unerwünschte Wirkungen des für die Auflösung des Knochenzements erforderlichen Lösungsmittels DMSO in zellbiologischen Untersuchungen auszuschließen, musste ein Verfahren zur Extraktion der metallischen Produkte aus oben hergestellter Lösung gefunden werden.

Da das vorrangige Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines Extraktionsverfahrens der für nachfolgende Zellversuche interessanten Partikel im Größenbereich von unter $1\ \mu\text{m}$ ist, sollte eine Veränderung der ursprünglich in der Ausgangslösung vorgefundenen Größenverteilung der Partikel ausgeschlossen werden können.

Im Folgenden sollen zwei Aufbereitungsverfahren vorgestellt werden, die hinsichtlich des dabei auftretenden Verlusts an metallischen Abriebprodukten sowie der Größenverteilung der Partikel in der Ausgangslösung und in der aufbereiteten Probe untersucht wurden.

4.2.1.1 Zentrifugation

Die Zentrifugation bietet die Möglichkeit, bedingt durch die höhere Feststoffdichte der Partikel im Vergleich zum Lösungsmittel die Sedimentation zu beschleunigen. In Vorversuchen hatte sich die alleinige Sedimentation der Partikel ohne Zentrifugation zur Isolierung der Partikel als unzureichend erwiesen [Wittmann 2006]. Im folgenden Versuchsaufbau wurden je 2 ml der Partikelstammlösung (1 mg/ml) von Reintitan und zwei Titanoxydpartikellösungen mit unterschiedlicher Partikelgrößenverteilung (mittlerer Durchmesser: $0,5\ \mu\text{m}$ bzw. $1,8\ \mu\text{m}$) mittels einer Pasteurpipette aus Glas in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte für 20 min. bei 13.000 U/min., das entspricht ca. $16060\ \text{x g}$. Der Überstand (1,5 ml) wurde in ein Glasgefäß überführt und anschließend mittels AAS (siehe 4.4.1) auf seinen Titangehalt hin analysiert. Das Eppen-

dorfgefäß mit dem Rückstand (0,5 ml) wurde anschließend mit 1,5 ml Aqua dest. aufgefüllt und abermals zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt fünf Mal wiederholt. Zuletzt wurde das Eppendorfgefäß mit dem Vortex kräftig geschüttelt und anschließend für 10 min. im Ultraschallbad behandelt. Um die Partikelrückstände möglichst gänzlich in Lösung zu bringen, wurden die letzten beiden Schritte dreimal wiederholt. Die so gewonnene Lösung wurde anschließend in ein Glasgefäß pipettiert und ebenfalls analysiert.

4.2.1.2 Filtration und Resuspension des Filtrerrückstands

Im folgenden Versuch wurde eine Partikel-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt, um den Partikelverlust, der durch die Filtration und die anschließende Re-Suspension des Filtrerrückstands auftritt, quantifizieren zu können. Um darüber hinaus den Einfluss der Partikelgröße sowie der Titanlegierung (Titanoxyd oder Reintitan) auf den Partikelverlust studieren zu können, kamen Lösungen mit Titanoxydpulver mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 µm bzw. von 1,8 µm sowie eine Lösung mit Reintitanpulver zum Einsatz.

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden je 100 mg der drei o.g. Pulver in je einen 100-ml-Erlenmeyerkolben aus Glas mit Hilfe einer Labor-Feinwaage (Scaltec® SBC 32) abgewogen. Der Erlenmeyerkolben wurde nun mit Aqua dest. bis zur 100-ml-Marke aufgefüllt und anschließend für 10 min. im Ultraschallbad behandelt, um die Agglomeration der einzelnen Metallpartikel in der Lösung herabzusetzen.

Filtration der Partikellösung und anschließende Re-Suspension des Filtrerrückstands. Die Filtration der Partikellösungen erfolgte mit einem Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 0,1 µm (Nuclepore®, Fa. Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), der in einen Glas-Filterhalter eingesetzt wurde. Mit einer Pasteurpipette wurden nun 2 ml der zuvor 10 min. im Ultraschallbad behandelten Partikel-Stammlösung auf den montierten Filter pipettiert. Als Leerwert diente anstatt der Partikel-Stammlösung partikelfreies Aqua dest., mit dem ansonsten genauso verfahren wurde wie mit den Partikellösungen. Das Filtrat wurde in einem Glasgefäß mit aufschraubbarem Deckel aufgefangen und ebenfalls auf seinen Titangehalt sowie auf die Größenverteilung der darin enthaltenen Partikel hin untersucht.

Der Glasfilterhalter wurde anschließend demontiert und der Filter wurde vorsichtig mit einer Pinzette in ein 15-ml-Schraubglas überführt. Dieses wurde mit 2 ml Aqua dest. aufgefüllt und 10

min. im Ultraschallbad behandelt, so dass der metallische Rückstand auf dem Filter in Lösung gehen konnte.

Am Ende der Behandlung im Ultraschallbad wurde der Filter langsam aus dem Schraubglas herausgezogen und bis zur weiteren Untersuchung in einem leeren 15-ml-Schraubglas aufbewahrt. Die Proben der Partikel-Stammlösungen, der Filtrate sowie die Lösungen mit dem rückgewonnenen Filtrerrückstand wurden mit Atomabsorptionsspektrometrie auf ihren Titangehalt hin untersucht sowie einer Bestimmung der Partikelkonzentration unterzogen.

4.2.2 Proben-Aufbereitung

4.2.2.1 Auflösen des Knochenzements

In Vorversuchen hat sich das Lösungsmittel DMSO als geeignet erwiesen, den PMMA-Anteil des Knochenzements suffizient aufzulösen [Wittmann 2006]. Hierzu wurden Abriebprodukte verschiedener Hüftendoprothesen-Stiele bzw. Knochenzement-Arten mit Hilfe einer Labor-Feinwaage (Scaltec[®] SBC 32) in ein 15 ml-Schraubglas-Gefäß abgewogen (siehe Tabelle 1). Da die zu erwartende Menge an metallischem Abrieb im Gesamtabrieb einiger getesteter Hüftendoprothesenstiele für anschließende Zellversuche nicht ausgereicht hätte, wurden teilweise die Abriebprodukte mehrerer getesteter Hüftendoprothesenstiele gleicher Legierung (TiAlV bzw. CoCrMo) bzw. gleicher Oberflächentopographie (glatt ($R_z=7\ \mu\text{m}$) bzw. rau ($R_z=20\ \mu\text{m}$)) zusammengefasst. Anschließend wurden in das Gefäß jeweils 15 ml DMSO pipettiert und diese Lösung kräftig geschüttelt, um eine homogene Suspension zu erreichen. Die Lösungen wurden für ca. 15 min. im Ultraschallbad behandelt und anschließend über Nacht stehen gelassen, damit der PMMA-Anteil des Knochenzements ausreichend Zeit hatte, sich aufzulösen.

4.2.2.2 Filtration

Zur Filtration der Proben diente ein Filterhalter-System aus Glas der Fa. Millipore (Billerica, Massachusetts, USA), auf das ein Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von $0,1\ \mu\text{m}$ (Nucleopore[®], Fa. Millipore) montiert wurde. Das Filtersystem steckte mit dem Gummipfropf an seinem unteren Ende in einem Erlenmeyer-Kolben, der einen Anschluss für den Schlauch einer Vakuum-Pumpe besitzt (ebenfalls Fa. Millipore, siehe Abbildung 2) Nach einer etwa 15minütigen Behandlung der Proben im Ultraschall-Bad wurden diese mit einer Pasteurpipette in das Filtersystem pipettiert. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe (MINI-VAC E1, Axon Lab AG, Schweiz) wurde an das System ein Vakuum angelegt, das während der gesamten Filtrationsdauer bestand. Hierzu

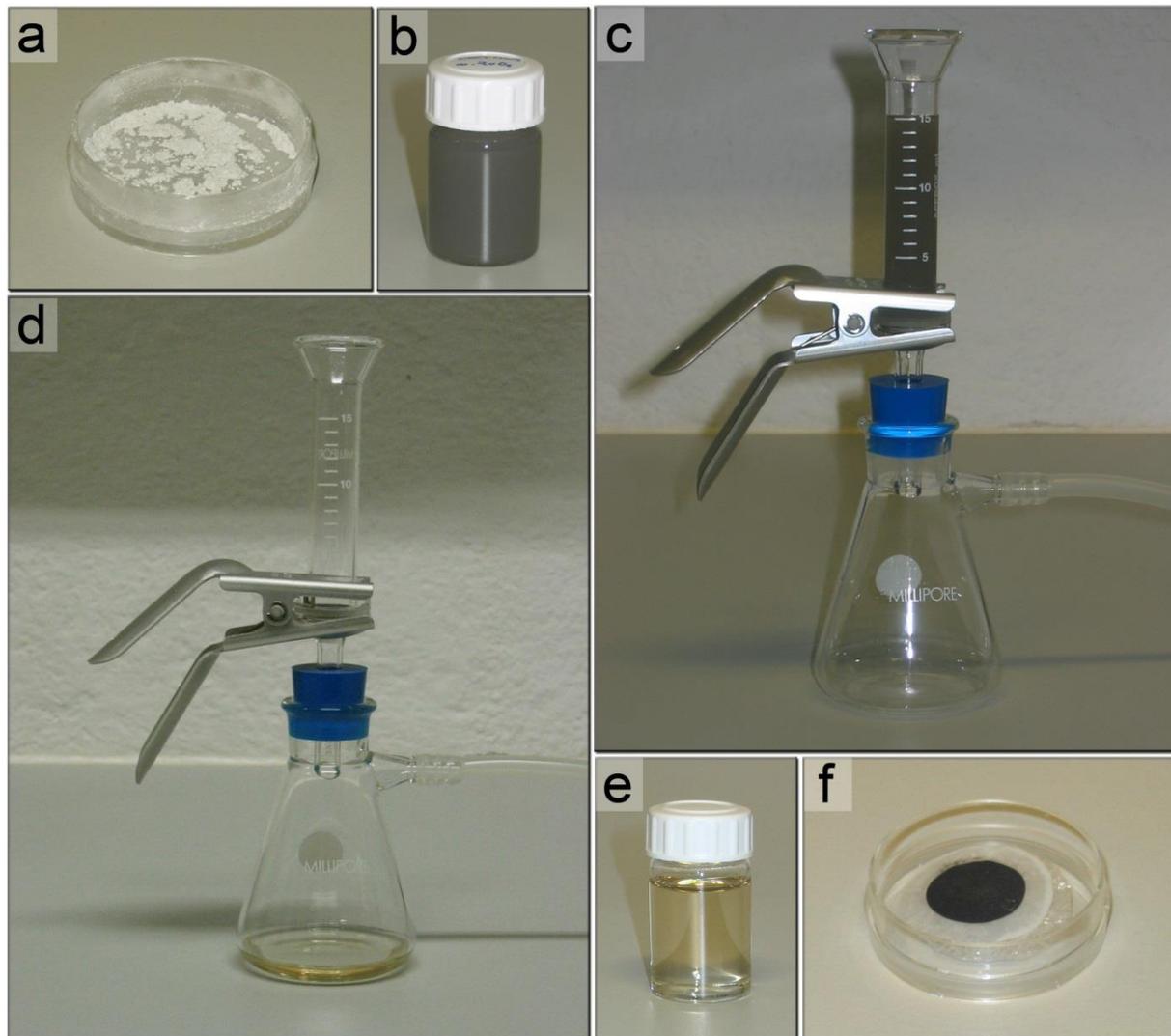


Abbildung 2: Isolation der metallischen Abriebprodukte aus dem nativen Gesamt-Abrieb. Der im Partikelprüfstand entstandene Abrieb (a) wurde in 15 ml DMSO aufgelöst und im Ultraschallbad behandelt (b). Diese Lösung wurde in das Filtersystem eingebracht (c) und unter Anlegen eines Vakuums filtriert (d). Das Filtrat (e) enthält überwiegend den in DMSO aufgelösten PMMA-Anteil des Knochenzements. Der metallische Teil des Abriebs verbleibt als Rückstand auf dem Filter (f), der dann anschließend im Ultraschallbad in PBS resuspendiert wurde.

hatte es sich als notwendig erwiesen, den Übergang zwischen Filterhalter und Erlenmeyerkolben zusätzlich mit Laborfilm abzudichten.

4.2.2.3 Inverse Spülung des Filtrerrückstands

Der metallische Filtrerrückstand musste nun wieder vom Filter in eine für Zellkulturen verträgliche Lösung gebracht werden. Anfänglich wurde versucht, durch Umdrehen der Filteranordnung den Filtrerrückstand vom Filter zu spülen. In einer ersten Versuchsanordnung wurde eine Suspension aus kommerziell hergestelltem Reintitanpulver filtriert und anschließend die Filteranordnung umgedreht. Eine Spülung mit Aqua dest. zeigte jedoch keine suffiziente Wirkung, den Filtrerrück-

stand vom Filter zu lösen (Daten nicht gezeigt). Zudem wären hierzu große Mengen an Spülflüssigkeit notwendig gewesen, so dass neben einer hohen Partikelverlustrate auch eine extrem niedrige Partikelkonzentration in der Endlösung resultierten. Eine sinnvolle Durchführung von zellbiologischen Untersuchungen mittels dieser Partikellösung wäre dann unmöglich geworden.

Aus diesen Gründen musste ein Verfahren gefunden werden, bei dem der Filtrerrückstand möglichst vollständig und in einer möglichst kleinen Menge Flüssigkeit in Lösung gehen konnte. Nur wenn diese beiden Vorgaben erfüllt werden können, ist die Partikelkonzentration in der Endlösung hoch genug, um für anschließende Zellversuche eingesetzt werden zu können. Diese Vorgaben konnten mithilfe der Resuspension des Filtrerrückstands unter Anwendung von Ultraschallenergie realisiert werden.

4.2.2.4 Resuspension des Filtrerrückstands im Ultraschallbad

Nach der Filtration wurde der Glas-Filterhalter demontiert und der Polycarbonat-Filter mit dem metallischen Abrieb als Rückstand vorsichtig mit einer Pinzette abgenommen und über Nacht getrocknet. Anschließend wurde der Filter in ein 15 ml-Schraubglasgefäß gegeben und es wurden 5 ml PBS hinzu pipettiert. Von einer direkten Suspension des Filtrerrückstands in Zellkulturmedium wurde aus Gründen der zeitlich nur sehr begrenzten Haltbarkeit dieser Lösung Abstand genommen.

Anschließend wurde das Glasgefäß am Schraubdeckel zusätzlich mit Laborfilm abgedichtet und in ein Ultraschallbad gegeben. Nach einer etwa 10minütigen Ultraschallbehandlung konnte der Filtrerrückstand wieder in Lösung gehen. Von diesen 5 ml Partikellösung wurde ein Aliquot von 500 μ l abpipettiert, anhand dessen die Konzentrationsbestimmung des jeweiligen Elements (Cobalt oder Titan) in der Lösung mittels AAS mit Probenaufschluss (siehe Kapitel 4.4.1) erfolgte. Die restlichen 4,5 ml der Partikellösung wurden mit einer Pasteurpipette aus Glas in ein 5-ml-Schraubglasgefäß pipettiert. Die so gewonnenen Partikellösungen wurden anschließend sterilisiert (siehe 4.3) und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Das Volumen wurde vor der Sterilisation mit einem wasserfesten Stift am Glasgefäß markiert. Der während des Sterilisationsvorgangs durch Verdampfen entstandene Volumenverlust in der Partikellösung wurde mit sterilem PBS wieder auf 4,5 ml aufgefüllt.

4.3 Herstellen der Stammlösungen und Sterilisation der Partikel

Für die anschließenden Zellversuche wurden Stammlösungen der jeweiligen Partikelart hergestellt, welche anschließend sterilisiert wurden und bei Bedarf in einer Verdünnungsreihe mit DMEM für Zellversuche zum Einsatz kamen. Zur Herstellung der Stammlösungen wurden je 50 mg von Reintitan (cpTi; Körnung: 3 μm , Fa. Chemetall), zwei Titanoxyd-Pulver unterschiedlicher Körnung (TiO_2 ; Körnung: 0,5 μm bzw. 1,8 μm , Fa. Sachtleben, Duisburg) sowie reinem polykristallinem ZrO_2 (Fa. Heraeus Kulzer, Wertheim) mit Hilfe einer Labor-Feinwaage (Scaltec[®] SBC 32) in ein 15 ml-Schraubglasgefäß aus Glas abgewogen. Von den nativen generierten Abriebprodukten wurden je 5 mg in ein 5 ml-Schraubglasgefäß abgewogen. Die Partikel wurden anschließend einer Gamma-Sterilisation (Dosis 25 kGy; Fa. Isotron, Allershausen) unterzogen, da sich bei einer Dampfsterilisation eine beträchtliche Agglomeration des Knochenzement-Abriebs bei den nativen Grenzflächenprodukten beobachten ließ. Unter nunmehr sterilen Bedingungen wurden zu den kommerziellen Partikeln je 5 ml und zu den nativen generierten Partikeln je 2,5 ml PBS pipettiert, sodass sich für die kommerziellen Partikel eine Stammlösung von 10 mg/ml und für die nativen generierten Partikel eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml ergab.

4.4 Quantitative und qualitative Analyse der Abriebprodukte

4.4.1 Atomabsorptionsspektrometrie

Messung mit Probenaufschluss. Die Atomabsorptionsspektrometrie erlaubt die Konzentrationsbestimmung von chemischen Elementen bis in den Spurenbereich. Beim vorher durchgeführten Probenaufschluss gehen die in Feststoffform als Partikel vorliegenden Metalllegierungen komplett in Lösung. So werden Sedimentationseffekte, die störende Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hätten, ausgeschaltet. Je nach Probenzusammensetzung und den zu analysierenden Elementen werden verschiedene Aufschlüsse verwendet. Hier kam ein Druckaufschluss zur Anwendung, bei dem die Probe in einer Druckaufschlussbombe mit Ammoniumfluorid und Salpetersäure unter Druck erhitzt wurde. Durch dieses Probenaufschlussverfahren werden durch Kochen der Probe in Salpetersäure die in der Probe enthaltenen Metallverbindungen in lösliche Salze überführt und störende Matrixverbindungen zerstört. Durch das enthaltene Ammoniumfluorid werden Silikate zerstört, die im Silikat enthaltenen Kationen gehen hierbei in Lösung.

Zunächst wurde in die Aufschlussbomben aus Teflon je 1 g Ammoniumfluorid abgewogen. Der Inhalt der Proben, deren Titangehalt es zu bestimmen galt, wurden hinzugefügt und die Gefäße

je dreimal mit 1 ml einer 65%igen Salpetersäure ausgespült und ebenfalls in die Aufschlussbombe überführt. Mit zwei abschließenden Spülschritten wurden die Aufschlussbomben mit je 1 ml der 65%igen Salpetersäure gespült, um eventuelle Anhaftungen an der Teflonwand zu vermeiden. Der Probenaufschluss erfolgte mit einem Mikrowellenaufschlussgerät bei einer Temperatur von ca. 140 bis 160°C über eine Dauer von 60 min. Die aufgeschlossenen Proben wurden in 50-ml-Kolben überführt. Nach mehrmaligem Nachspülen der Aufschlussbombe mit Aqua dest. wurde der 50-ml-Kolben bis zur Eichmarke mit Aqua dest. aufgefüllt.

Messung ohne Probenaufschluss. Für die Bestimmung des Metallgehalts der nativen Abriebpulver wurde die Messung am Atomabsorptions-Spektrometer ohne Probenaufschluss durchgeführt. Hierzu wurde an einer Feinwaage das jeweilige Abriebpulver in einen 10 ml-Glaskolben abgewogen. Die Pulvermenge errechnete sich durch Differenzbildung der zuvor bestimmten Taragewichte der Glaskolben und der anschließend gemessenen Bruttogewichte. Zu den Glaskolben wurde 1 ml einer 37%igen Salzsäure pipettiert und 3g Glycerin abgewogen. Anschließend wurden die Glaskolben mit Aqua dest. bis zur Eichmarke aufgefüllt und für 15 bis 30 min. im Ultraschallbad behandelt. Das Glycerin diente dazu, durch die erhöhte Viskosität der Lösung Sedimentationseffekte der Partikel zu minimieren und so falsch niedrige Messergebnisse zu verhindern.

Standardlösung, Blanklösung und Modifier. Bei jeder Bestimmung eines Elements dienten eine Blanklösung als Leerwert und eine Standardlösung bekannter Titan- bzw. Cobalt-Konzentration zur Erstellung einer Eichgeraden. Anhand dieser Eichgeraden wurde die Konzentration der Proben durch Extrapolation bestimmt. Bei der Konzentrationsbestimmung von Cobalt (Co) war zusätzlich die Verwendung eines Modifiers notwendig. Der Modifier erlaubt eine höhere Veraschungstemperatur des Elements und führt so zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis und zur Signalverstärkung. Als Modifier diente eine Lösung, die zu gleichen Teilen aus Palladium-(II)-chlorid (2g/l) und Hydroxylammoniumchlorid (100 g/l) bestand.

4.4.2 Ultrafine Particle Analyser

Der Ultrafine Particle Analyser (UPA 150, Microtrac Inc., Montgomeryville, PA, USA) erlaubt die Darstellung der Größenverteilung von Partikeln im Größenbereich von 5 nm bis ca. 6 µm. Dem Messprinzip liegt die Brown'sche Bewegung von in Suspension befindlichen Partikeln zugrunde. Der Betrag der Geschwindigkeit dieser Molekularbewegung ist direkt proportional zur Temperatur und indirekt proportional zur dynamischen Viskosität der Suspensionslösung. Die Größenbestimmung der Partikel erfolgt durch Berechnung aus der detektierten Frequenz, die

sich durch Interferenz der Wellenlänge des ausgestrahlten Lichts einer Lichtquelle und der Wellenlänge des vom Partikel reflektierten Streulichts ergibt.

Die Einzelmessung erfolgte während der Dauer von 180 s. Die dargestellten Messwerte ergaben sich aus dem arithmetischen Mittelwert von drei Einzelmessungen.

4.4.3 Cell-Counter

Zur Quantifizierung des Partikelverlusts, der durch die Probenaufbereitung entsteht, wurde die Partikelanzahl der Proben mit dem Cell-Counter Casy[®] 1 (Fa. Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Die Messung beruht auf einer Widerstandserhöhung, die die Partikel beim Durchtritt durch eine Kapillare verursachen. Zur Messung werden die Partikel in einer schwachen Elektrolytlösung suspendiert und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare gesaugt. Voraussetzung für dieses Messverfahren ist, dass die Partikel die Kapillare einzeln passieren. Die Partikel verdrängen beim Durchtritt durch die Kapillare eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Dies führt zu einer Erhöhung des Widerstands zwischen zwei Platin-Elektroden, die an der Kapillarstrecke angebracht sind, was als Maß für das Volumen der Partikel dient. Aus den einzelnen Signalen wird dann das Integral durch Pulsflächenanalyse berechnet.

4.5 Zellbiologische Untersuchungen

4.5.1 Verwendete Zelllinien und Behandlung der Zellkulturen

Für die Zellversuche wurden Osteosarkomzellen der Zelllinie SAOS-2 sowie eigens aus Patientenspongiosa angezüchtete primäre humane Knochenzellen (Osteoblasten) eingesetzt. Die Osteosarkomzellen dienten zur Durchführung von orientierenden Vorversuchen. Die Hauptversuche wurden mit den primären humanen Knochenzellen durchgeführt, um ein möglichst realitätsnahes in-vitro-Modell der partikelinduzierten Osteolyse zu schaffen.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Fa. Falcon mit einer Wachstumsoberfläche von 75 cm² in ca. 10 ml DMEM mit 10% FCS + 1% Glutamin, welches regelmäßig alle drei bis vier Tage gewechselt wurde, kultiviert. Sämtliche Arbeitsschritte, die sterile Umgebungsbedingungen erfordern, wurden unter der Laminar Flow (Herasafe[®], Fa. Heraeus, Hanau) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (Heracell[®], Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt bei hoher Luftfeuchtigkeit.

Zur Durchführung der Zellversuche wurden die Zellen in der jeweils angegebenen Dichte in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Hierzu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abpipettiert und verworfen. Nach einem Waschschrift mit ca. 2 ml PBS wurden 2 ml Trypsin-EDTA hinzu pipettiert und die Zellen 2 min. bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurden 2 ml DMEM hinzu pipettiert, um das Trypsin-EDTA zu inaktivieren. Durch kräftiges Klopfen der Zellkulturflasche wurden noch an der Oberfläche haftende Zellen in Suspension gebracht. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend in ein Falcon Bluecap überführt. Wenige µl der Zellsuspension wurden dazu verwendet, mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zelldichte der Suspension zu bestimmen. Die Zellsuspension wurde für 10 min. bei 250*g zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Fa. Eppendorf) und der Überstand abpipettiert. Das Zellsediment wurde nun so mit DMEM resuspendiert, dass die gewünschte Zelldichte erreicht wurde. Von dieser Suspension wurden nun je 100 µl in jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, wobei durch ständiges Schütteln des Falcon-Gefäßes ein Sedimentieren der Zellen verhindert wurde. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt wurde das Medium verworfen und durch das partikelhaltige Medium ersetzt.

4.5.1.1 Osteosarkomzellen (SAOS-2)

Zur Durchführung von orientierenden Vorversuchen dienen Osteoblasten der Zelllinie SAOS-2. Diese Zelllinie wurde 1973 aus dem primären Osteosarkom eines 11jährigen Patienten etabliert [Fogh et al. 1977b; Fogh et al. 1977a]. Die Versuche mit SAOS-2-Zellen wurden allesamt als Vorversuche für spätere Versuche mit humanen Osteoblasten durchgeführt. Durch die kurze Verdopplungszeit von ca. 43 h eignen sich Osteosarkomzellen im Gegensatz zu Osteoblasten zur Anzucht großer Zellmengen und zur Durchführung von vielen Versuchsansätzen innerhalb kurzer Zeit. Dennoch besitzen sie eine große Ähnlichkeit zu Osteoblasten und sind daher zur Betrachtung der Abläufe der am Knochenmetabolismus beteiligten Zellen geeignet.

Die Zellen wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen und unter den unter 4.5.1 genannten Bedingungen kultiviert.

Tabelle 2: Patientendaten der Knochen spender zur Anzucht der primären Knochenzellen

| Nr. | Geschlecht | Alter | Diagnose | OP |
|-----|------------|-------|--|-----------|
| 1 | weiblich | 53 J. | Dysplasiacoxarthrose re. | H-TEP re. |
| 2 | männlich | 59 J. | Coxarthrose re. | H-TEP re. |
| 3 | männlich | 45 J. | Coxarthrose bei Coxa vara epiphys. li. > re. | H-TEP li. |

4.5.1.2 Primäre humane Knochenzellen (Osteoblasten)

Anzucht der Zellen. Die Anzucht der humanen primären Knochenzellen erfolgte aus der Kultur von Knochenstücken, die im Rahmen eines alloplastischen Hüftgelenkersatzes dem Patienten aus dem Schenkelhals entnommen worden waren. Geschlecht, Alter sowie die jeweilige Diagnose und die darauf beruhende operative Therapie der Patienten sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Im Operationssaal wurden etwa 1-3 kleine Stücke (Größe ca. 0,5 bis 2 cm) des im Rahmen der Operation entnommenen Knochens unter streng sterilen Kautelen in ein 50-ml Falcon Bluecap-Gefäß überführt, dem zuvor ca. 5-10 ml, auf 37°C angewärmtes DMEM zugefügt wurden. Die weitere Verarbeitung des Knochens erfolgte unter ebenfalls sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow (Herasafe[®], Fa. Heraeus). Zunächst wurde das Nährmedium abgezogen und verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit ca. 10 ml PBS, wobei durch kräftiges Schütteln des Falcon-Gefäßes der Knochen von groben Blut- und Fettanhaftungen gereinigt wurde. Anschließend wurden die Knochenstücke mit einer Luer-Klemme entnommen und mit einem Einmal-Skalpell in ca. 1-2 mm große Stücke zerteilt. Diese wurden dann in ein frisches Falcon Bluecap überführt und drei Waschschrten mit PBS unterzogen, so dass das PBS anschließend klar war. Um einer eventuell auftretenden bakteriellen Kontamination vorzubeugen, wurden die Knochenstückchen nun mit PBS, das 3% Penicillin/Streptomycin enthält, bedeckt und 5 min. inkubiert. Es folgte ein Waschschrte mit PBS. Die Knochenstückchen wurden anschließend mit Trypsin-EDTA bedeckt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteaselösung Trypsin-EDTA wäscht die Außenseite der Knochenstückchen sauber und löst dort anhaftende Fibroblasten ab. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS sowie ein letzter Waschschrte mit DMEM. Das verwendete DMEM inaktiviert eventuell noch vorhandenes Trypsin-EDTA. Die Knochenstückchen wurden dann gleichmäßig auf die wells einer 6-well-Platte mit ca. 4 ml DMEM pro well verteilt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (Heracell[®], Fa. Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt bei hoher Luftfeuchtigkeit.

Nach ca. 72 h wurden die Knochenstückchen mit einer sterilen Pinzette in eine frische 6-well-Platte mit ca. 4 ml DMEM pro well umgesetzt. Hierdurch wird gewährleistet, dass noch vorhan-

dene, aber unerwünschte periphere Blutzellen mit der alten 6-well-Platte verworfen werden. Nach weiteren 72 h wurden die Knochenstückchen ein zweites Mal umgesetzt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Kultur ausschließlich in Ca^{2+} -freiem Medium, welches regelmäßig alle 3-4 Tage gewechselt wurde. Dadurch werden die im Knochen vorhandenen und für die Zellkultur unerwünschten Fibroblasten im Wachstum weitgehend unterdrückt. Das Zellwachstum wurde regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft.

Kryokonservierung der Zellen. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff konserviert und sind so nahezu unbegrenzt haltbar. Die Methode erlaubt des Weiteren, einen Pool von Zellen mehrerer Patienten und gleicher Passagezahl zu bilden, um den Einfluss individueller Zellmerkmale auf die Tests weitgehend zu umgehen und so die Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden bei subkonfluentem Wachstum (ca. 80% Konfluenz) von der Wachstumsoberfläche abtrypsinisiert. Hierzu wurde zunächst das Medium in den wells abpipettiert und verworfen. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden nun 0,5 ml Trypsin-EDTA pro well hinzugefügt und für 4 min. im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 -Gehalt inkubiert. Anschließend wurden zu jedem well ebenfalls 0,5 ml DMEM pipettiert, um das vorgelegte Trypsin-EDTA zu inaktivieren. Lose am Boden der wells anhaftende Zellen wurden durch vorsichtiges Kratzen mit der Pipette abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Falcon Bluecap überführt. Wenige μl der Zellsuspension wurden dazu verwendet, eine Neubauer-Zählkammer zu beschicken. Gemäß den Herstellerbeschreibungen ergibt der Mittelwert aus vier ausgezählten Quadraten multipliziert mit 10^4 die Zellanzahl pro ml Medium. Multipliziert man diesen Wert mit dem Volumen der Zellsuspension im ml, so erhält man die absolute Zellzahl. Die Zellsuspension wurde für 10 min. bei 250*g zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Fa. Eppendorf) und der Überstand abpipettiert. Das Falcon-Gefäß mit dem Zellsediment sowie das Einfriermedium mit 10% DMSO (Fa. Gibco) wurden nun auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in dem kalten Einfriermedium mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro ml resuspendiert und auf die Einfrier-röhrchen verteilt. Um einen möglichst langsamen Einfriervorgang von ca. 1°C pro min. zu gewährleisten, wurden die Einfrier-röhrchen unmittelbar anschließend in eine mit 1-Propanol befüllte Einfrierbox gestellt, welche dann in die Tiefkühltruhe (-80°C) gegeben wurde. Nach ca. 24 h konnten die Zellen unter den üblichen Sicherheitsmaßnahmen (Tragen von Schutzhandschuhen und Schutzbrille) in den flüssigen Stickstoff gestellt werden, wo sie bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

4.5.2 Immunhistochemie

Vorbereitung der Objektträger. Um die in den Tests verwendeten primären humanen Knochenzellen ausreichend mit immunhistochemischen Methoden charakterisieren zu können, müssen diese vorher auf Objektträgern angezchtet werden. Hierzu wurden Chamber Slides (Fa. Falcon, USA) verwendet. Dies sind Objektträger aus Glas, denen je vier Kammern aufgesetzt sind. Pro Patient wurden vier solcher Objektträger mit Zellen beschickt. In die Kammern wurde je 1 ml einer DMEM-Zellsuspension mit 10.000 Zellen/ml pipettiert. Die Chamber Slides wurden nun bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt in der Luft inkubiert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Zellwachstum überprüft. Bei subkonfluentem Wachstum (ca. 80% Konfluenz) wurde das Medium abgezogen und der Objektträger zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden mit einer Vorrichtung die aufgesetzten Kammern von den Objektträgern getrennt und ca. 3 h bei Raumluft getrocknet. Die Objektträger wurden in Alufolie eingewickelt und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Die aus humaner Knochenpongiosa gezüchtete Zellreihe wurde mit immunhistochemischen Methoden hinsichtlich für primäre Knochenzellen typischer Merkmale charakterisiert. Die immunhistochemische Darstellung von alkalischer Phosphatase (AP) und Kollagen Typ I erfolgte wie in Tabelle 3 ersichtlich. Alkalische Phosphatase und Kollagen Typ I sind typische Marker primärer Knochenzellen und erlauben eine ausreichende Charakterisierung dieser Zellreihe [Rodan et al. 1989; Rodan et al. 1987; Zreiqat et al. 1996].

Tabelle 3: Vorgehensweise der Fixierung und immunhistochemischen Färbung der Objektträger, auf denen zuvor die verwendeten primären Knochenzellen gezüchtet wurden. Zur Charakterisierung der Zell-Linie wurde alkalische Phosphatase und Kollagen 1 herangezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

| Schritt | Substrat / Reagenz | Dauer |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|
| Fixieren | | |
| 1 | PBS | 5 min. |
| 2 | PFA 4% | 20 min. |
| 3 | PBS | 5 min. |
| 4 | lufttrocknen | |
| Färbung alkalische Phosphatase | | |
| 5 | Tris-Puffer | 10 min. |
| 6 | BCIP | 15-20 min.; mikroskopische Kontrolle |
| 7 | Tris-Puffer | 10 min. |
| Färbung Kollagen I | | |
| 8 | PBS | 10 min. |
| 9 | Pepsin 0,4% in 10 mM HCl | 40 min. bei 37°C |
| 10 | PBS | 2 x 5 min. |
| 11 | FCS 5% in PBS | 30 min. |
| 12 | Kollagen I Antikörper | über Nacht |
| 13 | Brij 0,01% in PBS | 2 x 10 min. |
| 14 | biotinylierter Brückenantikörper 1:200 | 30 min. |
| 15 | PBS | 2 x 5 min. |
| 16 | Avidin/Biotin-Komplex (Vectastain®) | 30 min. |
| 17 | Brij 0,01% in PBS | 2 x 10 min. |
| 18 | PBS | 5 min. |
| 19 | AEC Substrat | mikroskopische Kontrolle |
| 20 | PBS | 5 min. |
| 21 | fließend Leitungswasser | |
| 22 | Haemalaun | 1 min. |
| 23 | fließend Leitungswasser | |
| 24 | eindecken mit Kaiser Glyceringelatine | |

4.5.3 Einfluss von Abriebpartikeln auf humane Knochenzellen

Um die Auswirkungen von Abriebpartikeln auf humane Knochenzellen zu untersuchen, wurden diese mit den im Prüfstand generierten sowie den daraus extrahierten Metallabriebpartikeln inkubiert. Da aufgrund von Vorversuchen davon auszugehen war, dass die Ausbeute an metallischem Abrieb für Zellversuche extrem gering sein würde, war eines der Hauptziele, innerhalb eines einzigen Versuchsansatzes unter Einsatz geringster Mengen an Partikeln sowohl Proliferation als auch die Apoptoserate bzw. die Nekroserate der Zellpopulation zu bestimmen. Hierzu wurde nach 72 h Inkubation der Zellen zunächst der Annexin-V Assay wie unter 4.5.4.3 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde in demselben Versuchsansatz die Nekroserate mit dem Sytox® Assay (siehe 4.5.4.4) gemessen. Zuletzt wurde die Proliferationsrate der Zellen mittels Hexosami-

nidase-Test bestimmt. Der Hexosaminidase-Test bietet gegenüber anderen Proliferations-Assays den Vorteil einer kurzen Inkubationszeit (90 min.) und eine einfache Handhabung.

4.5.3.1 Auswirkungen des Lösungsmittels DMSO auf die Proliferation von Osteosarkomzellen (SAOS-2)

In späteren Zellversuchen sollte auch der aus dem Gesamtabrieb isolierte metallische Anteil der Grenzflächendestruktionsprodukte zum Einsatz kommen. Zur Auflösung des Knochenzementanteils wurde ein organisches Lösungsmittel (DMSO) verwendet. Zunächst musste von einer Zelltoxizität des Lösungsmittels ausgegangen werden. Als Teil dieser Arbeit wurde auch das Proliferationsverhalten von humanen Osteosarkomzellen bei unterschiedlichen Konzentrationen DMSO (0,01; 0,1; 1; 5 und 10 Vol.-%) und bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten (3, 5, 7 und 10 Tage) untersucht. Diese Ergebnisse sollten als Orientierung für die Entwicklung einer Methode zur Isolierung der metallischen Abriebprodukte dienen.

Hierzu wurden jeweils 20.000 Zellen pro well in eine 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät. Pro Inkubationszeit wurde eine eigene 96-well-Platte angesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium verworfen und durch das DMSO-haltige Medium ersetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO-freiem Medium inkubiert wurden. Jeder Messwert wurde dreifach bestimmt und der Versuch wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Nach 3, 5, 7 bzw. 10 Tagen Inkubation erfolgte die Durchführung des MTT-Tests (siehe 4.5.4.1). Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte der Einzelmessungen aus zwei Versuchsreihen mit 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Die Proliferation ist als Prozentangabe im Verhältnis zur Proliferation der Kontrolle angegeben.

4.5.3.2 Einfluss von kommerziellen Titan- und Zirkonpartikeln auf das Proliferationsverhalten von Osteosarkomzellen (SAOS-2)

Als orientierender Vorversuch wurde die Abhängigkeit der Proliferationsaktivität von SAOS-2 Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von kommerziellen Reintitan- bzw. Zirkonoxid (ZrO_2)-Partikeln untersucht. Hierzu wurden SAOS-2 Zellen in einer Dichte von 3000 Zellen pro well wie unter 4.5.1 beschrieben in eine 96-well-Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium verworfen und durch das partikelhaltige Medium ersetzt. Für diesen Versuch kam ein Reintitanpulver sowie Zirkonoxidpulver (ZrO_2) zum Einsatz (Fa. Chemetall, Frankfurt). Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde zunächst von jeder Partikelart eine Stammlösung mit einem Gehalt von 10 mg/ml hergestellt. Hierzu wurden die bereits bei 25,0 bis 35,0 kGy gammasterilisierten (Fa. Isotron Deutschland GmbH, Allershausen) Partikel unter

sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow (Herasafe[®], Fa. Heraeus) in 15-ml-Falcongefäße überführt. (ca. 15 bis 18 mg). Die genauen Mengen ergaben sich aus der Differenz des Bruttogewichts und des zuvor bestimmten Taragewichts des Gefäßes. Entsprechend der Nettomenge wurde das Gefäß mit PBS aufgefüllt, so dass sich eine Partikelkonzentration von 10 mg/ml ergab.

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationsstufen 1,0 g/l, 0,5 g/l, 0,1 g/l, 0,05 g/l, 0,01 g/l, 0,005 g/l und 0,001 g/l durch entsprechende Verdünnung mit DMEM hergestellt. Von diesen Lösungen wurden je 100 µl in jedes well pipettiert.

Nach 72 h Inkubation erfolgte die Durchführung des MTT-Tests (siehe 4.5.4.1). Pro Partikelart und Konzentrationsstufe erfolgte eine dreifache Messwertbestimmung. Als Kontrolle dienten Zellen, die unter sonst gleichen Bedingungen mit partikelfreiem Medium inkubiert wurden. Der Versuch wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als arithmetischer Mittelwert der Einzelmessungen aus zwei Versuchen mit 95%-Konfidenzintervall. Die Proliferationsrate ist als Verhältnis der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle in Prozent angegeben.

4.5.3.3 Einfluss von generierten Abriebpartikeln aus dem Prothesen-Zement-Interface sowie kommerziellen Referenzpartikeln auf das Proliferationsverhalten und die Apoptoserate von humanen Osteoblasten

Um ein möglichst realitätsnahes Zell-Modell der aseptischen Hüftendoprothesenlockerung zu schaffen, wurden primäre humane Knochenzellen (Osteoblasten) mit den im Partikelprüfstand generierten Abriebpartikeln inkubiert. Um außerdem den Einfluss des metallischen Anteils dieser Abriebpartikel auf den Knochenmetabolismus untersuchen zu können, wurden Osteoblasten mit isoliertem metallischem Abrieb inkubiert. Als Referenz dienten Osteoblasten, die mit kommerziell hergestellten Titanpartikeln kultiviert wurden.

4.5.3.3.1 Native generierte Abriebpartikel

Für diesen Versuch wurden die Osteoblasten mit einer Dichte von 3200 Zellen pro well in einer 96-well-Platte ausgesät (siehe 4.5.1). Das entspricht einer Zelldichte von 10.000 Zellen pro cm². Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium verworfen und durch das partikelhaltige Medium ersetzt.

Die wie unter 4.3 beschriebenen Partikelstammlösungen wurden im Verhältnis 1:10 mit DMEM verdünnt. Von diesen Partikellösungen wurden zu jedem well 200 µl pipettiert. Das entspricht einer Partikelkonzentration von 200 mg/l.

Nach 72 h Inkubation im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt in der Luft bei hoher Luftfeuchtigkeit erfolgte die Durchführung des Annexin-V-Assays (siehe 4.5.4.3). Nach einem Waschschrift mit TBS wurde die Messung der Nekroserate mit dem Sytox-Assay durchgeführt (siehe 4.5.4.4). Zuletzt wurde mit Hilfe des Hexosaminidase-Test (siehe 4.5.4.2) die Proliferationsrate der Zellen bestimmt.

Pro Partikelart und Versuch erfolgte eine dreifache Messwertbestimmung. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit partikelfreiem Medium kultiviert wurden. Die Messwerte sind dargestellt als arithmetischer Mittelwert der Einzelmesswerte aus drei Versuchen mit 95%-Konfidenzintervall. Die Proliferations-, Apoptose- sowie die Nekroserate sind als Prozentangabe im Verhältnis zur Proliferation bzw. Apoptose oder Nekrose der Kontrolle angegeben.

4.5.3.3.2 Isolierter Metallabrieb

Die hierbei verwendeten Osteoblasten wurden in einer Dichte von 3200 Zellen pro well in eine 96-well-Platte ausgesät (entsprechend einer Dichte von 10.000 Zellen pro cm²). Nach 24 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium verworfen und durch das partikelhaltige Medium ersetzt. Die Stammlösung (siehe 4.3) wurde so mit DMEM verdünnt, dass sich die Konzentrationsstufen 2,0 mg/l, 0,2 mg/l und 0,02 mg/l ergaben. Beim Abrieb des rauen Titanstiels gegen einen Palacos R[®] Knochenzement mit ZrO₂ war durch die höhere Menge an metallischem Abrieb auch die höchste Konzentrationsstufe von 20 mg/l möglich. Pro Konzentrationsstufe wurden in jedes well 200 µl der Lösung pipettiert.

Nach 72 h Inkubation im Brutschrank (37 °C und 5% CO₂-Gehalt in der Luft bei hoher Luftfeuchtigkeit) erfolgte die Durchführung des Annexin-V-Assays (siehe 4.5.4.3) sowie die Messung der Nekroserate mit dem Sytox-Assay (siehe 4.5.4.4). Zuletzt wurde mit Hilfe des Hexosaminidase-Test (siehe 4.5.4.2) die Proliferationsrate der Zellen bestimmt.

Pro Partikelart und Versuch erfolgte eine dreifache Messwertbestimmung. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit partikelfreiem Medium kultiviert wurden. Die Messwerte sind dargestellt als arithmetischer Mittelwert der Einzelmesswerte aus drei Versuchen mit 95%-Konfidenzintervall.

4.5.3.3 Kommerziell hergestellte Referenzpartikel

Als Vergleichsmessungen wurden humane primäre Knochenzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von kommerziell hergestellten Reintitan-Partikeln inkubiert. Unter den unter 4.5.3.2 genannten Bedingungen wurden in jedes well 200 µl der Partikellösung pipettiert. Von der Stammlösung (siehe 4.3) wurde mit DMEM eine Verdünnungsreihe hergestellt mit den Konzentrationen 1 g/l, 0,1 g/l sowie 0,01 g/l. Nach 72 h Inkubation erfolgte die Messung der Apoptose und Nekrose mittels Annexin-V Assay bzw. Sytox[®] Green-Färbung sowie die Messung der Proliferation mit dem Hexosaminidase-Test.

4.5.4 Proliferations- und Apoptose-Assays

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Partikelarten auf das Proliferationsverhalten sowie die Apoptoserate auf humane primäre Knochenzellen kamen unterschiedliche Assays zum Einsatz. Die metabolische Aktivität als Zeichen der Proliferation wurde mittels MTT-Test bzw. Hexosaminidase-Test untersucht. Zur Quantifizierung der Apoptoserate diente eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Annexin V. Die Nekroserate der Zellen wurde mittels Sytox-Assay detektiert.

4.5.4.1 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein nicht-radioaktiver Test zur Quantifizierung der Proliferationsaktivität von Zellen. Dem Test liegt die Spaltung des gelb erscheinenden Tetrazoliumsalses MTT (Markerreagenz) in rot erscheinende Formazankristalle durch metabolisch aktive Zellen zugrunde. Die wasserunlöslichen Formazankristalle werden durch Zugabe eines Lösungsreagenz in Lösung gebracht. Die Auswertung erfolgt anschließend photometrisch. Es kam ein gebrauchsfertiger Zellproliferations-Kit der Fa. Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) zur Anwendung.

Da sich bei vorschriftsmäßiger Anwendung des MTT-Tests bei hohen Partikelkonzentrationen (1,0 mg/ml und 0,5 mg/ml) falsch hohe Extinktionswerte durch Überlagerung von makroskopisch sichtbarem Partikelsediment ergaben, musste der Test modifiziert werden. Nach 72 h bzw. 96 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand (100 µl) in Eppendorfgefäße pipettiert, wobei durch mehrmaliges auf- und abpipettieren versucht wurde, möglichst den gesamten Partikelrückstand abzuziehen.

Anschließend wurde jedem well wieder je 100 µl frisches DMEM sowie 10 µl MTT-Markerreagenz zugesetzt. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurden jedem well 100 µl MTT-

Lösungsreagenz hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Die photometrische Auswertung erfolgte mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm.

4.5.4.2 Hexosaminidase-Test

Der Hexosaminidase-Test erlaubt die Messung der Proliferation einer Zellpopulation. Dem Test liegt die enzymatische Spaltung eines Test-Reagens durch das lysosomale Enzym Hexosaminidase zugrunde.

Zunächst wurden die wells einem Waschschrift mit PBS unterzogen und anschließend jedem well 100 µl Hexosaminidase-Reagenz hinzupipettiert. Nach einer Inkubation von 90 min. Dauer im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt in der Luft bei hoher Luftfeuchtigkeit wurden zu jedem Well 100 µl einer 0,2 M NaOH-Lösung mit 5 mM EDTA (= Stopplösung) pipettiert. Da sich bei hohen Partikelkonzentrationen falsch hohe Messwerte ergaben, wurden von jedem well 100 µl Überstand in eine neue 96-well-Platte überführt und gemessen. Die photometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm.

4.5.4.3 Annexin-V-Assay

Die Messung der Apoptoserate erfolgte mit Hilfe eines Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Fa. Roche, Mannheim). In der frühen Phase der Apoptose wird in der Zellmembran ein normalerweise nach innen gekehrter Phosphatidylserin-Rest nach außen gekehrt. Annexin V ist ein Protein, das in Anwesenheit von Ca²⁺ mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. Die Kopplung von Annexin V mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein erlaubt dann die fluoreszenzphotometrische Auswertung.

Die wells der Zellkulturplatten wurden zuerst drei Waschschriften mit TBS unterzogen und anschließend für 15 min. mit je 30 µl Annexin-V-Lösung, welche gemäß Herstellerangaben 1:50 in Inkubationspuffer verdünnt wurde, inkubiert. Durch erneutes dreimaliges Waschen der wells mit TBS wurde nicht gebundenes Annexin-V entfernt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenz-Photometer (Victor 3[®] 1420 Multilabel Counter) der Fa. Perkin Elmer bei einer Wellenlänge von 485 nm (Anregung) bzw. 535 nm (Emission).

4.5.4.4 Sytox-Assay

Zur Bestimmung der Nekroserate kam ein fluoreszenzphotometrischer Assay zur Anwendung. Die Färbung der Zellen erfolgte hierfür mit dem Farbstoff Sytox[®] Green (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Dieser Farbstoff färbt die DNA der Zellen an und eignet sich daher zur Quantifizierung nekrotischer Zellen. Bei nekrotischen Zellen ist im Gegensatz zu vitalen oder apoptotischen Zellen die Integrität der Zellmembran gestört und erlaubt so das Eindringen des Farbstoffs in das Zellinnere und somit die Anfärbung der DNA.

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenz-Photometer (Victor 3[®] 1420 Multilabel Counter) der Fa. Perkin Elmer bei einer Wellenlänge von 485 nm (Anregung) bzw. 535 nm (Emmission).

4.5.5 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Bilder wurden mit einem Lichtmikroskop der Fa. Zeiss (AxioVert 25) angefertigt, an das eine Kamera (AxioCam MRc, Fa. Zeiss) angeschlossen war. Die elektronische Bildverarbeitung und –speicherung erfolgte mit der Software AxioVision 3.1 (ebenfalls Fa. Zeiss)

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software SPSS 12.0 (Apache Software Foundation, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Messwerte sind jeweils als arithmetischer Mittelwert aus den Ergebnissen der Einzelmessungen mit dem 95%-Konfidenzintervall angegeben.

Tabelle 4: Perzentilen der Größenverteilung der kommerziell hergestellten Partikel. Angegeben sind jeweils die 50% und die 90% Perzentile.

| Partikelart | 50% Perzentile | 90% Perzentile |
|-------------------------|----------------|----------------|
| TiO ₂ 0,5 µm | 0,3546 µm | 0,5973 µm |
| TiO ₂ 1,8 µm | 0,3605 µm | 0,6849 µm |
| cp Ti | 0,0690 µm | 0,1042 µm |

5 Ergebnisse

5.1 Qualitative und Quantitative Analysen der Partikel und Abriebprodukte

5.1.1 Größenverteilung der kommerziellen Referenzpartikel

Die bei den Zellversuchen eingesetzten kommerziell hergestellten Partikel wurden mittels UPA hinsichtlich ihrer Größenverteilung charakterisiert (siehe Abbildung 3). Die Bezeichnung der

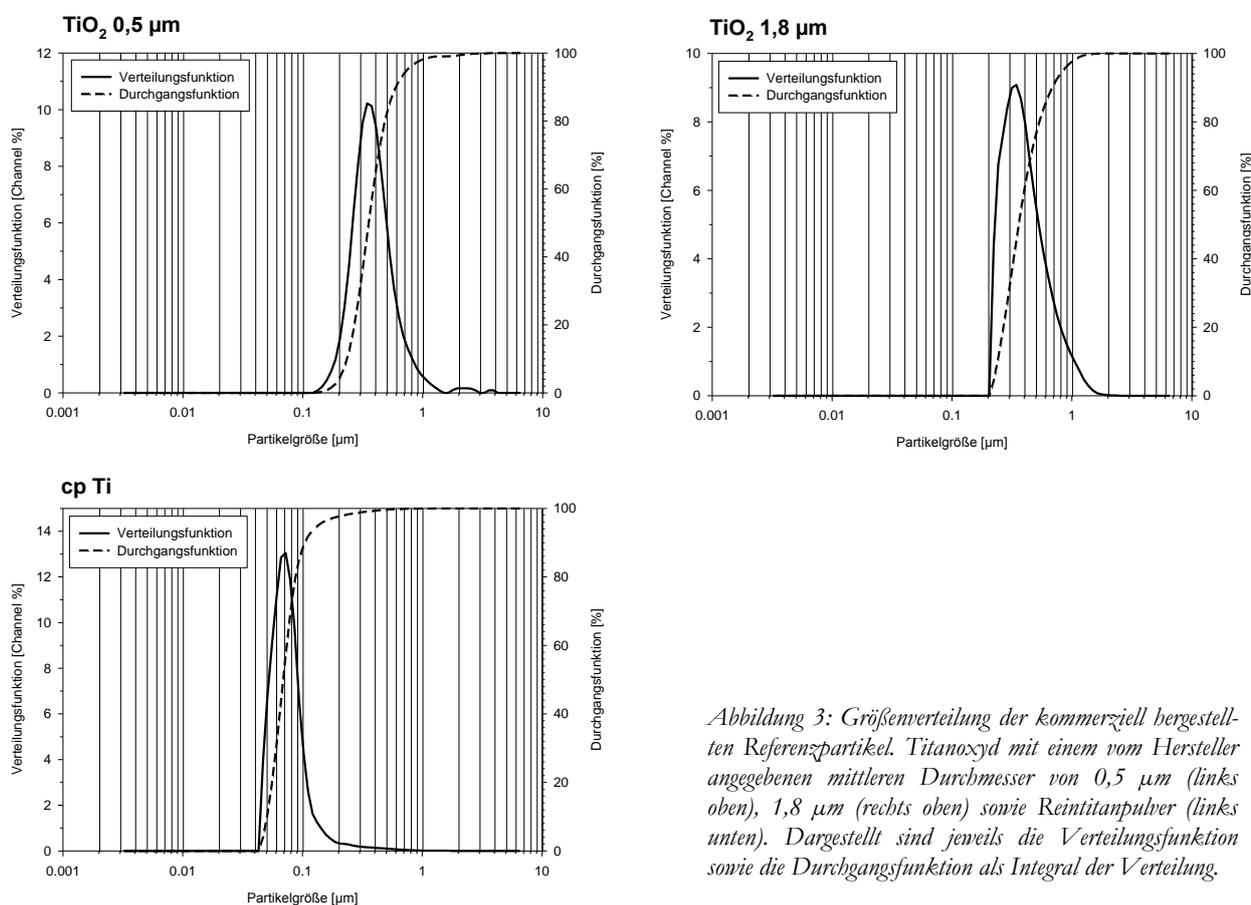


Abbildung 3: Größenverteilung der kommerziell hergestellten Referenzpartikel. Titanoxid mit einem vom Hersteller angegebenen mittleren Durchmesser von 0,5 µm (links oben), 1,8 µm (rechts oben) sowie Reintitanpulver (links unten). Dargestellt sind jeweils die Verteilungsfunktion sowie die Durchgangsfunktion als Integral der Verteilung.

beiden Titanoxydpulver (TiO_2 0,5 μm bzw. TiO_2 1,8 μm) bezieht sich auf den jeweils vom Hersteller angegebenen mittleren Durchmesser der Partikel. Bei unseren eigenen Messungen ergaben sich jedoch die aus Tabelle 4 ersichtlichen 50%- bzw. 90%-Perzentilen. Hierbei ist auffällig, dass die Größenverteilung der Partikel (siehe Abb. 3) im Vergleich zu den Herstellerangaben eine deutlich kleinere Partikelgröße zeigt. Vor allem beim Reintitanpulver bewegt sich die Größenverteilung durchaus im Nanopartikelbereich (Bereich $< 0,1 \mu\text{m}$).

5.1.2 Einfluss der Methoden zur Isolierung des Metallabriebs auf ausgewählte Größen der Partikelzusammensetzung

Um den Einfluss der Isolierung des metallischen Abriebs auf die Partikelzusammensetzung sowohl quantitativ als auch qualitativ zu untersuchen, wurden die beiden Methoden „Zentrifugation“ und „Filtration und Resuspension“ auf den dabei auftretenden Partikelverlust untersucht. Des Weiteren wurden die Ausgangslösung und die Lösung nach Filtration und Resuspension auf eine eventuelle Veränderung der Größenverteilung der Partikel untersucht.

5.1.2.1 Partikelverlust bei der Zentrifugation

Es wurden die Ausgangslösung vor der Zentrifugation, die jeweils abpipettierten Überstände sowie die Resuspensionslösung am Ende des Zentrifugationsverfahrens quantitativ auf ihren Titangehalt hin mittels AAS (4.4.1) überprüft. Die Ausbeute an Partikeln am Ende des Verfahrens ist als Quotient von Resuspensions- und Ausgangslösung in Prozent ausgedrückt (siehe

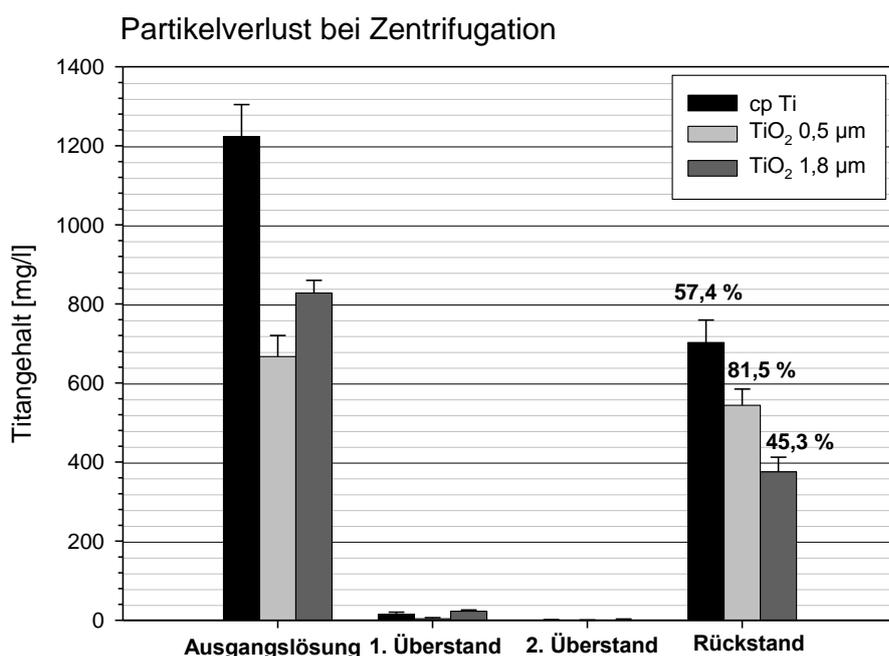


Abbildung 4: Partikelverlust bei Zentrifugation und Resuspension. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Partikelabschleibe der Endlösung im Vergleich zur Ausgangslösung

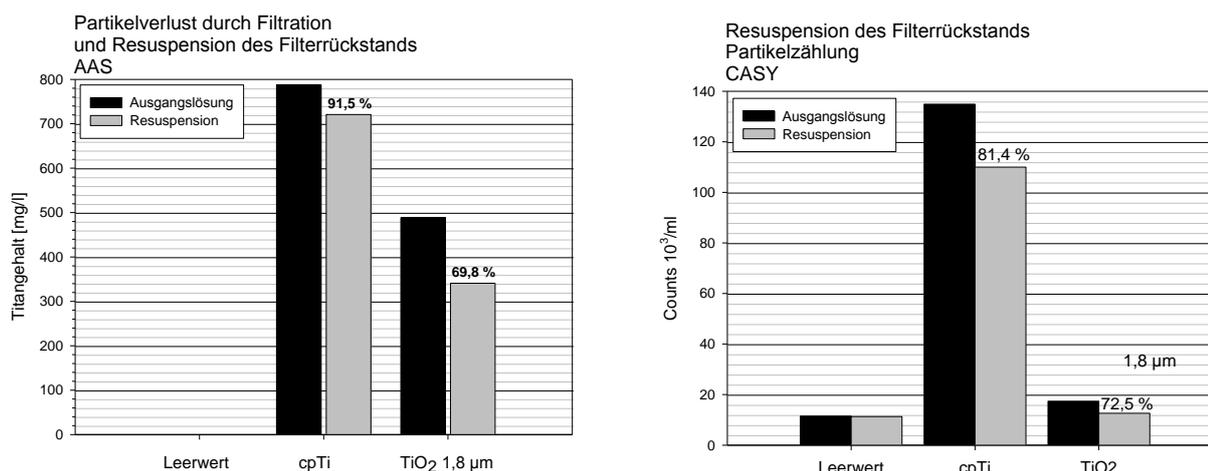


Abbildung 5: Partikelverlust durch Filtration und Resuspension. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Partikelausbeute der Endlösung im Vergleich zur Ausgangslösung.

Abbildung 4). Im Gegensatz zur Filtration können bei der Zentrifugation keine Glasgefäße eingesetzt werden. Die hohen Beschleunigungskräfte bei der Zentrifugation machen die Verwendung von speziellen Gefäßen (Eppendorf-Gefäße) aus Kunststoff notwendig, was jedoch für die Partikelanhaftung problematisch ist. So verbleibt am Ende der Zentrifugationsschritte ein Großteil der Partikel an der Gefäßwand haften und sorgt so für eine ungünstige Partikelausbeute, zudem kann es durch den selektiven Verlust von kleinen oder großen Partikeln zur Änderung der Größenverteilung kommen.

5.1.2.2 Partikelverlust bei der Filtration und Resuspension

Es wurden die Ausgangslösung vor der Filtration sowie die Resuspensionslösung am Ende des Verfahrens quantitativ auf ihren Titangehalt hin mittels AAS (4.4.1) überprüft (Abbildung 5 links). Außerdem erfolgte eine Partikelzählung der Lösungen mittels CASY® (Abbildung 5 rechts). Die Ausbeute an Partikeln am Ende des Verfahrens ist als Quotient der Titankonzentrationen bzw. der Partikelkonzentrationen von Resuspensions- und Ausgangslösung in Prozent ausgedrückt. Hierbei liegt der Titangehalt der Resuspensionslösung im Vergleich zur Ausgangslösung bei 91,5% für cpTi und bei 69,8 % für TiO₂. Ebenso beträgt die Partikelanzahl in der Resuspensionslösung im Vergleich zur Ausgangslösung 81,4% für cpTi und bei 72,5% für TiO₂. Der Partikelverlust bei diesem Verfahren muss durch eine nie ganz zu vermeidende Anhaftung der Partikel zum einen an den Gefäßwänden der verwendeten Glasgefäße und zum anderen am verwendeten Polycarbonatfilter vermutet werden.

Aufgrund der besseren Partikelausbeute sowie der einfachen Handhabung wurde im Folgenden zur Isolierung der metallischen Partikel dem Verfahren der Filtration und Resuspension der Vorzug gegeben.

5.1.2.3 Größenverteilung der Partikel nach Filtration und Resuspension

Um eine qualitative Veränderung der Partikelsuspensionen durch das Verfahren der Filtration und Resuspension weitgehend ausschließen zu können, wurde die Größenverteilung vor und nach der Filtration bzw. Resuspension bestimmt. Die Größenverteilung der Suspensionen sind Abbildung 6 zu entnehmen. Als „Ausgangslösung“ ist die eingesetzte Stammlösung vor dem Verfahren bezeichnet, jeweils darunter (Mitte) befindet sich das Verteilungsprofil der Partikel nach dem Verfahren. Ganz unten ist die Größenverteilung der Partikel aufgeführt, welche sich im Filtrat befanden.

Hierbei zeigt sich eine allenfalls unwesentliche Veränderung der Größenverteilung der jeweiligen Partikellösung vor und nach der Filtration und Resuspension. Die 50%-Perzentile für die „TiO₂-Partikel 0,5 µm“ liegt vor der Filtration und Resuspension bei 0,36 µm (90%-Perzentile 0,61 µm) und nach dem Verfahren bei 0,33 µm (90%-Perzentile 0,54 µm). Für die „TiO₂-Partikel 1,8 µm“ zeigte sich eine Größenverteilung mit einer 50%-Perzentile von 0,36 µm vor der Filtration und Resuspension (90%-Perzentile 0,68 µm) und einer 50%-Perzentile von 0,24 µm (90%-Perzentile 0,45 µm) nach dem Verfahren. Dem gegenüber findet sich im Filtrat erwartungsgemäß eine Größenverteilung der Partikel bei der Lösung „TiO₂ 0,5 µm“ mit einer 50%-Perzentile von 5,8 nm (90%-Perzentile 8,3 nm) und bei der Lösung „TiO₂ 1,8 µm“ mit einer 50%-Perzentile von 6,7 nm (90%-Perzentile 8,6 nm). Aufgrund des Verfahrens der Filtration und anschließenden Resuspension musste davon ausgegangen werden, dass bedingt durch die Filterporengröße von 0,1 µm sehr kleine Partikel mit dem Filtrat verworfen werden müssten. Jedoch zeigen die oben gezeigten Ergebnisse, dass sich im Filtrat im Wesentlichen nur Partikel mit einer Größe von kleiner als etwa 10 nm befinden. Somit stehen in der Resuspension für die anschließenden Zellversuche Partikel im zellbiologisch interessanten Größenbereich von 10 bis 100 nm in ausreichendem Anteilsverhältnis zur Verfügung. Trotz des zu erwartenden Verlusts sehr kleiner Partikel (< 10 nm) durch das Verfahren der Filtration und anschließenden Resuspension kommt es durch das Verfahren erstaunlicherweise eher zu einer geringen Verschiebung der Größenverteilung hin zu kleineren Partikeldurchmessern. Das bedeutet, dass der Partikelverlust durch die Filtration und Resuspension gleichermaßen im Bereich sehr kleiner Partikelgrößen wie auch größerer Partikel im „Randbereich“ der Größenverteilung auftritt, wodurch es zu keiner nennenswerten Veränderung der Größenverteilung der Partikellösung kommt.

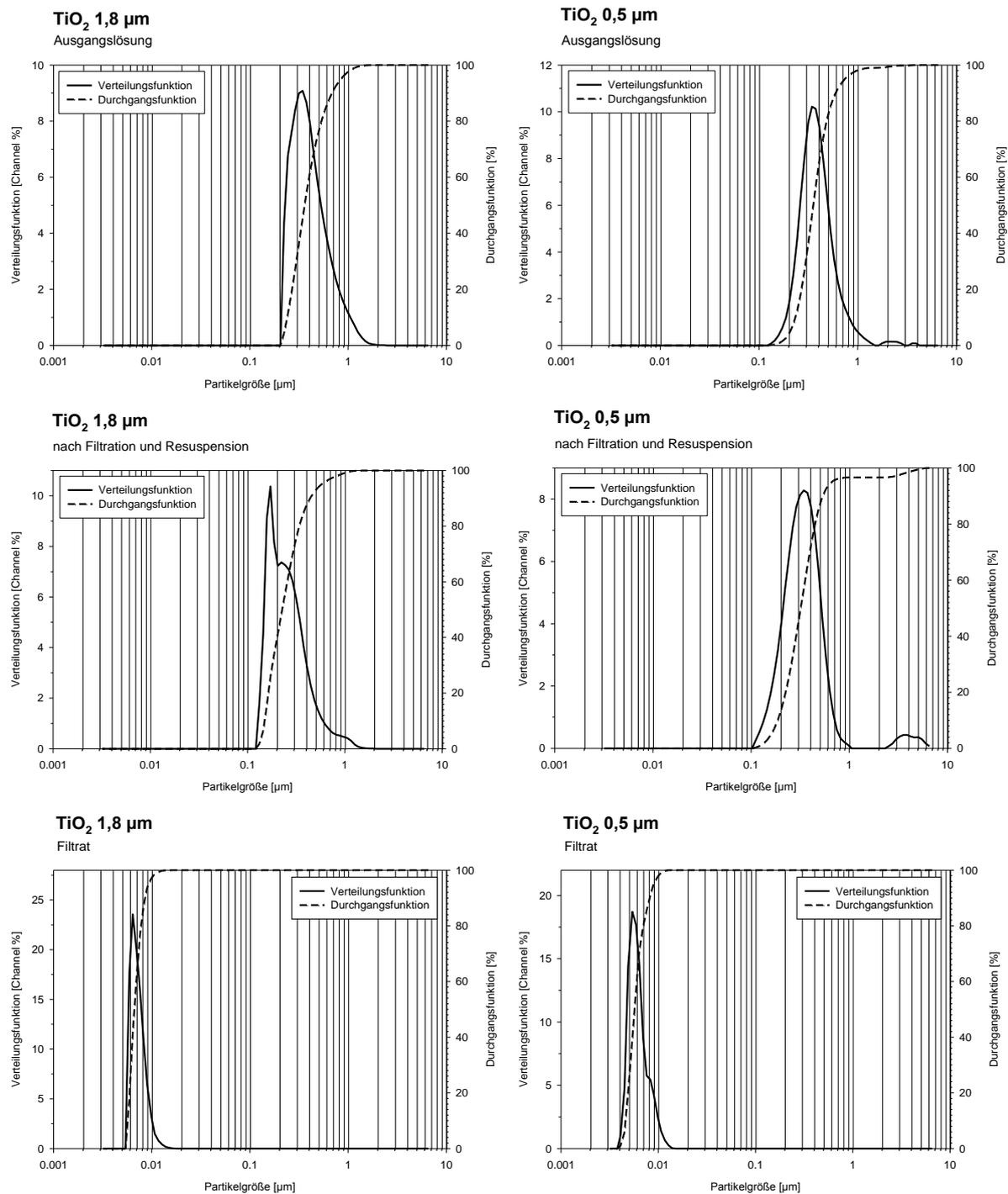


Abbildung 6: Größenverteilung der Partikellösungen vor und nach Filtration und Resuspension sowie die Größenverteilung der Partikel im Filtrat. Filtration mit einem Polycarbonat-Filter mit 0,1 µm Porengröße.

5.2 Zellbiologische Untersuchungen

5.2.1 Zellbiologische Untersuchungen mit Osteosarkomzellen (SAOS-2)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen an humanen Osteosarkomzellen (SAOS-2) dargestellt. Diese Versuche wurden allesamt als orientierende Vorversuche für spätere Versuche mit humanen Osteoblasten durchgeführt. Durch die kurze Verdopplungszeit eignen sich Osteosarkomzellen zur Anzucht großer Zellmengen und zur Durchführung von vielen Versuchsansätzen innerhalb kurzer Zeit. Dennoch besitzen sie eine große Ähnlichkeit zu Osteoblasten und eignen sich daher zur Betrachtung der Abläufe der am Knochenmetabolismus beteiligten Zellen.

Zunächst galt es in dieser Arbeit, die Auswirkungen des zur Auflösung des organischen Knochenzementanteils verwendeten Lösungsmittels DMSO auf SAOS-2-Zellen zu untersuchen. Des Weiteren wurde der Einfluss von kommerziellen Titan- sowie ZrO_2 -Partikeln auf SAOS-Zellen eruiert. Zirkonoxyd (ZrO_2) ist ein keramisches Pulver, welches dem Knochenzement als Röntgenkontrastmittel beigemischt ist, um postoperativ den Zementmantel radiologisch beurteilen zu können.

5.2.2 Auswirkungen des Lösungsmittels DMSO auf das Proliferationsverhalten von Osteosarkomzellen (SAOS-2)

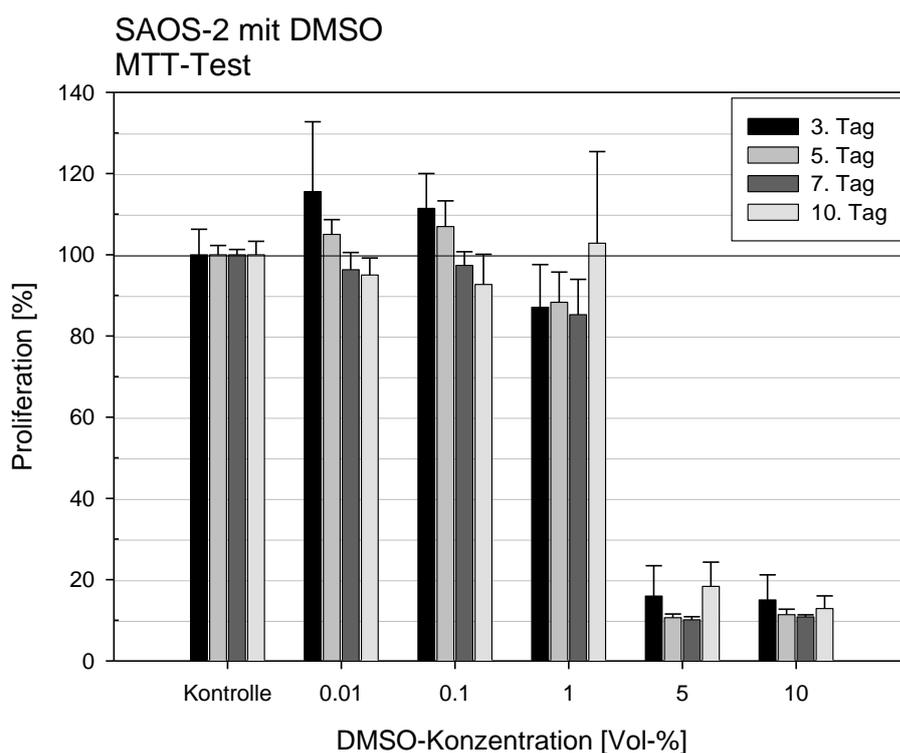


Abbildung 7: Abhängigkeit der Proliferationsrate humaner Osteosarkomzellen (SAOS-2) bei ansteigender DMSO-Konzentration nach 3, 5, 7 und 10 Tagen Inkubation.

In späteren Zellversuchen sollte auch der aus dem Gesamtabrieb isolierte metallische Anteil der Grenzflächendestruktionsprodukte zum Einsatz kommen. Zur Auflösung des Knochenzementanteils wurde ein organisches Lösungsmittel (DMSO) verwendet, welches sich in vorhergehenden Arbeiten als dafür geeignet erwiesen hatte [Wittmann 2006]. Zunächst musste von einer Zelltoxizität des Lösungsmittels ausgegangen werden. Als Teil dieser Arbeit wurde auch das Proliferationsverhalten von humanen Osteosarkomzellen bei unterschiedlichen Konzentrationen DMSO untersucht. Diese Ergebnisse sollten als Orientierung für die Entwicklung einer Methode zur Isolierung der metallischen Abriebprodukte dienen.

Untersucht wurde die Proliferationsrate von SAOS-Zellen mithilfe des MTT-Assays nach 3, 5, 7 und 10 Tagen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von DMSO (siehe Abbildung 7) Als Kontrolle dienten SAOS-Zellen, welche mit normalem Zellkulturmedium ohne Zugabe von DMSO kultiviert wurden.

Während das Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration unterhalb von 1 Vol.-% keine nennenswerten Auswirkungen auf die Proliferationsrate von SAOS-Zellen hat, so sinkt die Proliferationsrate bei DMSO-Konzentrationen von über 1 Vol.-% deutlich. Für Konzentrationen von über 5 Vol.-% DMSO sank die Proliferationsrate auf unter 20%, sodass bei dieser DMSO-Konzentration von einer deutlichen Zytotoxizität auszugehen ist. Bei sehr geringen DMSO-Konzentrationen von unter 0,1 Vol.-% zeigte sich sogar vor allem für die frühe Phase nach 3 und 5 Tagen eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zur Kontrollpopulation. Bei der Inkubation der Zellen über 10 Tage zeigt sich ein relativer Anstieg der Proliferation bei den DMSO-Konzentrationen von 1 Vol.-%, 5 Vol.-% und 10 Vol.-%. Dies ist durch eine ebenso relative Proliferationshemmung der Kontrollpopulation durch konfluentes Wachstum nach 10 Tagen zu erklären.

5.2.3 Auswirkungen der kommerziellen Partikel auf die Proliferation von Osteosarkomzellen (SAOS-2)

Es wurden zunächst die Auswirkungen der kommerziellen Referenzpartikel (Titan sowie ZrO_2) auf das Proliferationsverhalten von humanen Osteosarkomzellen untersucht. Die Ergebnisse sollten als Orientierung für spätere Zellversuche mit generierten Abriebpartikeln und humanen Osteoblasten dienen. Die Abhängigkeit der Proliferation von der Partikelkonzentration nach 72 h Inkubation ist in Abbildung 8 dargestellt.

Hierbei zeigt sich die Proliferation von SAOS2-Zellen bei Inkubation mit ZrO_2 -Partikeln bis zu Konzentrationen von 0,1 g/l im Vergleich zur Kontrollpopulation weitgehend unverändert. Erst

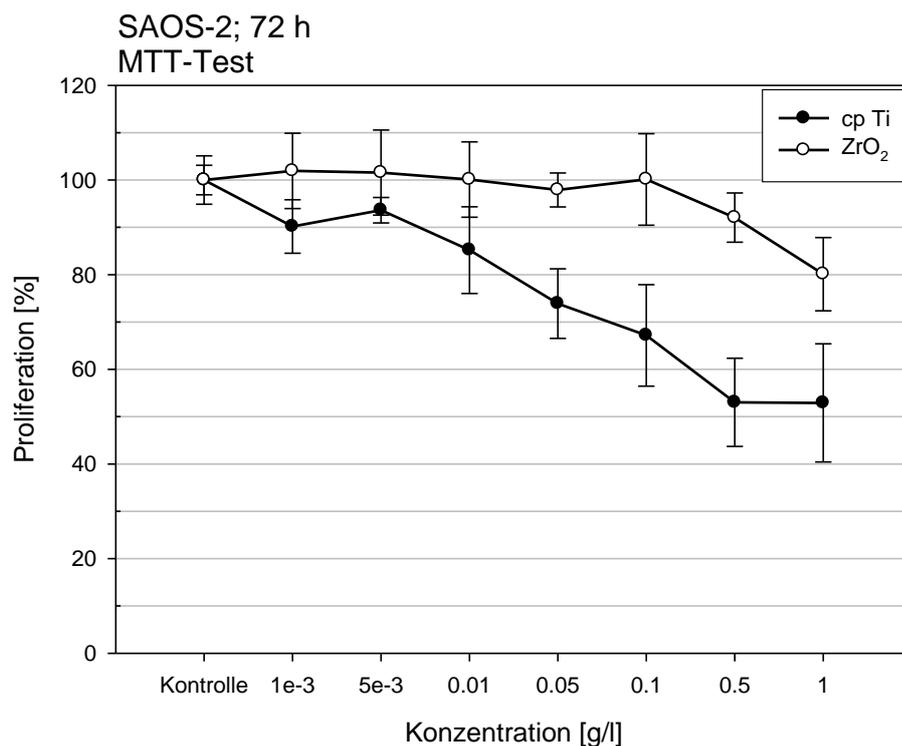


Abbildung 8:
Abhängigkeit der Proliferation von SAOS-2 Zellen bei ansteigender Partikelkonzentration nach 72 h Inkubation. Als Partikel dienten kommerziell hergestellte Titanpartikel (cp Ti) sowie ZrO₂-Partikel, welche dem Knochenzement als Röntgenkontrastmittel zugesetzt sind.

bei ZrO₂-Konzentrationen von über 0,5 g/l kommt es zu einer verminderten Proliferation von ca. 80% gegenüber der Kontrollpopulation.

Demgegenüber lässt sich bei Inkubation von SAOS2-Zellen mit kommerziell hergestelltem Reintitanpulver (cpTi) bereits bei wesentlich geringeren Partikelkonzentrationen eine deutlich verminderte Proliferationsrate gegenüber der Kontrollpopulation erkennen. Bereits bei der geringsten Konzentration ab 0,001 g/l nimmt die Proliferation mit steigender Partikelkonzentration kontinuierlich ab. Bei einer Konzentration von 0,05 g/l sinkt die Proliferationsrate auf 74% und bei einer Konzentration von 0,5 g/l auf 53% der Proliferationsrate der Kontrollpopulation.

5.2.4 Auswirkungen der Abriebprodukte auf humane Knochenzellen

Im Folgenden sollten die Auswirkungen von generierten Partikeln aus dem Interface zwischen Hüftendoprothesenstiel und Knochenzementmantel auf humane Knochenzellen untersucht werden.

Zunächst mussten die speziell für diesen Zweck angezüchteten primären humanen Knochenzellen mit immunhistochemischen Methoden ausreichend charakterisiert werden. In den anschließenden Zellversuchen sollten die Apoptose- und Nekroserate sowie das Proliferationsverhalten der Knochenzellen in Abhängigkeit von Partikeln aus dem Prothesenprüfstand untersucht werden. Zum einen kam bei den Zellversuchen der Gesamtabrieb zum Einsatz. Der Gesamtabrieb

enthält neben Destruktionsprodukten von der Werkstoffoberfläche des Hüftendoprothesenstiels zum erheblichen Teil auch Partikel, die vom Knochenzement und dessen Zusatzstoffen wie z.B. Röntgenkontrastmittel (ZrO_2 oder $BaSO_4$) stammen. Zum anderen sollte außerdem nur der extrahierte metallische Partikelanteil in den Zellversuchen verwendet werden.

Die intrazelluläre Aufnahme der eingesetzten Abriebpartikel durch die Zellen wurde zudem lichtmikroskopisch dokumentiert.

5.2.4.1 Immunhistochemische Charakterisierung der humanen Knochenzellen

Die immunhistochemische Charakterisierung der aus der Knochenpongiosa aus dem Oberschenkelhals von Patienten angezüchteten primären Knochenzellen erfolgte mithilfe der Merkmale alkalische Phosphatase sowie Kollagen I. Durch diese beiden zellbiologischen Marker lassen sich die Zellen hinreichend als primäre Knochenzellen charakterisieren [Rodan et al. 1989; Rodan et al. 1987; Zreiqat et al. 1996]. Die Vorgehensweise der Färbung ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Abbildung 9 zeigt die humanen Osteoblasten (HOB) nach immunhistochemischer Darstellung von alkalischer Phosphatase (blau) und Kollagen I (rot) bei unterschiedlichen Vergrößerungen. Hierbei zeigt sich eine deutliche Anfärbung der jeweils aus der Knochenpongiosa von 3 Patienten angezüchteten Zellen für die für primäre Knochenzellen typischen Zellmarker alkalische Phosphatase und Kollagen Typ 1.

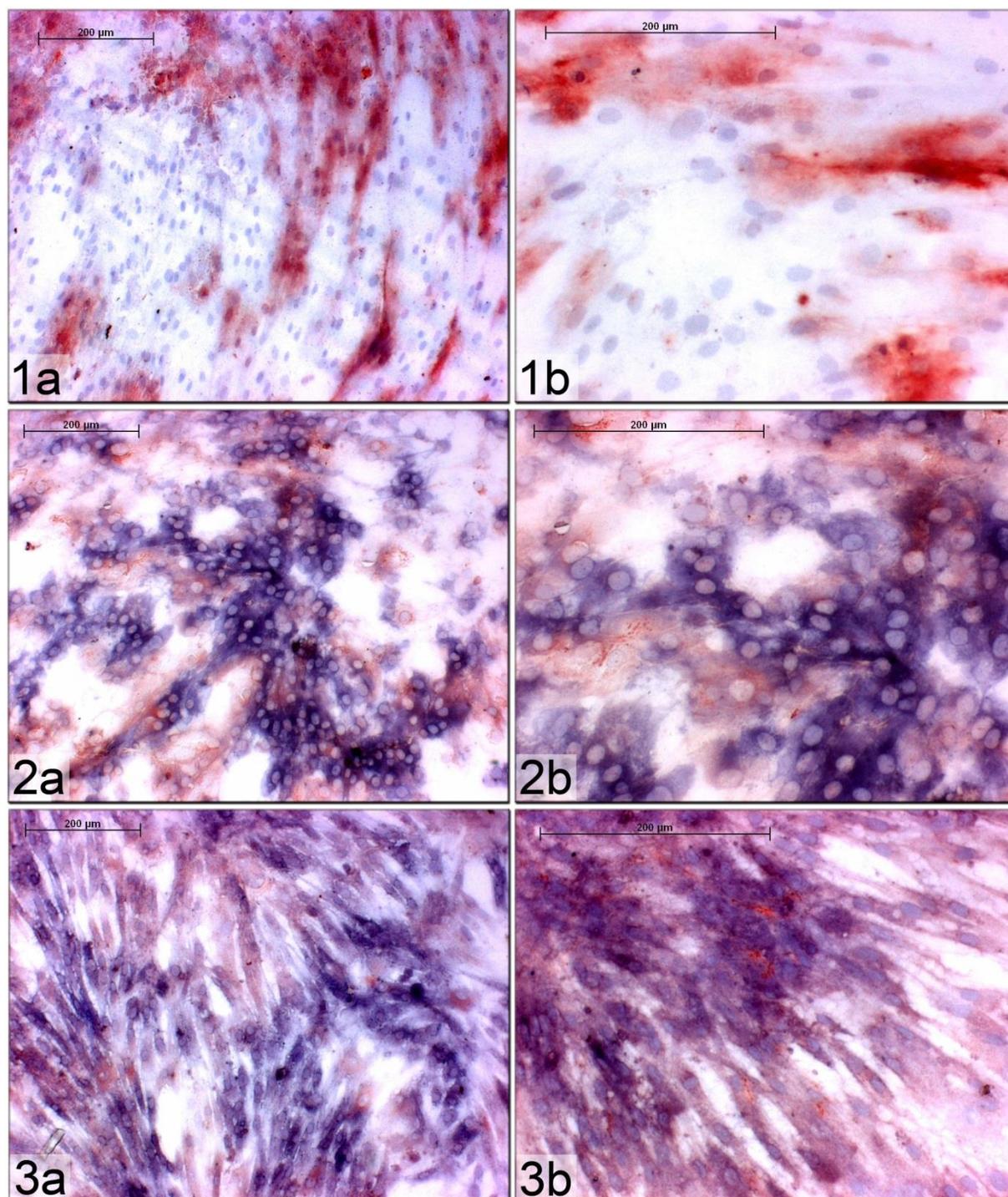


Abbildung 9: Darstellung der primären humanen Knochenzellen nach immunhistochemischer Darstellung von Kollagen I (rot) und Alkalischer Phosphatase (blau) gemäß Tabelle 3. Die Nummern 1-3 beziehen sich auf die Nummern der Patienten aus Tabelle 2. Rechte Abbildung jeweils bei doppelter Vergrößerung.

5.2.4.2 Phagozytose der Abriebprodukte

Die Aufnahme der Partikel in die Zellen wurde nach 72 h Inkubation lichtmikroskopisch dokumentiert. Exemplarisch sind Osteoblasten gezeigt, die mit dem nativen Abrieb eines rauen CoCr-

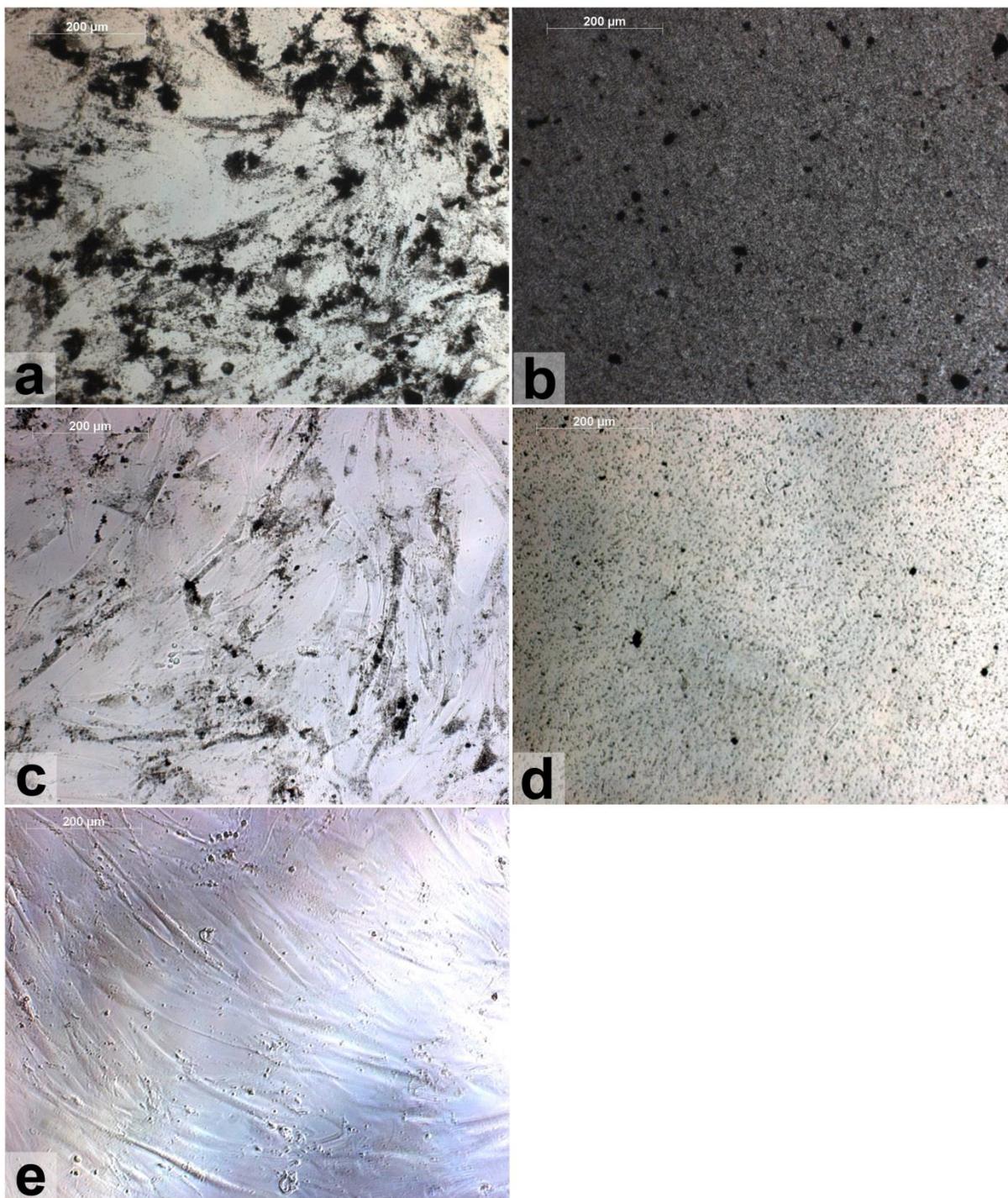


Abbildung 10: Phagozytose der Partikel nach 72h Inkubation mit humanen Osteoblasten. 200 µl natives Pulver CoCr (rau) mit ZrO_2 mit einer Co-Konzentration von (a) 2 mg/l; (b) 2 mg/l ohne Zellen; (c) 0,2 mg/l; (d) 0,2 mg/l ohne Zellen; (e) Zellen ohne Partikel

Hüftstiels, der gegen einen Zementköcher aus Palacos[®] R mit ZrO_2 gelaufen war, inkubiert wurden. Abbildung 10 zeigt den Abrieb mit einer CoCr-Konzentration von 2 mg/l jeweils mit (a) und ohne Zellen (b). Darunter ist der Abrieb mit 0,2 mg/l jeweils mit (c) und ohne Zellen (d) dargestellt. Zum Vergleich sind in Teilabbildung (e) humane Osteoblasten ohne Partikel gezeigt.

Hierbei zeigen sich die Partikel im gesamten Intrazellulärraum mit Häufung im zentralen Bereich um den Zellkern. Zudem zeigen sich im Vergleich mit den Zellen ohne Partikel die Zellen nach Phagozytose mit kürzeren Zellausläufern.

5.2.4.3 Auswirkungen der nativen Abriebprodukte auf humane Osteoblasten

Zunächst wurden die Auswirkungen des im Partikelprüfstand generierten nativen Prothesenabriebs auf humane Osteoblasten (HOB) untersucht. Ziel war lediglich ein Vergleich der zellbiologischen Auswirkungen von Abriebpartikeln innerhalb unterschiedlicher Prothesenwerkstoffe sowie Oberflächenverarbeitungen bzw. innerhalb der unterschiedlichen Knochenzementarten als Friktionspartner. Aus diesem Grunde wurde jeweils nur eine Konzentrationsstufe (0,2 g/l) des gammasterilisierten Abriebs eingesetzt.

Der Einfluss der Abriebprodukte unterschiedlicher Hüftendoprothesenstiele bzw. Knochenzementarten ist in Abb. 11 bis 13 dargestellt.

Apoptose-Assay (Annexin-V)

Die Auswirkungen der nativen (d.h. Gesamt-)Abriebprodukte von unterschiedlichen getesteten Hüftendoprothesestielen gegen Knochenzementköcher unterschiedlicher Zusammensetzung auf die Apoptoserate von primären humanen Knochenzellen sind in Abb. 11 dargestellt. Verglichen mit der Kontrollpopulation kommt es durch die Abriebprodukte sämtlicher Prothesenwerkstoffe und Oberflächenbeschaffenheiten (rau oder glatt) mit unterschiedlichen Knochenzementarten als Friktionspartner zu einer Erhöhung der Apoptoserate. Am deutlichsten ist die Erhöhung durch den Abrieb des Kohlenstoffbeschichteten CoCr-Stiels auf 168%, durch Abrieb von Ti (rau) bzw. Ti (glatt) gegen Palacos-Zement mit ZrO_2 kommt es zu einer Erhöhung auf 148% bzw. 149%. Der Abrieb der übrigen getesteten Hüftendoprothesenstiele bzw. Knochenzementarten bewirkt eine nur geringe Steigerung der Apoptoserate zwischen 110% (CoCr glatt/Palacos ohne ZrO_2) und 125% (CoCr glatt/Palacos mit ZrO_2).

Proliferations-Assay (Hexosaminidase)

Die Auswirkungen der nativen Abriebprodukte von unterschiedlichen getesteten Hüftendoprothesestielen gegen Knochenzementköcher unterschiedlicher Zusammensetzung auf die Proliferationsrate von primären humanen Knochenzellen sind in Abb. 12 dargestellt. Bei sämtlichen

getesteten Abriebprodukten konnte keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate der primären humanen Knochenzellen im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet werden.

Nekrose-Assay (Sytox)

Die Auswirkungen der nativen Abriebprodukte auf die Nekroserate von primären humanen Knochenzellen sind in Abb. 13 dargestellt. Durch den Abrieb sämtlicher Prothesenstiell/Zementpaarungen kommt es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der Sytoxbindung als Ausdruck einer erhöhten Nekroserate. Hierbei sind die stärksten Effekte durch den Abrieb des Kohlenstoffbeschichteten CoCr-Stiels mit einer Nekroserate von 179% im Vergleich mit der Kontrollpopulation zu beobachten, während durch den Abrieb des Kohlenstoffbeschichteten Titanschafts mit einer Nekroserate von 124% bzw. durch den Abrieb des glatten CoCr-Stiels gegen Palacos-Zement ohne ZrO_2 mit einer Nekroserate von 123% die geringsten Effekte zu beobachten waren. Durch den Abrieb der übrigen Prothesenstiell/Zementpaarungen kam es zu einer unterschiedlich ausgeprägten Erhöhung der Nekroserate, jedoch waren hier die Unterschiede zwischen dem Prothesenmaterial (Ti oder CoCr) und der Oberflächenbeschaffenheit (glatt oder rau) nicht signifikant.

5.2.4.4 Auswirkungen der isolierten metallischen Abriebprodukte auf humane Osteoblasten

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkungen des aus dem generierten Gesamtabrieb isolierten metallischen Anteils auf humane Osteoblasten (HOB) zu untersuchen. Die Eliminierung des organischen PMMA-Anteils im Knochenzement erlaubt somit eine gesonderte Betrachtung der Einflüsse des Prothesenwerkstoffs bzw. des im Knochenzement enthaltenen Röntgenkontrastmittels auf den Knochenmetabolismus. Die Auswirkungen der isolierten metallischen Abriebprodukte auf primäre humane Knochenzellen sind in den Abb. 14-16 dargestellt. Der geringe Anteil des metallischen Anteils im generierten Gesamtabrieb erlaubte für die Zellversuche als höchste Partikelkonzentration 2,0 mg/l, lediglich vom isolierten Abrieb des rauen Titanschafts gegen den Palacos-Zement mit ZrO_2 konnte als höchste Konzentration auch 20 mg/l eingesetzt werden.

Apoptose-Assay (Annexin-V)

Die Auswirkungen des isolierten metallischen Abriebs auf die Apoptoserate von primären humanen Knochenzellen sind in Abb. 14 dargestellt. Hierbei lassen sich bei den Abriebprodukten sämtlicher Prothesenwerkstoffe und Knochenzementarten in den niedrigsten Partikelkonzentrationen von 0,02 mg/l sowie 0,2 mg/l keine signifikanten Unterschiede der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachten. Lediglich in der höchsten eingesetzten Konzentration von 2,0 mg/l zeigt sich eine Steigerung der Apoptoserate auf 139% durch den metallischen Abrieb des rauhen CoCr-Stiels mit CMW-Zementköcher. Dem gegenüber fallen die Effekte durch den Abrieb der übrigen Prothesenstiel/Zementköcher-Paarungen weitaus geringer aus (Ti glatt/CMW 116%, Ti rau/Palacos mit ZrO₂ 118%, CoCr glatt/Palacos mit ZrO₂ 119% bzw. CoCr rau/Palacos mit ZrO₂ 125%). Die Menge des isolierten Abriebs des rauhen Ti-Stiels gegen den Palacos-Zement mit ZrO₂ erlaubte als einzige auch den Einsatz der Konzentration von 20 mg/l; hier zeigte sich eine Steigerung der Apoptoserate auf 142% (Daten nicht gezeigt). Für das eingesetzte kommerziell hergestellte Reintitanpulver (cpTi) zeigte sich auch bei höheren Konzentrationen (10, 100 und 1000 mg/l) keine signifikante Änderung der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollpopulation (Daten nicht gezeigt).

Proliferations-Assay (Hexosaminidase)

Die Auswirkungen des isolierten metallischen Abriebs auf die Proliferationsrate von primären humanen Knochenzellen sind in Abb. 15 dargestellt. Hierbei zeigt sich durch den isolierten metallischen Abrieb des glatten CoCr-Stiels mit Palacos-Zementköcher mit ZrO₂ bereits bei der geringsten Konzentration von 0,02 mg/l eine Steigerung der Proliferationsrate auf 149% und bei 0,2 mg/l bzw. 2,0 mg/l eine weitere Steigerung auf 169% bzw. 181 %. Durch den isolierten Metallabrieb des glatten Ti-Schaft mit CMW-Zementköcher kam es zu einer Steigerung der Proliferationsrate von 126% bei einer Konzentration von 0,02 mg/l bzw. von 128% bei 0,2 mg/l und 153% bei 2,0 mg/l. Weitaus weniger Effekt ließ sich durch den isolierten metallischen Abrieb des rauhen CoCr-Stiels gegen den Palacos-Zement mit ZrO₂ (110% bei 0,2 mg/l bzw. 122% bei 2,0 mg/l) bzw. mit CMW-Zement (126% bei 0,2 mg/l bzw. 144% bei 2,0 mg/l) beobachten, die geringsten Effekte verursachte der metallische Abrieb des rauhen Ti-Stiels gegen den Palacos-Zement mit ZrO₂. Hier kam es bei der Konzentration von 0,2 mg/l zu einer geringen Hemmung der Proliferationsrate (90%) und bei 2,0 mg/l zu einer geringen Erhöhung der Proliferationsrate (125%). Durch die auch in höheren Konzentrationen (10, 100 und 1000 mg/l) eingesetzten kommerziell hergestellten Reintitanpartikel (cpTi) wurde bei 100 mg/l eine Erhöhung der

Proliferationsrate von 119% erzielt mit etwa gleich bleibendem Effekt bei 1000 mg/l (Daten nicht gezeigt).

Nekrose-Assay (Sytox)

Die Auswirkungen des isolierten metallischen Abriebs auf die Nekroserate von primären humanen Knochenzellen sind in Abb. 16 dargestellt. Hierbei lassen sich bei den Abriebprodukten sämtlicher Prothesenwerkstoffe und Knochenzementarten in der niedrigsten Partikelkonzentration von 0,02 mg/l keine signifikanten Unterschiede der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachten. Durch den metallischen Abrieb des rauhen CoCr-Stiels mit CMW-Zement kommt es zu einer Steigerung der Nekroserate von 121% bei 0,2 mg/l und 190% bei 2,0 mg/l, ähnlich wie durch den Abrieb des rauhen Ti-Stiels mit Palacos-Zement mit ZrO₂ (133% bei 0,2 mg/l bzw. 153% bei 2,0 mg/l). Die bei dieser letztgenannten Paarung eingesetzte höchste Konzentration von 20 mg/l führte zu einer Steigerung der Nekroserate von über 240% (Daten nicht gezeigt). Weitaus weniger Effekte lassen sich durch den isolierten metallischen Abrieb des glatten CoCr-Stiels mit Palacos-Zement mit ZrO₂ (109% bei 0,2 mg/l und 136% bei 2,0 mg/l) bzw. durch den isolierten metallischen Abrieb des glatten Ti-Stiels mit CMW-Zement (112% bei 0,2 mg/l und 157% bei 2,0 mg/l) beobachten. Die geringsten Auswirkungen hatte der metallische Abrieb des rauhen CoCr-Stiels mit Palacos-Zement mit ZrO₂ (108% bei 0,2 mg/l und 130% bei 2,0 mg/l). Das auch in höheren Konzentrationen (10, 100 und 1000 mg/l) vergleichsweise eingesetzte kommerziell hergestellte Reintitanpulver (cpTi) führte nur zu einer geringen gleich bleibenden Erhöhung der Nekroserate von maximal 120% (Daten nicht gezeigt).

Nativer Abrieb auf HOB
72 h
Annexin-V

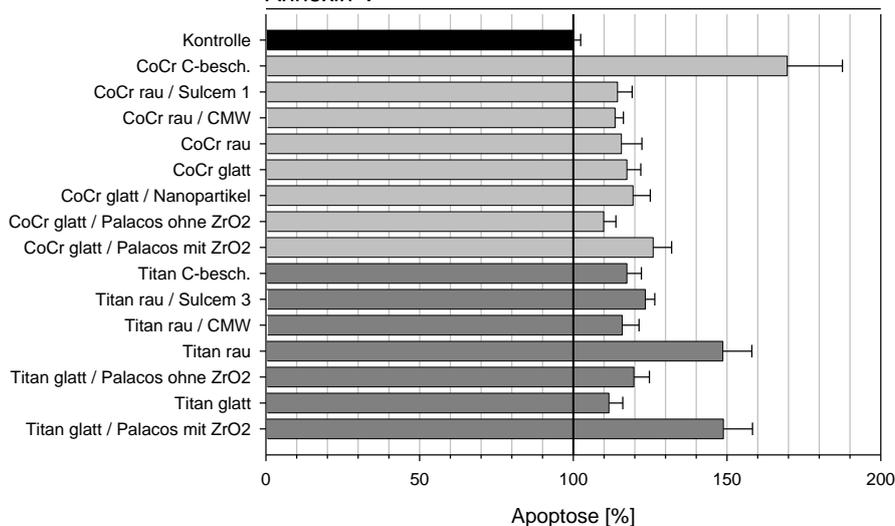


Abbildung 11: Abhängigkeit der Apoptoserate von humanen Osteoblasten (HOB) in Gegenwart von Abriebpunkten verschiedener Paarungen Hüftendoprothesenstiel / Knochenzement

Nativer Abrieb auf HOB
72 h
Hexosaminidase-Test

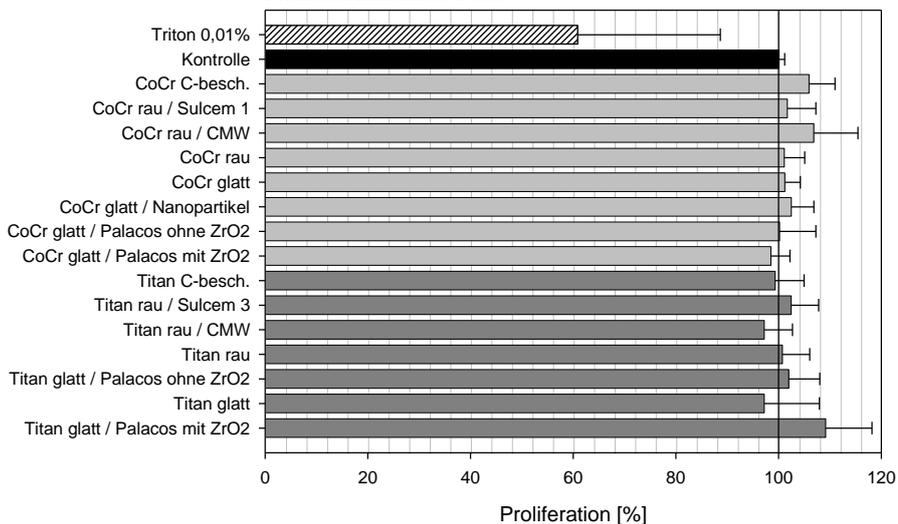


Abbildung 12: Abhängigkeit der Proliferationsrate von humanen Osteoblasten (HOB) in Gegenwart von Abriebpunkten verschiedener Paarungen Hüftendoprothesenstiel / Knochenzement

Nativer Abrieb auf HOB
72 h
Sytox

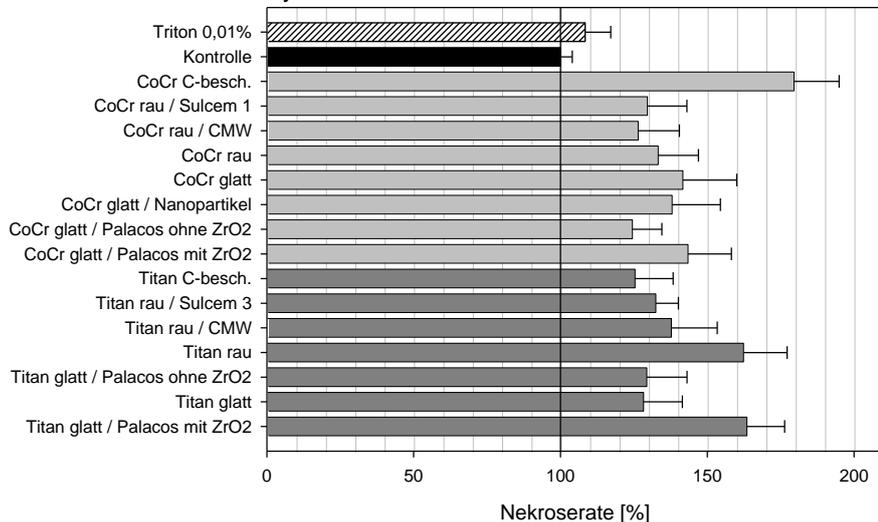


Abbildung 13: Abhängigkeit der Nekrose rate von humanen Osteoblasten (HOB) in Gegenwart von Abriebpunkten verschiedener Paarungen Hüftendoprothesenstiel / Knochenzement

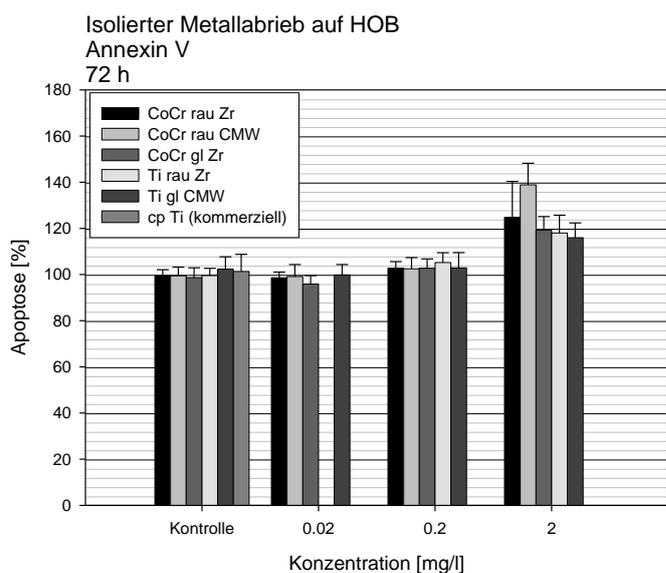


Abbildung 14: Apoptoserate von humanen Osteoblasten nach 72 h Inkubation mit dem isolierten metallischen Anteil des generierten Abriebs verschiedener Hüftstiel/Knochenzementpaarungen.

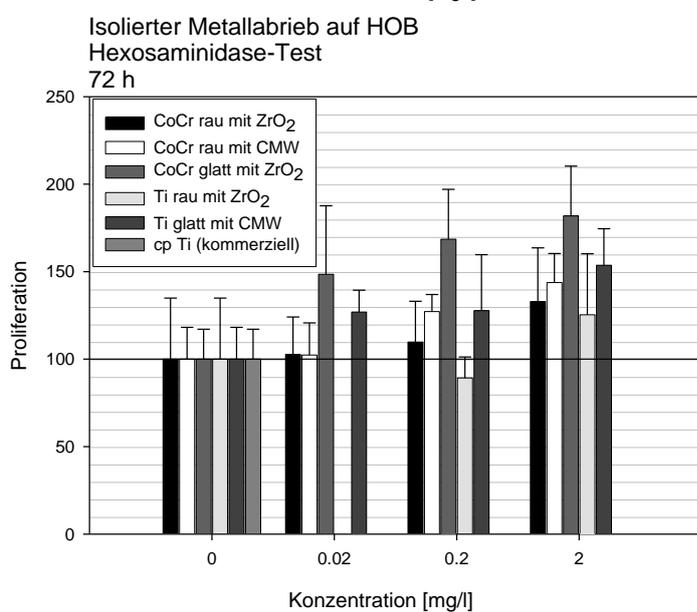


Abbildung 15: Proliferationsrate von humanen Osteoblasten nach 72 h Inkubation mit dem isolierten metallischen Anteil des generierten Abriebs verschiedener Hüftstiel/Knochenzementpaarungen.

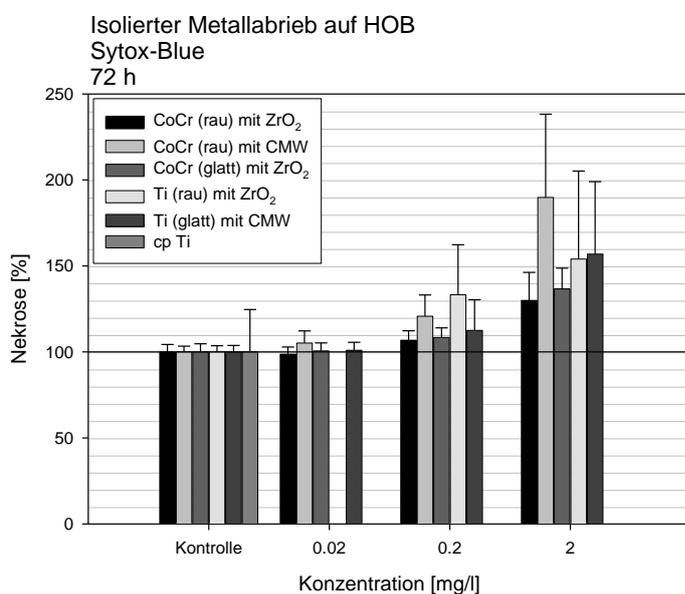


Abbildung 16: Nekroserate von humanen Osteoblasten nach 72 h Inkubation mit dem isolierten metallischen Anteil des generierten Abriebs verschiedener Hüftstiel/Knochenzementpaarungen.

6 Diskussion

Die aseptische Endoprothesenlockerung ist trotz der guten Erfolge der Hüftendoprothetik nach wie vor eine der Hauptversagensgründe.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellulären Auswirkungen von Abriebprodukten, welche in einem Prothesenprüfstand durch Reibung von Hüftendoprothesenstielen gegen einen Zementköcher erzeugt wurden, untersucht. Um des Weiteren die zellulären Auswirkungen des metallischen Anteils des Gesamtabriebs getrennt untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine Methode zur Extraktion und Aufbereitung des metallischen Abriebs in für Zellversuche kompatibler Weise etabliert.

6.1 Qualitative und quantitative Analysen der Partikel und Abriebprodukte

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Zellversuche mit primären humanen Knochenzellen in einem Prothesenprüfstand generierte Abriebprodukte verwendet, zudem wurden als Referenzpartikel kommerziell hergestellte Titanpartikel verwendet.

6.1.1 Größenverteilung der kommerziellen Referenzpartikel

Bei der Analyse der kommerziellen Titanpartikel war auffällig, dass sich bei der von uns bestimmten Größenverteilung durchwegs kleinere Durchmesser zeigten als die vom Hersteller angegebene mittlere Größe. Zudem waren die Unterschiede in der Größenverteilung der beiden TiO₂-Pulver, deren mittlere Größe vom Hersteller mit 0,5 μm und 1,8 μm angegeben wurde, nur diskret; bei beiden Pulvern waren 90% der Partikel kleiner als 0,6 μm bzw. 0,7 μm . Besonders auffällig war der Unterschied der vom Hersteller angegebenen und von uns bestimmten Größenverteilung beim Reintitanpulver (mittlere Größe laut Hersteller 3 μm). Hier waren 90% der Partikel kleiner als 0,1 μm und somit bereits im zellbiologisch interessanten Nanopartikelbereich.

6.1.2 Einfluss der Methoden zur Isolierung des Metallabriebs auf ausgewählte Größen der Partikelzusammensetzung

6.1.2.1 Partikelverlust bei der Zentrifugation

Um den metallischen Anteil der im Prothesenprüfstand erzeugten Abriebprodukte zu isolieren, musste zunächst der PMMA-Anteil eliminiert werden. Hierzu hatte sich in Vorarbeiten DMSO

als potentes Lösungsmittel erwiesen [Wittmann 2006]. DMSO wiederum wirkt in Konzentrationen ab etwa 1 Vol.-% zelltoxisch (siehe 5.2.1.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Isolierung des metallischen Anteils der Abriebprodukte in für spätere Zellversuche kompatibler Weise etabliert.

Bei der Etablierung einer Methodik zur Extraktion des metallischen Abriebs aus dem Gesamtabrieb erwies sich die reine Zentrifugation als ungeeignet. Da bedingt durch die hohen Beschleunigungskräfte für die Zentrifugation nur Kunststoffgefäße eingesetzt werden können, ist der Großteil des hierbei auftretenden Partikelverlusts durch Adhäsion der Partikel am Zentrifugengefäß zu verzeichnen, wie bereits in Vorarbeiten gezeigt werden konnte [Wittmann 2006]. Durch den hierdurch bedingten Verlust von 30-60% der eingesetzten Partikelmenge eignet sich das Verfahren nicht zur späteren Verwendung der Partikel für Zellversuche.

6.1.2.2 Partikelverlust bei der Filtration und Resuspension

Gegenüber der Extraktion der Partikel durch Zentrifugation erwies sich die Methode der Filtration mit einem Polycarbonatfilter und der anschließenden Resuspension der Partikel, welche als Rückstand auf dem Filter verblieben, mit Hilfe eines Ultraschallbads als praktikabel. Es konnte gezeigt werden, dass das Verfahren eine hohe Partikelausbeute von ca. 70-90% im Vergleich zur Partikelanzahl bzw. des Titangehalts der Ausgangslösung erlaubt. Da sich Glasoberflächen als relativ unproblematisch im Bezug auf die Anhaftung (Adhäsion) von Partikeln und auf den systemisch bedingten Partikelverlust erwiesen [Wittmann 2006], lässt sich die Filtration zur Extraktion der metallischen Partikel als geeignetes Verfahren einsetzen, da hier - bis auf den Polycarbonat-Filter selbst – sämtliche Teile des Filterhalter-Systems aus Glas gefertigt sind. Der bei der Filtration und Resuspension des Filterrückstands in PBS-Lösung dennoch auftretende Partikelverlust von ca. 10-30% muss überwiegend durch Anhaftung von Partikeln am Polycarbonatfilter vermutet werden, sodass im Ultraschallbad-Verfahren nicht alle Partikel in die Lösung übergehen. Dennoch ist die Menge des Partikelverlusts vertretbar, sodass ausreichend Partikel für weitere Zellversuche zur Verfügung stehen.

6.1.2.3 Größenverteilung der Partikel nach Filtration und Resuspension

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch diese Methode die Größenverteilung der Partikellösung nicht nennenswert verändert wird. Somit tritt der methodisch nie ganz zu vermeidende Verlust von Partikeln über den gesamten Größenbereich gleichermaßen verteilt und ohne Bevorzugung oder Benachteiligung von kleinen oder großen Partikeln auf. Interessant hierbei ist,

dass sich in der Resuspensionslösung auch in erstaunlich großer Menge Partikel unterhalb des Größenbereichs der Porengröße des Filters befinden. Das heißt, dass der Filter nur einen geringen Teil der Partikel, welche kleiner als die Porengröße des Filters sind, passieren lässt und ein ausreichend großer Anteil der kleineren Partikel im Bereich des Filters zwischen den Poren „liegen bleibt“. Zu diesem Effekt trägt vermutlich auch die Adhäsion der Partikel zur Polycarbonatoberfläche des Filters einen Teil bei. Dies lässt sich auch durch die Beobachtung stützen, dass sich auf dem Filter makroskopisch sichtbar eine geschlossene Partikelschicht bildete, die vermutlich ihrerseits noch kleinere Partikel daran hindert, in das Filtrat zu gelangen. Lediglich Partikel im Größenbereich von kleiner als etwa 10 nm werden durch diese geschlossene Partikelschicht sowie die Filterporen hindurchgespült und sind erwartungsgemäß im Filtrat nachweisbar.

6.2 Zellbiologische Untersuchungen

Ein zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der zellbiologischen Auswirkungen von Abriebprodukten aus dem Prothesen-Zement-Interface von Hüftendoprothesenstielen. Vorbereitend auf die Etablierung einer Methode zur isolierten Betrachtung der zellbiologischen Auswirkungen des metallischen Abrieb-Anteils wurden zunächst die Auswirkungen von kommerziellen Titanpartikeln auf Osteosarkomzellen untersucht.

6.2.1 Zellbiologische Untersuchungen mit humanen Osteosarkomzellen (SAOS-2)

6.2.1.1 Auswirkungen des Lösungsmittels DMSO auf das Proliferationsverhalten von humanen Osteosarkomzellen (SAOS-2)

Ein Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung speziell des metallischen Abrieb-Anteils von in einem Prothesenprüfstand generierten Abriebprodukten aus dem Interface zwischen Hüftendoprothesenstiel und dem Knochenzement auf humane Knochenzellen. In Vorarbeiten hatte sich das organische Lösungsmittel DMSO als geeignet herausgestellt, den PMMA-Anteil des Abriebs aufzulösen [Wittmann 2006].

DMSO ist ein stark polares organisches Lösungsmittel, welches unter anderem auch in der Kryokonservierung von Zellkulturen als Gefrierschutzmittel eingesetzt wird. Darüber hinaus ist jedoch in der Literatur ein zytotoxischer Effekt von DMSO ab einer bestimmten Konzentration beschrieben [Da Violante et al. 2002; Yuan et al. 2014]. So beobachtete Da Violante et al. bei humanen Colon-Tumorzellen (CaCo2/TC7) bei DMSO-Konzentrationen bis zu 10% keine signifikanten Effekte im Vergleich zur Kontrollpopulation, während er bei DMSO-Konzentrationen

über 20% einen signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität sowie der Zellwandpermeabilität beobachten konnte [Da Violante et al. 2002]. Yuan et al. hingegen konnte bereits ab DMSO-Konzentrationen von 1 % im MTT-Test eine um 16% reduzierte Zellaktivität von Astrozyten der Maus nachweisen, bei noch höheren Konzentrationen waren des Weiteren dosisabhängige Schädigungen der Zellmembran sowie der mitochondrialen Integrität festzustellen [Yuan et al. 2014].

In der Literatur existieren hingegen keine ausreichenden Angaben bezüglich einer Zellverträglichkeit des Lösungsmittels DMSO auf humane Knochenzellen. In eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass DMSO in sehr geringen Konzentrationen von 0,01 bzw. 0,1 % [v/v] sogar zu einer geringen Aktivierung der Proliferationsrate von humanen Osteosarkomzellen führt. Dieser nur minimale Effekt tritt nach 3 Tagen Inkubationszeit am deutlichsten auf und stellt sich bei 5 und 7 Tagen Inkubation nicht mehr dar. Hingegen konnte bei DMSO-Konzentrationen über 5 % [v/v] eine signifikante Hemmung der Proliferationsrate von humanen Osteosarkomzellen (SAOS-2) auf unter 20% verglichen mit der Kontrollpopulation beobachtet werden. Dieser gezeigte zytotoxische Effekt kann aufgrund der Ähnlichkeit der Osteosarkomzellen mit primären humanen Knochenzellen [Murray et al. 1987; Rodan et al. 1987] durchaus auch auf diese übertragen werden.

6.2.1.2 Auswirkungen der kommerziellen Partikel auf das Proliferationsverhalten von humanen Osteosarkomzellen

Einer der wichtigsten Hauptversagensgründe der modernen Hüftendoprothetik ist nach wie vor die aseptische Endoprothesenlockerung durch eine durch Abriebpartikel induzierte Osteolyse. Bei der Betrachtung der Grenzfläche zwischen Hüftendoprothesen-Stiel und Knochenzement entstehen die Abriebprodukte neben dem Knochenzementmaterial auch aus röntgendichten Knochenzement-Zusätzen sowie von der Oberfläche des Endoprothesenwerkstoffs. Bei den röntgendichten Knochenzement-Zusätzen wird meist Bariumsulfat (BaSO_4) oder Zirkonoxid (ZrO_2) verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsrate von Osteosarkomzellen durch kommerzielle Titanpartikel (cpTi) oberhalb einer Konzentration von 0,01 g/l nach 72 Stunden Inkubationszeit abnimmt. Des Weiteren konnte bei weiter ansteigenden Partikelkonzentrationen eine weitere Hemmung der Proliferationsrate beobachtet werden.

Ein direkter Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denen anderer Arbeiten wird hierbei jedoch durch die Verwendung unterschiedlicher Einheiten bei der Angabe der Partikelkonzentrationen erschwert, eine Umrechnung ist aufgrund der unterschiedlichen Kenngrößen der einge-

setzten Partikel (Materialdichte, Größenverteilung, Partikelvolumen etc.) meist nicht möglich [Akisue et al. 2002]. Je nach verwendeter Methodik zur Charakterisierung der eingesetzten Partikellösungen wird die Konzentration als Partikelanzahl pro Volumen oder in Gewichtsprozent (%[w/w]) bzw. Volumenprozent (%[v/v]) angegeben. Prinzipiell konnte eine dosis-abhängige Hemmung der Zellproliferation durch ansteigende Partikelkonzentrationen auch in zahlreichen anderen Arbeiten nachgewiesen werden. O'Connor et al. konnten eine Hemmung der Proliferationsrate von Osteoblasten der Ratte durch cpTi-Partikel bereits mit der geringsten getesteten Konzentration von 0,1 %[w/w] beobachten und die Proliferationsrate nahm durch höhere Partikelkonzentrationen weiter ab [O'Connor et al. 2004]. Dieser Effekt ließ sich bereits nach 4 Stunden Inkubationszeit beobachten und war nach 72 Stunden Inkubationszeit am ausgeprägtesten. O'Connor konnte in seiner Arbeit des Weiteren nachweisen, dass die Hemmung der Proliferationsrate durch Titanpartikel im Größenbereich von 1,5-4 µm am größten ist, während durch Titanpartikel im Größenbereich von 10-15 µm die wenigsten Auswirkungen zu beobachten waren. Dies wird durch die Tatsache erklärt, dass Partikel im Größenbereich von 10-15 µm oder darüber kaum mehr von den Zellen phagozytiert werden und die minimalen Effekte bei sehr hohen Partikelkonzentrationen durch vor allem mechanische Schäden der Zellwand entstehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei dem eingesetzten Reintitanpulver (cpTi) 90% der Partikel kleiner als 0,1 µm waren. Somit lässt sich auch die Tatsache erklären, dass in der vorliegenden Arbeit bereits ab einer Partikelkonzentration von 0,01 g/l (entsprechend etwa 0,001 %[w/w]) eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate von Osteosarkomzellen zu beobachten war, was etwa einem Hundertstel der geringsten Konzentration in der vorgenannten Arbeit von O'Connor entspricht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen Partikel mit vergleichbarem Größenspektrum eingesetzt wurden. Hou et al. beobachtete die größten Effekte auf mesenchymale Stammzellen in Bezug auf die Proliferationshemmung durch TiO₂-Partikel im Größenbereich um 196 nm. Bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 0,05 mg/ml (entsprechend 0,005 %[w/w]) war eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrollpopulation zu verzeichnen. Interessanterweise waren hier durch noch kleinere Partikel im Bereich von 108 nm bzw. 14 nm wieder geringere Effekte auf die Proliferationshemmung zu beobachten.

Bei den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten ZrO₂-Partikeln ließ sich erst ab einer Partikelkonzentration von 0,5 g/l eine Hemmung der Proliferationsrate beobachten, unterhalb dieser Konzentration war kein wesentlicher Effekt im Vergleich zur Kontrollpopulation nachzuweisen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Autoren [Ingham et al. 2000; Sabokbar et al. 1997]. Hierbei mag die im Vergleich zu den eingesetzten cpTi-Partikeln wesentlich

größere Partikelgröße von ZrO_2 (10 μm) eine Rolle spielen. Wenngleich der Einfluss von ZrO_2 -Partikeln auf humane Knochenzell-Linien im Vergleich zu Titanpartikeln erst bei wesentlich höheren Dosierungen auftritt, so kann deren Einfluss und Rolle bei der Entstehung der aseptischen Osteolyse keineswegs vernachlässigt werden. Im Vergleich zu reinem Knochenzement ohne Röntgenkontrastzusätze ($BaSO_4$ oder ZrO_2), welcher aufgrund der überaus geringen negativen Auswirkungen auf Zellen als relativ inert gilt [Ingham et al. 2000; Mitchell et al. 2003], erhöht sich im Zellversuch durch die Anwesenheit von Röntgenkontrastzusätzen die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen. Hierbei konnten Sabokbar et al. durch $BaSO_4$ -Partikel eine höhere osteolytische Aktivität im Vergleich zu ZrO_2 -Partikel beobachten [Sabokbar et al. 1997]. Auch Mitchell et al. konnten einen Unterschied der Zellantwort auf Partikel unterschiedlicher Knochenzementarten feststellen: von den drei getesteten Zementarten CMW (reines PMMA ohne Röntgenkontrastzusatz), CMW1 RO (PMMA mit $BaSO_4$) und Palacos R (PMMA mit ZrO_2) war im Zellversuch an humanen mononucleären Zellen (PBMNC) durch den Abrieb von Palacos R weniger $TNF\alpha$ -Sekretion zu beobachten als durch den Abrieb von CMW1 RO. Hierbei mag das unterschiedliche Größenspektrum der $BaSO_4$ -Partikel (1 μm) verglichen mit der Größe der ZrO_2 -Partikel (10 μm) eine Rolle spielen, wenngleich die vorgenannten Unterschiede der Auswirkung von $BaSO_4$ und ZrO_2 auch im direkten Vergleich jeweils gleicher Größenspektren (0,1-1 μm , 0,1-10 μm und 1-10 μm) der Partikellösungen evident waren [Mitchell et al. 2003].

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Arbeit von Ingham et al. die durch die getesteten Abriebpartikel von PMMA-Zementarten mit den Röntgenkontrastzusätzen $BaSO_4$ und ZrO_2 eine signifikant höhere $TNF\alpha$ -Sekretion von Makrophagen feststellen, jedoch konnten sie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Auswirkungen von CMW copolymer cement 1 (mit 10 μm $BaSO_4$), CMW1 RO, CMW copolymer cement 2 (beide mit 1 μm $BaSO_4$) sowie Palacos R (mit 10 μm ZrO_2) beobachten [Ingham et al. 2000]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mitchell et al. waren durch reinen PMMA-Abrieb ohne Röntgenkontrast-Zusätze (in diesem Fall CMW original) keine erhöhten $TNF\alpha$ -Werte messbar, und interessanterweise galt dies auch für Partikel von CMW Calcium phosphate cement (mit 10 μm Tri-Calcium-Phosphat). Jedoch waren im Gegensatz zur Arbeit von Mitchell et al. keine signifikanten Unterschiede im Größenspektrum des Abriebs der einzelnen Knochenzementarten zu erkennen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Rolle der Röntgenkontrastzusätze im Knochenzement in der Entstehung der aseptischen Hüftendoprothesenlockerung in erster Linie von der entstehenden Partikelgröße abhängig zu sein scheint und die Materialunterschiede zwischen $BaSO_4$ und ZrO_2 eher als nachrangig zu beurteilen sind. Jedoch legen die Ergebnisse ebenfalls nahe, dass prinzipiell von Seiten des Knochenzements den hierin enthaltenen Röntgenkontrastzusätzen

erhebliche Bedeutung in der Entstehung und Aufrechterhaltung der aseptischen Endoprothesenlockerung zukommt.

6.2.2 Auswirkungen der Abriebprodukte auf primäre humane Knochenzellen

In den Zellversuchen wurden neben einer etablierten Osteosarkomzelllinie (SAOS-2) auch primäre humane Knochenzellen verwendet, um ein möglichst realitätsnahes In-vitro-Modell der aseptischen Endoprothesenlockerung zu etablieren. Im Gegensatz zur Osteosarkomzelllinie (SAOS-2) wurden die primären humanen Knochenzellen aus humaner Knochenpongiosa im Sinne einer Primärkultur gezüchtet. Primäre Zellkulturen weisen naturgemäß ein heterogenes Spektrum von unterschiedlichen Zellarten auf, so zum Beispiel neben Osteoblasten auch Fibroblasten und Makrophagen [Herbert et al. 1997]. Hierbei ist die Zusammensetzung unter anderem auch vom Alter und der Passagezahl der Zellpopulation abhängig [Herbert et al. 1997]. Die in der Zellkultur vorkommenden Makrophagen beispielsweise können sich aus pluripotenten Stammzellen entwickeln, sie können sich aber auch aus bereits differenzierten Osteoblasten entwickeln. Zreiqat et al. konnten in einer primären Knochenzell-Kultur bei Phagozytose von Titanpartikeln eine vermehrte Expression von CD68-positiven Zellen nachweisen, was für das vermehrte Vorkommen von Makrophagen spricht [Zreiqat et al. 1996].

6.2.2.1 Immunhistochemische Charakterisierung der primären humanen Knochenzellen

Die immunhistochemische Charakterisierung der aus menschlicher Knochenpongiosa angezüchteten Zellkultur zeigte eine deutliche Anfärbung für die knochenspezifischen Marker alkalische Phosphatase sowie Kollagen 1. Die Alkalische Phosphatase ist ein membrangebundenes Plasma-protein, welches von Osteoblasten gebildet wird und in der Differenzierung der Osteoblasten in einem relativ frühen Stadium auftritt. Das in der Literatur beschriebene Osteocalcin als spezifischer Osteoblasten-Marker [Weinreb et al. 1999] tritt dem gegenüber in einem relativ späten Differenzierungsstadium auf.

Darüber hinaus eignet sich Kollagen Typ 1 als Hauptprotein der Osteoblasten zur Charakterisierung dieser Zellart [Rodan et al. 1989; Rodan et al. 1987], wenngleich es auch von anderen Zellarten wie Präosteoblasten und Osteoblastenähnlichen Zellen (Osteoblast-like cells) synthetisiert werden kann.

Der Nachweis der für Osteoblasten typischen Marker lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Kultur von primären humanen Knochenzellen ein adäquates Modell zur Untersuchung von Os-

teoblasten darstellt, wenngleich die primäre humane Knochenzellkultur nicht mit einer Osteoblasten-Zelllinie gleichgesetzt werden sollte.

6.2.2.2 Phagozytose der Abriebprodukte

Wenngleich Makrophagen und Osteoklasten im Zentrum der Phagozytoseaktivität von Abriebpartikeln stehen, wurde durch mehrere Arbeiten belegt, dass auch Osteoblasten und Fibroblasten zur Phagozytose von Partikeln befähigt sind [Lohmann et al. 2000; Lohmann et al. 2002; O'Connor et al. 2004; Pioletti et al. 1999; Vermes et al. 2001]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich lichtmikroskopisch nach 72 Std. Inkubation von primären humanen Knochenzellen deutlich eine intrazelluläre Aufnahme der Partikel. Hierbei kamen die Partikel vermehrt im Zentrum der Zellen im Bereich des Zellkerns zur Darstellung, waren aber im gesamten Intrazellulärraum nachweisbar. Zudem war lichtmikroskopisch ein adhärentes, subkonfluentes Wachstum der Knochenzellen zu verzeichnen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Größe der hier eingesetzten generierten Partikel zwischen 0,7 μm und 10 μm lag, 90% der Partikel waren kleiner als 8 μm [Wittmann 2006]. Somit erlaubt die Größenverteilung prinzipiell die Phagozytose der Partikel durch primäre humane Knochenzellen [Goodman et al. 2006; Neale et al. 2000; Pioletti et al. 1999; Shanbhag et al. 1994a], während Partikel über 10 μm Größe kaum mehr phagozytiert werden können und es hier eher zur Bildung von mehrkernigen Riesenzellen bzw. in vivo zum Fremdkörpergranulom kommt [Ingham et al. 2000; Mcgrath et al. 2001; O'Connor et al. 2004]. Die Phagozytose der Partikel konnte in anderen Arbeiten bereits 2-4 Stunden nach Inkubation nachgewiesen werden, das Maximum der Phagozytoserate ist nach etwa 24 Stunden erreicht [Pioletti et al. 1999; Vermes et al. 2001]. Pioletti et al. beschreiben auch eine weniger elongierte Form der Zellen nach Phagozytose von Partikeln [Pioletti et al. 1999]. In der vorliegenden Arbeit konnte zumindest die Beobachtung gemacht werden, dass die Länge der Zellausläufer nach Phagozytose der Partikel vermindert war. Hierfür scheint eine Destabilisierung des Zytoskeletts die Ursache zu sein, was wiederum die Adhäsionsfähigkeit der Zellen sowie die Vitalität und Proliferationsrate der Zellpopulation hemmt [O'Connor et al. 2004].

6.2.2.3 Auswirkungen der nativen Abriebprodukte auf primäre humane Knochenzellen

Bei der Untersuchung der Auswirkungen des nativen, d.h. gesamten generierten Prothesenabriebs auf primäre humane Knochenzellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Abriebprodukte unterschiedlicher Prothesenstiel-/Zementpaarungen in Bezug auf die Proliferationsrate.

Tabelle 5: Semi-quantitative Übersichts-Darstellung der zellbiologischen Auswirkungen von Humanen Osteoblasten (HOB) auf den isolierten metallischen Abrieb der Abriebprodukte unterschiedlicher Prothesenwerkstoff-Legierungen, Oberflächenrauheiten und Knochenzement-Zusammensetzungen. Zu beachten ist, dass bei den Kohlenstoffbeschichteten Prothesenschäften der native Gesamtabrieb verwendet wurde.

| | Proliferation | Apoptose | Nekrose |
|-----------------------------|---------------|----------|---------|
| CoCr rau/ZrO ₂ | ↑ | ↑ | ↑ |
| CoCr rau/CMW | ↑ | ↑↑ | ↑↑↑ |
| CoCr glatt/ZrO ₂ | ↑↑↑ | ↑ | ↑ |
| CoCr C-beschichtet | ↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ |
| Ti rau/ZrO ₂ | (↓) | ↑ | ↑ |
| Ti glatt/CMW | ↑ | ↑ | ↑ |
| Ti C-beschichtet | ↓ | ↑↑ | ↑ |

Hier kam es durch sämtliche Abriebprodukte zu einer geringen, nicht signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate verglichen mit der Kontrollpopulation. In zahlreichen Arbeiten wurde eine Verminderung der Proliferationsrate durch Abriebpartikel beobachtet [Choi et al. 2005; Goodman et al. 2006; O'Connor et al. 2004; Papageorgiou et al. 2007; Yao et al. 1997]. Die hierzu im Kontrast stehende Beobachtung einer Erhöhung der Proliferationsrate durch Abriebpartikel konnte jedoch auch zumindest in niedrigen Dosierungen von Lacey et al. an Macrophagen gemacht werden, wobei die Größenverteilung der dabei eingesetzten generierten Partikel mit der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Partikel vergleichbar ist [Lacey et al. 2009]. Auch Lohmann et al. beobachteten an Osteoblasten eine Erhöhung der Zellzahl nach Inkubation mit ZrO₂-Partikeln und PMMA-Partikeln [Lohmann et al. 2002].

Bei der Untersuchung der Apoptose- und der Nekroserate zeigten sich dem gegenüber deutliche Unterschiede in den Auswirkungen der Abriebprodukte unterschiedlicher Prothesenstiel-/Zementpaarungen, insbesondere bei den beiden Kohlenstoffbeschichteten Stielen. Während durch den Abrieb des Kohlenstoffbeschichteten CoCr-Stiels die höchste Apoptose- und auch Nekroserate zu verzeichnen war, waren die Auswirkungen der Abriebprodukte des Kohlenstoffbeschichteten Ti-Stiels weitaus geringer und mit denen anderer Prothesen-/Zementpaarungen vergleichbar. Insbesondere für den beschichteten CoCr-Stiel sind diese Ergebnisse verblüffend, da durch die Beschichtung eine sehr harte, abriebfeste Oberfläche erzeugt wird und dadurch im Vergleich zu Prothesenschäften ohne diese Oberflächenbehandlung signifikant weniger Gesamt-abrieb mit sehr geringem metallischem Abriebanteil entsteht [Wittmann 2006]. Vor allem der metallische Anteil im Gesamt-abrieb wurde bislang für die Entstehungsmechanismen der asepti-

schen Endoprothesenlockerung verantwortlich gemacht, da in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die schädigenden Auswirkungen von Metallpartikeln auf Zellkulturen weitaus ausgeprägter sind als der Abrieb des Knochenzements [Lenz et al. 2009; Lohmann et al. 2000; Lohmann et al. 2002; Maloney et al. 1996; Neale et al. 2000; Pioletti et al. 1999; Shanbhag et al. 1995; Shanbhag et al. 1997]. Da im hier vorliegenden Fall beide beschichteten Prothesenschäfte gegen Palacos® Zement mit ZrO_2 getestet wurden, müssen die unterschiedlichen Auswirkungen der Abriebprodukte im jeweiligen Prothesenwerkstoff begründet sein (CoCr vs. Ti). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, die ebenfalls einen größeren zelltoxischen Effekt von CoCr-Partikeln gegenüber Ti-Partikeln beobachteten [Haynes et al. 1993; Lenz et al. 2009; Lochner et al. 2011; Neale et al. 2000].

Hinüber et al. konnten zeigen, dass Kohlenstoffbeschichtungen von Endoprothesenwerkstoffen zu einer geringeren Abriebmenge im Vergleich zu nicht beschichteten Endoprothesenwerkstoffen führen. Zudem zeigten sie in Zellversuchen eine hervorragende Biokompatibilität von kohlenstoffbeschichteten Endoprothesenwerkstoffen im Sinne einer besseren Adhäsionsfähigkeit von Osteoblasten gegenüber nicht beschichteten Oberflächen, auch wenn dieser Effekt nicht signifikant war [Hinüber et al. 2010]. Andererseits wird in der Literatur auch von hohen Versagensraten von kohlenstoffbeschichteten Hüftendoprothesenköpfen aus TiAlV-Legierungen verglichen mit nicht beschichteten Hüftendoprothesenköpfen aus Aluminiumlegierungen berichtet [Roy et al. 2007]. Hierfür wird eine spontane Delaminierung der Oberflächenbeschichtung vom Endoprothesenwerkstoff diskutiert, die letztendlich durch den Dreikörperverschleiß zu einer deutlich erhöhten Abriebmenge führen kann [Roy et al. 2007]. Somit könnten die Unterschiede in der Zellantwort auf die Abriebprodukte der kohlenstoffbeschichteten Ti- bzw. CoCr-Hüftendoprothesenstiele auch auf eine unterschiedliche Vulnerabilität der Kohlenstoffbeschichtung und schließlich Delaminierung der Beschichtung vom Endoprothesenwerkstoff zurückzuführen sein.

Im direkten Vergleich der Abriebprodukte des Kohlenstoffbeschichteten Ti-Schaft zeigen sich sogar geringere Effekte als durch den Abrieb von vergleichbaren nicht beschichteten CoCr-Schäften, wenngleich diese Unterschiede nicht signifikant sind. Dennoch lassen diese Ergebnisse sowie die Tatsache, dass die entstehende Abriebmenge des Kohlenstoffbeschichteten Ti-Endoprothesenstiels weitaus geringer ist als bei anderen Prothesen-/Zementpaarungen, die Kohlenstoffbeschichtung von Titan als viel versprechendes Verfahren erscheinen, die Biokompatibilität von Titanlegierungen als Endoprothesenwerkstoff weiter zu verbessern [Lichtinger et al. 2000].

Für die übrigen getesteten (nicht beschichteten) Hüftendoprothesenstiele zeigte sich durch den Abrieb von Ti-Endoprothesenstielen eine tendenziell höhere Apoptoserate im Vergleich zum Abrieb von CoCr-Stielen, jedoch zeigten sich keine Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen Oberflächentopographie (glatt vs. rau). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass durch Endoprothesenstiele mit rauher Oberfläche mehr Abrieb entsteht als durch Endoprothesenstiele gleicher Legierung mit glatter Oberfläche, zudem ist der metallische Anteil des Gesamtabriebs bei rauher Prothesenoberfläche signifikant höher als mit glatter Oberfläche [Bader et al. 2004; Wittmann 2006]. Diese Unterschiede in den Abriebprodukten spiegeln sich jedoch nicht in gleicher Weise in einer unterschiedlichen Zellantwort wider.

Im direkten Vergleich unterschiedlicher Zementarten bei gleichem Endoprothesenwerkstoff und gleicher Oberflächentopographie zeigt sich durch Abrieb mit Palacos-Zement ohne röntgendichte Zusätze eine tendenziell geringere Apoptose- und Nekroserate als durch den Abrieb mit Palacos-Zement, dem ZrO_2 zugesetzt wurde. Dieser Unterschied war für den glatten Ti-Schaft ausgeprägter als beim glatten CoCr-Schaft. Der Zusatz von ZrO_2 in den Knochenzement erhöht die abrasiven Eigenschaften des Knochenzements, da die keramischen ZrO_2 -Partikel am Endoprothesenstiel-/Knochenzement-Interface gewissermaßen als „Schleifmittel“ fungieren, wodurch es zum vermehrten Abrieb der Endoprothesenoberfläche kommt [Bader et al. 2004; Willert et al. 1996; Wittmann 2006]. Zudem ist neben den zytotoxischen Auswirkungen durch die vermehrt entstehenden metallischen Abriebprodukte auch eine erhöhte osteolytische Aktivität durch die verwendeten Röntgenkontrastzusätze beschrieben [Ingham et al. 2000; Mitchell et al. 2003].

6.2.2.4 Auswirkung der isolierten metallischen Abriebprodukte auf primäre humane Knochenzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nur der metallische Anteil des in einem Prothesenprüfstand generierten Abriebs zwischen verschiedenen Hüftendoprothesenstielen und Knochenzementköchern extrahiert und die Auswirkungen des Abriebs auf primäre humane Knochenzellen untersucht. Trotz der sehr begrenzten Menge der generierten Abriebprodukte und des verschwindend geringen Anteils des metallischen Anteils am Gesamtabrieb von unter 1% gelang die Aufbereitung in für Zellversuche kompatibler Weise. Die zur Verfügung stehende Partikelmenge erwies sich als ausreichend, um im Zellversuch an primären humanen Knochenzellen einen Effekt auf die Proliferationsrate, die Apoptose- und Nekroserate zu beobachten.

Abweichend zu den eingesetzten nativen Abriebprodukten zeigte sich bei den isolierten metallischen Abriebprodukten des rauen CoCr-Schafts gegen CMW-Zement eine höhere Apoptoserate und höhere Nekroserate, während es durch den Abrieb des rauen Ti-Schafts gegen Palacos mit ZrO_2 tendenziell zu einer Verminderung der Proliferationsrate kam. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beschreibungen anderer Autoren, wonach der zytotoxische Effekt von CoCr-Partikeln eher über direkte zellschädigende Mechanismen zum Zelltod führt, während Ti-Partikel weniger Effekt auf das Überleben der Zellpopulation haben und über eine erhöhte Zytokinausschüttung zur Osteolyse führen [Doorn et al. 1998; Glant et al. 1996; Haynes et al. 1993; Pioletti et al. 1999]. Wenngleich Pioletti et al. auch bei Titanpartikeln die Apoptose als wesentlichen zellschädigenden Mechanismus nachwies [Pioletti et al. 1999], legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Vermutung nahe, dass für den zytotoxischen Effekt der CoCr-Partikel die Apoptose in einem höheren Maße zum Tragen kommt, als dies für Ti-Partikel der Fall ist.

In der Literatur sind insbesondere für zementierte Hüftendoprothesenstiele aus Titan hohe Frühlockerungsraten beschrieben [Lichtinger et al. 2000; Massoud et al. 1997; Maurer et al. 2001; Willert et al. 1996], obwohl zahlreiche Arbeiten durch Titanpartikel geringere zellschädigende Effekte als durch CoCr-Partikel nachweisen konnten [Goodman et al. 2006; Lohmann et al. 2000; O'Connor et al. 2004; Pioletti et al. 1999; Pioletti et al. 2002; Shida et al. 2000].

Demgegenüber konnte in der vorliegenden Arbeit die klinische Beobachtung der hohen Frühlockerungsraten von zementierten Hüftendoprothesenstielen aus Titan im Zellversuch bestätigt werden, da durch die nativen generierten Abriebprodukte von Titanstielen tendenziell höhere Apoptose- und Nekroseraten zu beobachten waren als durch CoCr-Stiele. Diese Ergebnisse konnten jedoch mit dem jeweils isolierten metallischen Abriebanteil im Zellversuch nicht bestätigt werden. Hier zeigten sich im Gegenteil durch den isolierten Abrieb von CoCr-Stielen höhere Apoptose- und Nekroseraten als durch den isolierten Abrieb von Ti-Stielen, allerdings war durch den Abrieb von CoCr-Stielen auch die Proliferationsrate der Zellen erhöht. Insofern scheint für zementierte Ti-Schäfte bei der Entstehung der aseptischen Osteolyse insbesondere der Knochenzementabrieb und hier besonders die röntgendichten Zusätze wie ZrO_2 eine wesentliche Rolle zu spielen [Shardlow et al. 2003], wenngleich viele Autoren den zellschädigenden Effekt von ZrO_2 gegenüber den metallischen Abriebprodukten als nachrangig ansehen [Lenz et al. 2009; Wang et al. 2002].

Allerdings ist zu bedenken, dass reine zellbiologische Betrachtungen gewisse tribologische Mechanismen und physikalisch-chemische Vorgänge, die in vivo bei der Entstehung der aseptischen Osteolyse eine Rolle spielen könnten, außer Acht gelassen werden. So wurde als wesentlicher Einfluss die durch Mikrobewegungen zwischen Knochenzement und Hüftendoprothesenstiel

entstehende Oberflächenoxidation am Prothesenwerkstoff beschrieben. Obwohl Titan sich aufgrund seiner korrosionsbeständigen Oberfläche gut als Implantatmaterial eignet [Valles et al. 2006], konnten Willert et al. an explantierten Ti-Schäften erniedrigte pH-Werte messen, was auf Korrosionsvorgänge zurückgeführt wurde [Willert et al. 1996]. An der Oberfläche von Endoprothesenwerkstoffen aus Titanlegierungen bildet sich eine ca. 4-6 nm dicke, stabile TiO₂-Schicht, welche für die gute Biokompatibilität des Werkstoffs sorgt [Valles et al. 2006]. Wenn nun durch Abrasionsvorgänge die stabile TiO₂-Schicht zerstört wird, bekommen die am Knochenmetabolismus beteiligten Zellen Anschluss an eine noch nicht oxidierte Ti-Oberfläche, zudem kommt es durch die Oxidation der Oberfläche zum Absinken des pH-Werts. Durch die Veränderung des Säuremilieus einerseits [Willert et al. 1996], sowie durch die entstehenden Ti-Partikel andererseits kommt es zur Verstärkung der Osteolyse. Zudem konnte für Ti-Partikel eine wesentlich höhere Zytotoxizität als für TiO₂-Partikel nachgewiesen werden [Valles et al. 2006].

Somit können die klinischen Resultate der zementierten Hüftendoprothesen nicht gänzlich im Zellkulturversuch nachvollzogen werden, wenngleich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit teilweise Hinweise hierauf geben können.

Vielmehr als die reine Zellantwort auf die entstehenden Abriebprodukte scheint das Zusammenwirken aus Schaftdesign, Oberflächenbearbeitung und Werkstofflegierung für das klinische Ergebnis eines Hüftendoprothesenschafts verantwortlich zu sein.

7 Zusammenfassung

Trotz der guten Erfolge der modernen Hüftendoprothetik bleibt die aseptische Endoprothesenlockerung der Hauptversagensgrund, wofür durch Abriebpartikel induzierte Vorgänge der periprothetischen Osteolyse eine wichtige Rolle spielen. Trotz der guten Biokompatibilität von Titanlegierungen als Endoprothesenwerkstoff wurden vor allem für zementierte Hüftendoprothesenstiele aus Titan hohe Frühlockerungsraten beschrieben. Deshalb richtet sich in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf die zwischen Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement entstehenden Abriebprodukte und deren Auswirkungen auf primäre humane Knochenzellen.

In einem Prothesenprüfstand generierte Oberflächendestruktionsprodukte unterschiedlicher Hüftendoprothesen- und Knochenzementpaarungen wurden im Zellversuch getestet, hierbei war es erstmals möglich, nur den metallischen Anteil der Abriebprodukte in für Zellversuche kompatibler Weise zu extrahieren und deren Auswirkungen auf die Proliferation, Apoptose und Nekrose von humanen Osteoblasten zu bestimmen.

Hierbei war durch den isolierten metallischen Abrieb von CoCr-Hüftendoprothesenstielen eine höhere Apoptose- und Nekroserate als durch den Abrieb von Ti-Stielen zu verzeichnen, durch deren Abrieb es wiederum eher zu einer Hemmung der Proliferation kam.

Durch den nativen (d.h. gesamten metallischen und Knochenzementanteil) Abrieb von Kohlenstoffbeschichteten Ti-Hüftendoprothesenstielen waren geringere zellschädigende Effekte zu verzeichnen als durch den Abrieb von Ti-Schäften ohne Beschichtung, während es durch den Abrieb von Kohlenstoffbeschichteten CoCr-Schäften zu den höchsten beobachteten Effekten auf die Apoptose- und Nekroserate kam, was durch eine höhere Vulnerabilität der Kohlenstoffbeschichtung auf CoCr-Hüftendoprothesenstielen mit Delaminierung der Beschichtung im Abriebverhalten sowie der höheren Zytotoxizität des CoCr-Abriebs erklärbar wäre.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass durch die Kohlenstoffbeschichtung von Hüftendoprothesen aus Titanlegierungen für den zementierten Einsatz deren Biokompatibilität und die klinische Standzeit der Prothesen weiter verbessert werden kann. Dennoch gibt es im Zellversuch keine generellen Hinweise für die Erklärung der hohen Frühversagensraten von zementierten Hüftendoprothesen aus Titanwerkstoffen gegenüber denen aus CoCr-Legierungen.

Schließlich gilt es in weiteren Arbeiten die zahlreichen Einflussfaktoren der Endoprothesen wie deren Design, Oberflächen- und Materialbeschaffenheit auf die klinische Standzeit zu untersuchen.

8 Literaturverzeichnis

1. Agins HJ, Alcock NW, Bansal M, Salvati EA, Wilson PD, Jr., Pellicci PM, Bullough PG:
Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis.
J Bone Joint Surg Am 70 (1988): 347-356
2. Akisue T, Bauer TW, Farver CF, Mochida Y:
The effect of particle wear debris on NF κ B activation and pro-inflammatory cytokine release in differentiated THP-1 cells.
J Biomed Mater Res 59 (2002): 507-515
3. Amstutz HC, Campbell P, Kossovsky N, Clarke IC:
Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis.
Clin Orthop (1992): 7-18
4. Andersson MK, Anissian L, Stark A, Bucht E, Fellander-Tsai L, Tsai JA:
Synovial fluid from loose hip arthroplasties inhibits human osteoblasts.
Clin Orthop (2000): 148-154
5. Bader R, Steinhauser E, Holzwarth U, Schmitt M, Mittelmeier W:
A novel test method for evaluation of the abrasive wear behaviour of total hip stems at the interface between implant surface and bone cement
Proc Inst Mech Eng [H] 218 (2004): 223-230
6. Choi MG, Koh HS, Kluess D, O'Connor D, Mathur A, Truskey GA, Rubin J, Zhou DX, Sung KL:
Effects of titanium particle size on osteoblast functions in vitro and in vivo
Proc Natl Acad Sci U S A 102 (2005): 4578-4583
7. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P:
Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on CaCo2/TC7 colon tumor cell cultures.
Biol Pharm Bull 2002 (2002): 1600-1603
8. Doorn PF, Campbell PA, Amstutz HC:
Metal versus polyethylene wear particles in total hip replacements. A review.
Clin Orthop (1996): S206-S216
9. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC:
Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles.
J Biomed Mater Res 42 (1998): 103-111

-
10. Eingartner C, Ihm A, Maurer F, Volkmann R, Weise K, Weller S:
Gute langfristige Nachuntersuchungsergebnisse einer zementierten Titan-Geradschaftprothese.
Unfallchirurg 105 (2002): 804-810
 11. Eingartner C, Volkmann R, Kummel K, Weller S:
Niedrige Lockerungsrate einer zementierten Titan-Geradschaftprothese im längerfristigen Verlauf.
Swiss Surg 3 (1997): 49-54
 12. Elke R:
Partikelkrankheit. Ist die Tribologie ein Thema in der Revisionschirurgie?
Orthopäde 30 (2001): 258-265
 13. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T:
One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice.
J Natl Cancer Inst 59 (1977a): 221-226
 14. Fogh J, Wright WC, Loveless JD:
Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors.
J Natl Cancer Inst 58 (1977b): 209-214
 15. Gallo J, Goodman SB, Kontinen YT, Raska M:
Particle disease: Biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty.
Innate Immun 19 (2013): 213-224
 16. Glant TT, Jacobs JJ, Molnar G, Shanbhag AS, Valyon M, Galante JO:
Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages.
J Bone Miner Res 8 (1993): 1071-1079
 17. Glant TT, Yao J, Jacobs JJ:
Induction of Bone Resorbing Agents by Titanium Particulates: Responses of Macrophages, Fibroblasts and Osteoblasts in vitro.
In: Medical Applications of Titanium and its Alloys: The Material and Biological Issues.
American Society for Testing and Materials (1996)
 18. Goodman SB, Lind M, Song Y, Smith RL:
In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris.
Clin Orthop (1998): 25-34
 19. Goodman SB, Ma T, Chiu R, Ramachandran R, Smith RL:
Effects of orthopaedic wear particles on osteoprogenitor cells
Biomaterials 27 (2006): 6096-6101
-

-
20. Haynes DR, Rogers SD, Hay S, Percy MJ, Howie DW:
The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles.
J Bone Joint Surg Am 75 (1993): 825-834
 21. Herbert B, Lecuturier A, Masquelier D, Hauser N, Remacle C:
Ultrastructure and cytochemical detection of alkaline phosphatase in long-term cultures of osteoblast-like cells from rat calvaria.
Calcif Tissue Int 60 (1997): 216-223
 22. Hinüber C, Kleemann C, Friederichs RJ, Laubold L, Scheibe HJ, Schuelke T, Boehlert C, Baumann MJ:
Biocompatibility and mechanical properties of diamond-like coatings on cobalt-chromium-vanadium-molybdenum steel and titanium-aluminium-vanadium biomedical alloys
J Biomed Mater Res A 95(2) (2010): 388-400
 23. Horowitz SM, Doty SB, Lane JM, Burstein AH:
Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption
J Bone Joint Surg Am 75 (1993): 802-813
 24. Horowitz SM, Rapuano BP, Lane JM, Burstein AH:
The interaction of the macrophage and the osteoblast in the pathophysiology of aseptic loosening of joint replacements.
Calcif Tissue Int 54 (1994): 320-324
 25. Hou Y, Cai K, Li J, Chen X, Lai M, Hou Y, Lou Z, Ding X, Xu D:
Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells.
Int J Nanomedicine 2013 (2013): 3619-3630
 26. Ingham E, Green TR, Stone MH, Kowalski R, Watkins N, Fisher J:
Production of TNF-alpha and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles.
Biomaterials 21 (2000): 1005-1013
 27. Katzer A, Buchhorn GH, Hockertz S, Loehr JF:
In-vitro-Toxizität und Mutagenität von CoCrMo und TiAl-Abriebpartikeln.
Orthopade 32 (2003a): 744-750
 28. Katzer A, Loehr JF:
Frühlockerung von Hüftgelenkendoprothesen.
Dtsch Arztebl 100 (2003b): A 784-A 790
-

-
29. Lacey DC, De Kok B, Clanchy FI, Bailey MJ, Speed K, Haynes D, Graves SE, Hamilton JA:
Low dose metal particles can induce monocyte/macrophage survival.
J Orthop Res 27 (2009): 1481-1486
 30. Lappalainen R, Selenius M, Anttila A, Kontinen YT, Santavirta SS:
Reduction of wear in total hip replacement prostheses by amorphous diamond coatings.
J Biomed Mater Res 66B (2003): 410-413
 31. Lee SH, Brennan FR, Jacobs JJ, Urban RM, Ragasa DR, Glant TT:
Human monocyte/macrophage response to cobalt-chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacements.
J Orthop Res 15 (1997): 40-49
 32. Lenz R, Mittelmeier W, Hansmann D, Brem R, Diehl P, Fritsche A, Bader R:
Response of human osteoblasts exposed to wear particles generated at the interface of total hip stems and bone cement
J Biomed Mater Res A 89 (2009): 370-378
 33. Lichtinger TK, Schurmann N, Muller RT:
Frühlockerungen eines zementierten Hüftendoprothesenstiels aus Titan.
Unfallchirurg 103 (2000): 956-960
 34. Lochner K, Fritsche A, Jonitz A, Hansmann D, Mueller P, Mueller-Hilke B, Bader R:
The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles
Int J Mol Med 28 (2011): 1055-1063
 35. Lohmann CH, Dean DD, Koster G, Casasola D, Buchhorn GH, Fink U, Schwartz Z, Boyan BD:
Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype.
Biomaterials 23 (2002): 1855-1863
 36. Lohmann CH, Schwartz Z, Koster G, Jahn U, Buchhorn GH, MacDougall MJ, Casasola D, Liu Y, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD:
Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition.
Biomaterials 21 (2000): 551-561
 37. Maloney WJ, Smith RL:
Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: the role of particulate wear debris
Instr Course Lect 45 (1996): 171-182

-
38. Maloney WJ, Sun DH, Nakashima Y, James R, Smith RL:
Effects of serum protein opsonization on cytokine release by titanium-alloy particles.
J Biomed Mater Res 41 (1998): 371-376
 39. Manlapaz M, Maloney WJ, Smith RL:
In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris.
J Orthop Res 14 (1996): 465-472
 40. Mann KA, Bartel DL, Wright TM, Ingham E:
Mechanical characteristics of the stem-cement interface.
J Orthop Res 9 (1991): 798-808
 41. Massin P, Chappard D, Flautre B, Hardouin P:
Migration of polyethylene particles around nonloosened cemented femoral components from a total hip arthroplasty-an autopsy study.
J Biomed Mater Res 69B (2004): 205-215
 42. Massoud SN, Hunter JB, Holdsworth BJ, Wallace WA, Juliusson R:
Early femoral loosening in one design of cemented hip replacement.
J Bone Joint Surg Br 79 (1997): 603-608
 43. Maurer TB, Ochsner PE, Schwarzer G, Schumacher M:
Increased loosening of cemented straight stem prostheses made from titanium alloys. An analysis and comparison with prostheses made of cobalt-chromium-nickel alloy.
Int Orthop 25 (2001): 77-80
 44. Mcgrath LR, Shardlow DL, Ingham E, Andrews M, Ivory J, Stone MH, Fisher J:
A retrieval study of capital hip prostheses with titanium alloy femoral stems.
J Bone Joint Surg Br 83 (2001): 1195-1201
 45. Meek RM, Michos J, Grigoris P, Hamblen DL:
Mid-term results and migration behaviour of a ti-alloy cemented stem.
Int Orthop 26 (2002): 356-360
 46. Mitchell W, Bridget MJ, Stone MH, Fisher J, Ingham E:
Comparison of the response of human peripheral blood mononuclear cells to challenge with particles of three bone cements in vitro.
Biomaterials 24 (2003): 737-748
 47. Murray E, Provedini D, Curran D, Catherwood B, Sussmann H, Manolagas S:
Charakterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity.
J Bone Miner Res 2 (1987): 231-238
-

-
48. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL:
Signaling pathways for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro.
J Bone Joint Surg Am 81 (1999): 603-615
 49. Neale SD, Haynes DR, Howie DW, Murray DW, Athanasou NA:
The effect of particle phagocytosis and metallic wear particles on osteoclast formation and bone resorption in vitro.
J Arthroplasty 15 (2000): 654-662
 50. O'Connor DT, Choi MG, Kwon SY, Paul Sung KL:
New insight into the mechanism of hip prosthesis loosening: effect of titanium debris size on osteoblast function.
J Orthop Res 22 (2004): 229-236
 51. Otto M, Kriegsmann J, Gehrke T, Bertz S:
Abriebpartikel: Schlüssel der aseptischen Prothesenlockerung?
Pathologe 27 (2006): 447-460
 52. Palmboos PL, Sytsma MJ, DeHeer DH, Bonnema JD:
Macrophage exposure to particulate titanium induces phosphorylation of the protein tyrosine kinase lyn and the phospholipases Cgamma-1 and Cgamma-2.
J Orthop Res 20 (2002): 483-489
 53. Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E, Case CP:
The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro
Biomaterials 28 (2007): 2946-2958
 54. Pioletti DP, Leoni L, Genini D, Takei H, Du P, Corbeil J:
Gene expression analysis of osteoblastic cells contacted by orthopedic implant particles.
J Biomed Mater Res 61 (2002): 408-420
 55. Pioletti DP, Takei H, Kwon SY, Wood D, Sung KL:
The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts.
J Biomed Mater Res 46 (1999): 399-407
 56. Puolakkka TJ, Pajamaki KJ, Halonen PJ, Pulkkinen PO, Paavolainen P, Nevalainen JK:
The Finnish Arthroplasty Register: report of the hip register
Acta Orthop Scand 72 (2001): 433-441

-
57. Rader CP, Hendrich C, Low S, Walther M, Eulert J:
5- bis 8-Jahres-Ergebnisse nach Hüfttotalendoprothese mit der Müller-Geradschaftprothese (zementierter TiAlNb-Schaft).
Unfallchirurg 103 (2000): 846-852
58. Rader CP, Sterner T, Jakob F, Schutze N, Eulert J:
Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles.
J Arthroplasty 14 (1999): 840-848
59. Ramaniraka NA, Rakotomanana LR, Leyvraz PF:
The fixation of the cemented femoral component. Effects of stem stiffness, cement thickness and roughness of the cement-bone surface.
J Bone Joint Surg Br 82 (2000): 297-303
60. Rodan GA, Heath JK, Rodan SB, Yoon K, Noda M:
Osteoblast Phenotypic Expression and Bone Markers.
In: Clinical Impact of Bone and Connective Tissue Markers
Academic Press Ltd., London 1989: 113-117
61. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA:
Characterization of a human osteosarcoma cell line (SAOS-2) with osteoblastic properties.
Cancer Res 47 (1987): 4961-4966
62. Rogers SD, Howie DW, Graves SE, Percy MJ, Haynes DR:
In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium.
J Bone Joint Surg Br 79 (1997): 311-315
63. Roy RK, Lee KR:
Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review
J Biomed Mater Res B Appl Biomater 83(1) (2007): 72-84
64. Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray DW, Athanasou NA:
Radio-opaque agents in bone cement increase bone resorption
J Bone Joint Surg Br 79 (1997): 129-134
65. Sabokbar A, Rushton N:
Role of inflammatory mediators and adhesion molecules in the pathogenesis of aseptic loosening in total hip arthroplasties
J Arthroplasty 10 (1995): 810-816
-

-
66. Scholl E, Eggli S, Ganz R:
Osteolysis in cemented titanium alloy hip prosthesis.
J Arthroplasty 15 (2000): 570-575
 67. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT:
Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area.
J Biomed Mater Res 28 (1994a): 81-90
 68. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT:
Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro.
J Orthop Res 13 (1995): 792-801
 69. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT:
Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro.
Clin Orthop (1997): 205-217
 70. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Glant TT, Gilbert JL, Black J, Galante JO:
Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement.
J Bone Joint Surg Br 76 (1994b): 60-67
 71. Shardlow DL, Stone MH, Ingham E, Fisher J:
Cement particles containing radio-opacifiers stimulate pro-osteolytic cytokine production from a human monocytic cell line
J Bone Joint Surg Br 85 (2003): 900-905
 72. Shida J, Trindade MC, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL:
Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro
Calcif Tissue Int 67 (2000): 151-155
 73. Sommer B, Felix R, Sprecher C, Leunig M, Ganz R, Hofstetter W:
Wear particles and surface topographies are modulators of osteoclastogenesis in vitro
J Biomed Mater Res A 72 (2005): 67-76
 74. Sun JS, Lin FH, Tsuang YH, Chen LT, Hong RC, Chang WH, Liu HC:
Effect of anti-inflammatory medication on monocyte response to titanium particles.
J Biomed Mater Res 52 (2000): 509-516
 75. Tsutsui T, Kawaguchi H, Fujino A, Sakai A, Kaji H, Nakamura T:
Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation.
J Orthop Sci 4 (1999): 32-38

-
76. Valles G, Gonzalez-Melendi P, Gonzalez-Carrasco JL, Saldana L, Sanchez-Sabate E, Munuera L, Vilaboa N:
Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles
Biomaterials 27 (2006): 5199-5211
77. Verdonschot N, Tanck E, Huiskes R:
Effects of prosthesis surface roughness on the failure process of cemented hip implants after stem-cement debonding.
J Biomed Mater Res 42 (1998): 554-559
78. Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT:
The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts.
J Bone Joint Surg Am 83-A (2001): 201-211
79. Wang ML, Nesti LJ, Tuli R, Lazatin J, Danielson KG, Sharkey PF, Tuan RS:
Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells.
J Orthop Res 20 (2002): 1175-1184
80. Weinreb M, Shinar D, Rodan GA:
Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization.
J Bone Miner Res 5 (1999): 831-842
81. Willert HG, Broback LG, Buchhorn GH, Jensen PH, Koster G, Lang I, Ochsner P, Schenk R:
Crevice corrosion of cemented titanium alloy stems in total hip replacements.
Clin Orthop (1996): 51-75
82. Willert HG, Buchhorn GH:
Particle Disease Due To Wear of Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene.
In: Biological, Material and Mechanical Considerations of Joint Replacement
Raven Press New York (1993): 87-102
83. Witt JD, Swann M:
Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements.
J Bone Joint Surg Br 73 (1991): 559-563
84. Wittmann R:
Experimentelle Untersuchungen zum Abriebverhalten zementierter Titan- und CoCr-Hüftendoprothesenstiele und zu deren Abriebprodukten.
Medizinische Dissertation, Technische Universität München, 2006
-

85. Yao J, Cs-Szabo G, Jacobs JJ, Kuettner KE, Glant TT:
Suppression of osteoblast function by titanium particles.
J Bone Joint Surg Am 79 (1997): 107-112
86. Yao J, Glant TT, Lark MW, Mikecz K, Jacobs JJ, Hutchinson NI, Hoerrner LA, Kuettner KE, Galante JO:
The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: fibroblast response to titanium particles.
J Bone Miner Res 10 (1995): 1417-1427
87. Yuan C, Gao J, Bai L, Marshall C, Cai Z, Wang L, Xiao M:
Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes.
Public Library of Science 2014 (2014): e107447-e107447
88. Zreiqat H, Markovic B, Walsh WR, Howlett CR:
A novel technique for quantitative detection of mRNA expression in human bone derived cells cultured on biomaterials.
J Biomed Mater Res 33 (1996): 217-223

9 Chemikalienverzeichnis

- Aceton, Fa. Merck, Darmstadt
- AEC Substrat-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA
- Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Fa. Roche Diagnostics, Penzberg
- Brij 35 Lösung 30%, Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
- Cell Proliferation Kit 1 (MTT), Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
- Cobalt-Standardlösung 1000 mg/l (Cobalt-(II)-Nitrat in Salpetersäure 0,5 Mol/l, Fa. Merck, Darmstadt
- Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Fa. Roche Diagnostics, Penzberg
- DMEM (dulbeccos Modified Eagle's Medium, Fa. Biochrom AG, Berlin
- DMSO (Dimethyl-Sulfoxid), Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- FCS (Fetal Calf Serum), Fa. Biochrom AG, Berlin
- Flusssäure (HF) 40%, Fa. Merck, Darmstadt
- Glycerin, Fa. Merck, Darmstadt
- L-Glutamin 200 mM, Fa. Biochrom AG, Berlin
- NBT/BCIP (Substrat der alkalischen Phosphatase) Ready-to-use-tablets, Fa. Roche Diagnostics, Penzberg
- Palladium-(II)-Chlorid 2 g/l, Fa. Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe
- PBS (Phosphate Buffered Saline), Fa. Biochrom AG, Berlin
- Penicillin/Streptomycin (25.000 Einheiten Penicillin/ml, 25 mg/ml Streptomycin), Fa. Gibco, Karlsruhe

- Pepsin 0,4% in 10 mM HCl, Fa. Sigma, St. Louis, USA
- PFA (Paraformaldehyd) 4% in PBS, pH 7,4, Fa. Merck, Darmstadt
- Salzsäure (HCl) rauchend, 37%, Fa. Merck, Darmstadt
- Titan-Standardlösung 1000 mg/l, Fa. Merck, Darmstadt
- Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Triton X-100 Lösung, Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Trypsin-EDTA, Fa. Gibco, Karlsruhe
- Vectastain ® (Avidin/Biotin-Komplex), Vector Laboratories, Burlingame, USA

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe, Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München, sowie Prof. Dr. med. Rainer Hanns Hermann Burgkart, Leiter der Labore für Biomechanik, Tissue Engineering & Galenik und Virtuelle Medizin, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und die Betreuung der Arbeit.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. rer. nat. Ulla Magdolen, Herrn Dr. med. Peter Diehl sowie Herrn Dr. med. Johannes Schauwecker vom Zellkulturlabor der Orthopädie am Klinikum Rechts der Isar in München für die hervorragende Zusammenarbeit und die vielen wertvollen Hinweise und Ratschläge.

Besonders herzlicher Dank gebührt Frau Jutta Tübel für ihre unendliche Geduld und dafür, dass sie im Zellkulturlabor alle Fäden zusammenhält.

Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader vom Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie der Universität Rostock sowie Herrn Prof. Dr.-Ing. Erwin Steinhauser von der Abteilung für Biomechanik der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München möchte ich für die Hilfestellung und die Unterstützung in allen Phasen meiner Arbeit bedanken.

Bei Herrn Oliver Düttmann vom Institut für Instrumentelle Analytik des Lehrstuhls für Physikalische Technik an der Fachhochschule München möchte ich mich für die Möglichkeit der Messung am Atomabsorptionsspektrometer (AAS) bedanken.

Für die Messungen am Ultrafine Particle Analyser (UPA) möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Ing. Hans-Christoph Schwarzer vom Lehrstuhl für Grenzflächen- und Verfahrenstechnik der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität München sowie bei Herrn Dipl.-Ing. Johannes Gradl vom Lehrstuhl für Feststoff- u. Grenzflächenverfahrenstechnik der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg ganz herzlich bedanken.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Ehefrau Dr. med. Vanessa Gattung bedanken, dass sie mich in allen Phasen der Arbeit unterstützt und motiviert hat.