

**Klinik für Orthopädie, Sportorthopädie und Unfallchirurgie  
der Technischen Universität München**  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

Etablierung eines durchflusszytometrischen Tests zur  
Bestimmung der Zytokompatibilität antiinfektiöser  
Titanoxidschichten für medizinische Implantate

**Maximilian Martin Gemeinhardt**

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

**Vorsitzender:** Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
**Prüfer der Dissertation:** 1. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger  
2. apl. Prof. Dr. H. Bernhard

*Die Dissertation wurde am 09.07.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2008 angenommen.*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>5</b>
1.1	Biomaterialien in der Medizin	5
1.2	Biomaterialien in der Orthopädie: Endoprothetik	6
1.3	Implantatassoziierte Infektionen in der Orthopädie	7
1.3.1	Epidemiologie	7
1.3.2	Therapie und Erregerspektrum	8
1.3.3	Pathomechanismen	9
1.3.4	Bedeutung der Biokompatibilität des Implantats	12
1.4	Entwicklung einer biokompatiblen und antiinfektiösen Endoprothesenbeschichtung auf TiO <sub>2</sub> -Basis mit antibakterieller Wirkkomponente durch Integration von Kupferionen	13
1.5	Biokompatibilität und Apoptose	14
1.6	Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie	19
1.7	Aufgabenstellung	21
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>23</b>
2.1	Material	23
2.1.1	Zellen	23
2.1.2	Zellkultur	23
2.1.3	Farbstoffe	24
2.1.4	FACS	25
2.1.5	Geräte	25
2.1.6	Metallplättchen	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.2	Aussaat der Zellen	28
2.2.3	Apoptoseinduktion	28
2.2.3.1	Untersuchung des zeitlichen Apoptoseablaufs von Saos-2-Zellen nach Camptothecinexposition	28
2.2.3.2	Untersuchung des Apoptoseablaufs in Abhängigkeit von der Camptothecinkonzentration	29
2.2.4	Auswaschversuche	29
2.2.4.1	Auswaschversuche mit PI	29
2.2.4.2	Auswaschversuche mit 7-AAD	29

2.2.5	Vorbereitung der Zellen auf die durchflusszytometrische Untersuchung	29
2.2.6	FACS-Messungen	31
2.2.6.1	Versuchsvorbereitung	31
2.2.6.2	FACS-Einstellung auf Zellen und Farbstoffe	31
2.2.7	Durchflusszytometrischer AnV-PI-Zytokompatibilitätstest zur Evaluierung verschiedener antibakterieller Oberflächenbeschichtungen	32
2.2.8	Trypanblau-Vitalitätstest als etabliertes Standardverfahren	33
2.2.9	Untersuchung der Zytokompatibilität unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen im zeitlichen Verlauf mittels FACS und Trypanblaufärbung	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>FACS</b>	<b>35</b>
3.1.1	Zeitlicher Apoptoseablauf von Saos-2-Zellen nach Camptothecinexposition	35
3.1.2	Apoptoseablauf in Abhängigkeit von der eingesetzten CamptothecinKonzentration	36
3.1.3	Auswaschversuche mit Propidiumjodid und 7-AAD	37
3.1.3.1	Propidiumjodid	37
3.1.3.2	7-AAD	38
3.1.4	Zellablöseverfahren	38
3.1.4.1	Trypsin-EDTA	39
3.1.4.2	Accutase™	39
3.1.4.3	AccuMax™	40
3.1.4.4	Zellschaber	40
3.1.5	Untersuchung der abgelösten Oberflächenpartikel	41
3.1.6	Untersuchung der Zytokompatibilität unterschiedlicher Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen mit dem durchflusszytometrischen AnV-PI-Zytokompatibilitätstest	42
3.1.6.1	fehlerhaft beschichtete Oberflächen	42
3.1.6.2	polierte Oberflächen	44
<b>3.2</b>	<b>Trypanblau-Vitalitätstest</b>	<b>47</b>
3.2.1	fehlerhaft beschichtete Oberflächen	47
3.2.2	polierte Oberflächen	48
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung des zeitlichen Verlaufs von Apoptose und Nekrose auf unterschiedlichen Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen mittels FACS und Trypanblaufärbung</b>	<b>49</b>
3.3.1	FACS	49
3.3.2	Trypanblau-Vitalitätstest	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Neuanwendung des AnnexinV-Propidiumjodid-Assays als Zytokompatibilitätstest für Biomaterialien</b>	<b>54</b>

4.1.1	Bisherige Anwendung des AnnexinV-Propidiumjodid-Apoptoseassays	54
4.1.2	Vergleich der unterschiedlichen Zellablöseverfahren	55
4.1.2.1	Trypsin-EDTA	55
4.1.2.2	Zellschaber	56
4.1.2.3	Accutase™	56
4.1.2.4	AccuMax™	58
4.1.3	Untersuchung der abgelösten Oberflächenpartikel	58
4.1.4	Apoptoseeinleitung mit Camptothecin	58
4.1.5	Auswaschversuche	59
4.1.6	Alternative Methoden zur Bestimmung von Apoptose und Nekrose	59
4.1.7	Bewertung des neu etablierten AnV-PI-Zytokompatibilitätstests für adhären- te Zellen	61
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der Zytokompatibilitätsuntersuchungen</b>	<b>63</b>
4.2.1	Abhängigkeit der Zytokompatibilität von der Beschichtungszusammensetzung	64
4.2.2	Abhängigkeit der Zytokompatibilität von der Oberflächentopographie	67
4.2.3	Abhängigkeit der Zytokompatibilität von der Inkubationsdauer	70
4.2.4	Allgemeine Bewertung der Oberflächenbeschichtungen und Ausblick	71
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGEN</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>93</b>

# **1 Einleitung und Zielsetzung**

## **1.1 Biomaterialien in der Medizin**

Biomaterialien werden seit vielen hundert Jahren in unterschiedlichen Formen und zu verschiedensten Zwecken in der Heilkunde eingesetzt und sind heute unverzichtbarer Bestandteil der modernen Medizin. Seit der 1986 von der European Society for Biomaterials (ESB) erreichten Vereinheitlichung der internationalen Nomenklatur, wird ein Biomaterial definiert als „*nonviable material, used in a medical device intended to interact with a biological system*“ [Williams 1988, S.11].

Bereits 1565 verschloss Petronius eine angeborene Gaumenspalte durch Implantation einer Goldplatte, und von Hieronymus Fabricius wird berichtet, dass er schon im 17. Jahrhundert Eisen-, Gold- und Bronzedrähte zur Wundnaht verwendete [Wintermantel 2002, S. 122]. Heute treffen wir medizinische Biomaterialien in unterschiedlichsten Formen, Größen und Funktionen an: sie finden Verwendung als Herzschrittmacher, orthopädische Endoprothesen, Zahnimplantate, Nahtmaterial, Katheter, künstliche Herzklappen u. v. m..

Entscheidend für den Einsatz eines Biomaterials im menschlichen Körper ist seine Biokompatibilität, die von der Oberfläche des Implantats ausgeht und die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System beschreibt [Wintermantel 2002, S. 5]. Man untergliedert weiter in Strukturkompatibilität, die die Anpassung der Implantatstruktur an das mechanische Verhalten des Empfängergewebes beschreibt, sowie Oberflächenkompatibilität, unter der die Anpassung der chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften des Implantates an das Empfängergewebe mit dem Ziel einer klinisch erwünschten Wechselwirkung verstanden wird [Wintermantel 2002, S. 6]. Bei Knochenimplantaten kann nach Schenk die Kompatibilität im Hinblick auf die Reaktion des Knochengewebes folgendermaßen abgestuft werden:

*inkompatibel:* Freisetzung von Substanzen in toxischen Konzentrationen  
→ Überempfindlichkeits-, Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen bis zur Implantatabstoßung

*biokompatibel:* Freisetzung von Substanzen in nicht-toxischen Konzentrationen  
→ Integration des Gewebes in eine dünne Bindegewebsschicht

*bioinert:* keine Freisetzung toxischer Substanzen  
→ keine Gewebereaktion

*bioaktiv:* positive Interaktion mit Gewebedifferenzierung  
→ Knochenbildung an Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat

*induktiv:* → Induktion heterotoper Knochenbildung

*konduktiv:* → Werkstoff dient als Leitschiene für Knochenneubildung ohne das Wachstum direkt zu stimulieren

[Schenk 1986, aus Wintermantel 2002, S. 6]

Trotz des heute routinemäßigen Einsatzes von Biomaterialien in der Medizin wird eine unbegrenzte Anwendung nach wie vor durch Komplikationen – wie v. a. mangelhafte Integration sowie bakterielle Infektionen - limitiert [Gristina 1991, S. 363].

## **1.2 Biomaterialien in der Orthopädie: Endoprothetik**

Der Weg hin zur modernen Gelenkersatzoperation vollzog sich über mehr als 300 Jahre. Im Mittelalter standen für Patienten mit Arthropathien oder Gelenkverletzungen lediglich die radikalen und riskanten Therapieoptionen Amputation, Gelenkresektion oder Gelenkexzision zur Verfügung. Bereits ab dem 18. Jahrhundert wurde begonnen, durch Verfahren wie Osteotomie und Interpositionsarthroplastik künstliche Pseudoarthrosen zu schaffen. Dadurch ließ sich die Mobilität der betroffenen Extremität weitgehend erhalten oder sogar wiederherstellen [Ziller 1984, S. 526f; Rüttimann 1990, S. 243f].

Als eigentliche Geburtsstunde der modernen Endoprothetik gilt jedoch der 1885 von Themistocles Gluck (1853-1942) vor der Berliner Medizinischen Gesellschaft gehaltene Vortrag über seine Vision der Verpflanzung von Gelenken frischer Leichen und der Implantation künstlicher Gelenke aus Elfenbein. Die entscheidende Publikation folgte 1891 [Wessinghage 2000, S. 1070]. Der Berliner Chirurg Gluck gilt zu Recht als der Vater der modernen Endoprothetik, der sich auch Fragen der Antisepsis, der Überbrückungsosteosynthese mit Metallen, dem Entwurf künstlicher Gelenke und der Prothesenfixation mittels Knochenzement widmete [Wessinghage 1991, S. 386f; Eynon-Lewis 1992, S. 1535]. Seine Kurzzeitergebnisse waren hervorragend, die Langzeitergebnisse jedoch desolat, sodass er seine Idee zunächst nicht weiterverfolgen konnte. Der Grund für seine schlechten Resultate ist jedoch weniger in seinen Fähigkeiten als Operateur, als vielmehr in der verfehlten Selektion des Patientengutes zu suchen: Alle Prothesenempfänger litten an Gelenktuberkulose, die damals unheilbar war und mittels einer Arthroplastik unmöglich therapiert werden konnte. Schon nach kurzer Zeit war das Transplantat infiziert und musste explantiert werden [Wessinghage 1991, S. 387].

In den Folgejahren erfuhr die Gelenkchirurgie eine enorme Beschleunigung ihrer Entwicklung: 1908 führte Lexer die von Gluck beschriebene Transplantation eines

Kniegelenks durch, Péan ersetzte ein Schultergelenk durch eine Prothese aus Hartgummi und Platin. Weitere Meilensteine waren die „*vitallium cup*“ von Smith-Petersen 1939, die Konstruktion einer totalen Hüftendoprothese aus Metall durch Wiles 1917, die von den Brüdern Judet entwickelten Plexiglashüftköpfe und die unzähligen Verbesserungen der Endoprothetik durch Sir John Charnley aus Manchester. Er verhalf dem künstlichen Hüftersatz durch die Entwicklung der „*low friction arthroplasty*“ und der Einführung von autopolymerisierendem Methylmetacrylat als Knochenzement zum endgültigen Durchbruch. Die anfänglich auch von ihm beobachtete hohe Frühversagerrate konnte er u. a. durch Entwicklung neuer Methoden der Reinraumtechnik senken, sodass er als erster über hervorragende Langzeitergebnisse bei großen Fallzahlen berichten konnte [Wessinghage 2000, S. 1070f].

Millionen von Menschen profitierten seitdem von dieser stetigen Weiterentwicklung und haben so eine wesentliche Verbesserung ihrer Lebensqualität und Lebenserwartung erfahren. Über 600.000 Patienten werden alleine in den USA pro Jahr mit einem künstlichen Gelenk versorgt, weltweit wird die Zahl auf knapp anderthalb Millionen geschätzt [Darouiche 2004, S. 1423].

## **1.3 Implantatassoziierte Infektionen in der Orthopädie**

### **1.3.1 Epidemiologie**

Trotz vieler bedeutender technischer und pharmakologischer Errungenschaften der vergangenen Jahrzehnte wie „*laminar-air-flow*“-Technik in Operationssälen, speziellen Reinraum-Schutzanzügen für Operateure, verbesserter perioperativer Antibiotikaphylaxe, antibiotikahaltigem Zement und verkürzter Operationszeit, konnten die Infektionsraten in der Endoprothetik in den letzten Jahren nicht weiter gesenkt werden. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Mehrzahl aller Protheseninfektionen bereits durch bakterielle Verunreinigungen im Operationssaal und in der unmittelbar postoperativ folgenden Phase der Wundheilung erworben werden [Steckelberg 2000, S. 174].

Ereilte vor 40 Jahren noch ungefähr jeden zehnten Empfänger einer Gelenkendoprothese das Schicksal, eine Infektion zu entwickeln [Lentino 2003, S. 1157], scheitern heute nur noch etwa 1% der primär durchgeführten Hüftendoprothesenimplantationen trotz aller Gegenmaßnahmen aus diesem Grund. Bei Kniegelenkendoprothesen (1-4 %) und Ellenbogenendoprothesen (4-7 %) liegt die Infektionsrate sogar noch etwas darüber, was durch die schlechtere Weichteildeckung erklärt werden kann [Zimmerli 2003 S. 99; Murdoch

2001, S. 647; Gristina 1991, S. 363; Bengtson 1991, S. 301; 1993, S. 523; Nasser 1994, S. 153; Bauer 1999, S.484; Widmer 2001, S. S98]. Auch aus der Zahnheilkunde wird über hohe Raten implantatassoziiertes Infektionen berichtet [Esposito 1999, S. 473; Kirkpatrick 2003, S. 462]. Sogar aus OP-Präparaten „aseptischer Lockerungen“ von Hüftgelenksendoprothesen konnten Perdreau-Remington et al. in 76 % der Fälle eine bakterielle Besiedlung nachweisen [Perdreau-Remington 1996, S. 160]. Gleiche Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen erlauben die Vermutung, dass die aseptische Lockerung weit weniger häufig auftritt, als in der Literatur angegeben, bzw. dass die Bedeutung der septischen Lockerungen deutlich unterschätzt wird [Gallo 2003, S. 27].

Zwar konnten die Infektionsraten in den vergangenen 50 Jahren massiv gesenkt werden, doch ist zum einen die Infektionsrate seit einigen Jahren auf konstantem Niveau geblieben, zum anderen die absolute Fallzahl implantatassoziiertes Infektionen durch die demographisch bedingt immer häufiger gestellte Indikation zum Endoprotheseneinbau im Steigen begriffen [Zimmerli 2003, S. 99]. Gemeinsam mit der zunehmenden Anzahl an Wechseloperationen (mit erhöhtem Infektionsrisiko!), führt die Entwicklung zu einer insgesamt deutlich steigenden Gesamtzahl an Endoprotheseninfektionen.



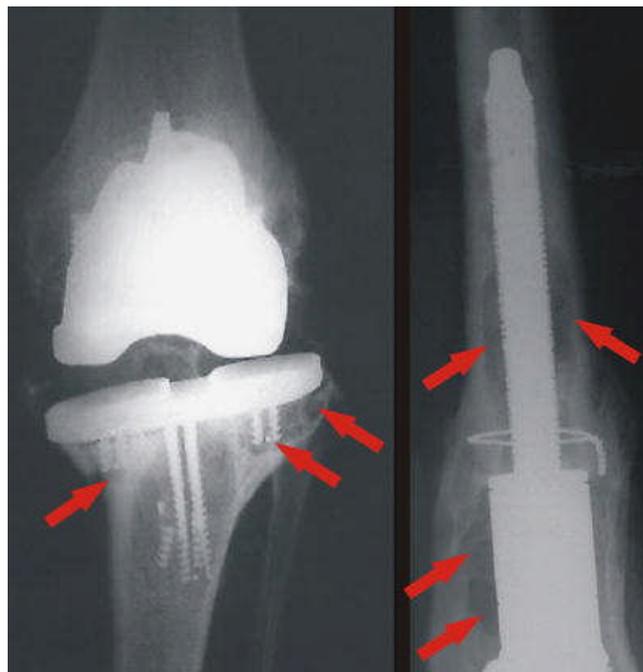
**Abbildung 1:** Freiliegende infizierte Kniegelenksendoprothese mit Hautdefekt bei chronischem Verlauf [aus von Stein 2006]

### **1.3.2 Therapie und Erregerspektrum**

Die zu Verfügung stehenden Therapieoptionen der Protheseninfektion sind begrenzt: Außer einer hochdosierten Antibiotikatherapie und ausgiebigem Débridement bleibt meist nur der Prothesenwechsel als letzte Möglichkeit übrig. Das Knochenlager wird hierbei in der Regel zusätzlich geschädigt und das Infektionsrisiko ist gegenüber dem Ersteingriff noch weiter erhöht [Nasser 1994, S. 156; Widmer 2001, S. S98]. In schlimmsten Fällen drohen die

Versteifungsoperation, Amputation der Extremität oder gar lebensgefährliche Verläufe. Nicht außer Acht zu lassen sind auch die immensen finanziellen Konsequenzen: So werden die Behandlungskosten einer einzigen Endoprotheseninfektion in den USA auf bis zu \$30.000 geschätzt, die reinen Behandlungskosten für Infektionen von Endoprothesen und Osteosynthesematerialien betragen ca. 1,8 Milliarden US\$ pro Jahr [Darouiche 2004, S. 1423].

Die am häufigsten im Zusammenhang mit Implantatinfektionen isolierten Bakterien sind *Staphylococcus aureus*, bevorzugt auf metallischen Implantaten und bei Wundinfektionen anzutreffen, und *Staphylococcus epidermidis*, der häufiger auf Polymeren gefunden wird, gefolgt von Streptokokken, gram-negativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und Enterokokken [Gristina 1987, S. 1589; 1988, S. 873; 1994, S. 108; Darouiche 1997, S. 75; von Eiff 1999, S. 843; Zimmerli 2004, S. 1645; Lentino 2003, S. 1158]. Oftmals liegen polymikrobielle Infektionen vor. So lassen sich bei zwei Dritteln aller Osteomyelitiden erwachsener Patienten mehrere verursachende Keime nachweisen [Gristina 1987, S. 1589].



**Abbildung 2:** links - Radiologische Zeichen der septischen Prothesenlockerung einer Knie-TEP mit ausgeprägten Osteolysen. rechts - Osteolysen entlang der intramedullären Stielverankerung einer Revisionsendoprothese bei TEP-Infektion [aus Gollwitzer 2006a]

### **1.3.3 Pathomechanismen**

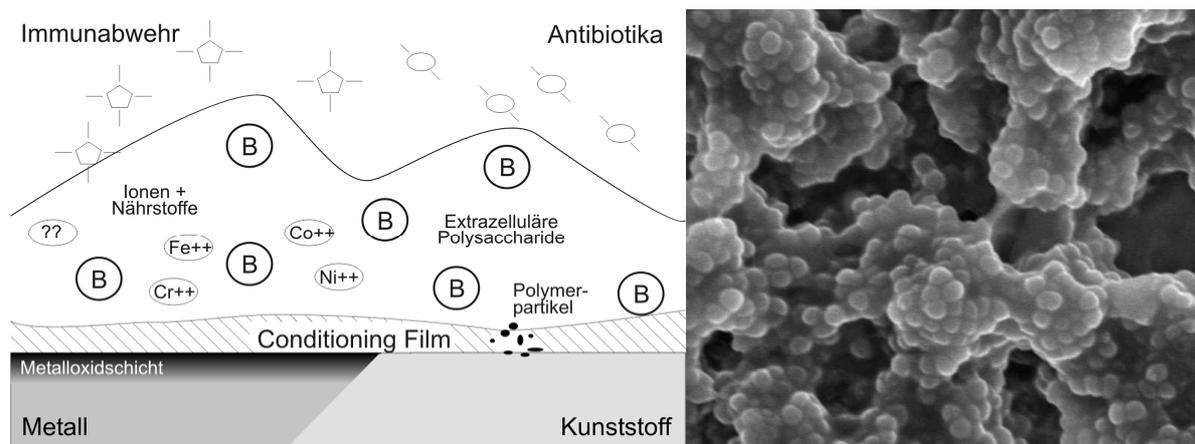
Zum Verständnis der schwierigen Therapie implantatassoziiertter Infektionen und wichtiger Ansätze der Prävention, ist ein kurzer Überblick über die zu Grunde liegenden Pathomechanismen der Infektiogenese, gezeigt an der Besiedlung metallischer Oberflächen durch Staphylokokken, unerlässlich.

Ausgangspunkt ist die irreversible Adsorption wirtseigener Proteine wie Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Laminin, Kollagen oder v.-Willebrand-Faktor an den Fremdkörper. Durch dieses sogenannte „*coating*“ werden die Oberflächeneigenschaften des Implantats verändert und sowohl für Bakterien, wie auch für Gewebezellen, unzählige Bindungsstellen dargeboten [Gristina 1987, S. 1590; 1994, S. 109; von Eiff 2000, S. 1184]. Um die Besiedlung der mit diesem „*conditioning film*“ überzogenen Oberfläche, dem sog. „*reactive interface*“, tragen nun körpereigene Zellen, Bakterien und Makromoleküle ein „*race for colonization of the biomaterial surface*“ aus (s. Abb. 3) [Gristina 1987, S. 1590; 1991, S. 368; 1994, S.108]. Der Ausgang dieses schnell verlaufenden Konkurrenzkampfes entscheidet letztlich über das Schicksal des Implantats und des Patienten [Gristina 1988, S. 873; 1991, S. 368; 1994, S. 107]. Gewinnen die körpereigenen Zellen die Oberhand, wird das Implantat in das umgebende Gewebe integriert und eine bakterielle Besiedlung für die Zukunft deutlich erschwert. Umgekehrt verhindert eine bakterielle Besiedlung des Implantats die Adhäsion und das Anwachsen körpereigener Zellen [Gristina 1987, S. 1594; 1994, S. 107]. Das Ausmaß der Besiedlung eines Biomaterials hängt nicht nur von der Bakterienspezies, sondern auch von der Beschaffenheit des Biomaterials im Hinblick auf Ladung, Hydrophilie oder Rauigkeit ab [Gallo 2003, S. 30].

Der nächste Schritt, meist bedeutend langsamer verlaufend, wird als Proliferations- oder Akkumulationsphase bezeichnet. Die Bakterien vermehren sich und beginnen, einen „Biofilm“ zu bilden, der bis zu 160µm dick werden kann und aus multiplen Bakterienzellagen, extrazellulärer Schleimsubstanz, Débris, Wirtsproteinen und Ionen besteht [von Eiff 2000, S. 1184]. Von entscheidender Bedeutung scheint hierbei die Fähigkeit verschiedener Staphylokokkenstämme zur Bildung von Zell-Clustern durch interbakterielle Adhäsion zu sein, für die ein spezifisches Polysaccharid-Antigen verantwortlich gemacht wird, das sog. PIA (polysaccharide intercellular adhesin) [Mack 1996, S. 181; von Eiff 1999, S. 844]. Innerhalb des Biofilms entsteht ein für das Wachstum und die Persistenz der Bakterien perfektes Mikromilieu (s. Abb. 3). Freie Ionen und andere chemische Substanzen können von den Bakterien verwertet werden, freiwerdende Oberflächenenergie des metallischen Implantats wird als Katalysatorenergie genutzt - die Bakterien leben unter optimalen Bedingungen, verlangsamen ihre Wachstumsrate, aktivieren verschiedene Persistenzstrategien und die Entzündung chronifiziert [Gristina 1987, S. 1591; 1988, S. 873; 1991, S. 366]. Des weiteren schützt der Biofilm effektiv vor Reaktionen des körpereigenen Immunsystems, aber auch vor chemotherapeutischen Angriffen, stellt also eine für das Bakterium weit günstigere Lebensform dar als das freie Schweben in Flüssigkeit [Bayston

1990, S. 866; Gristina 1991 S. 368; von Eiff 1999, S. 845]. Ausschlaggebend hierfür sind die verzögerte Diffusion vieler Antibiotika durch den Biofilm, die durch die verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit hervorgerufene, verminderte Aufnahme der Medikamente in die Bakterien, eine reversible Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), sowie eine vermehrte Bindung bestimmter Antibiotika an extrazelluläre Proteine und damit Inaktivierung der Antibiotika im Biofilm [Donlan 2000, S. S47f].

Durch „*Quorum-sensing*“-Mechanismen können die Bakterien ihre Populationsdichte wahrnehmen und über verschiedene regulatorische Prozesse ihr Adhäsions- und Akkumulationsverhalten abstimmen [Vuong 2003, S. 707; Zimmerli 2004, S. 1645f; Geipel 2004, S. 1415]. Mit zunehmender Persistenzdauer einer Kolonie lösen sich Bakterien aus dem Biofilm ab, um dann in planktonischer Form das klinische Bild einer Infektion hervorzurufen [Widmer 2001, S. S95]. Gegen diese Bakterien und die durch sie verursachten Symptome kann oft kurzfristig durch Antibiotikagabe ein Erfolg erzielt werden, die im Biofilm verankerte oberflächenadhärente Infektionsquelle bleibt jedoch unberührt [Costerton 1999, S. 1319; Widmer 2001, S. S95].



**Abbildung 3:** links - Biofilmbildung und Schutz der Bakterien vor Immunabwehr und Antibiotika, nach Gristina [aus Gollwitzer 2003a, S. S348]; rechts – Biofilmbildender *Staphylococcus epidermidis* RP62a auf einer Titanoberfläche [aus Gollwitzer 2004]

Unmittelbar um das Implantat herum kommt es schließlich zur Ausbildung einer entzündlich-nekrotischen Zone, der „*immuno-incompetent, fibro-inflammatory zone*“, innerhalb der Bakterien ein für ihre Proliferation optimiertes Mikroklima mit essentiellen Substraten vorfinden [Gristina 1994, S. 115]. Körpereigene Zellen können diese Schicht nicht durchdringen und werden an der Adhäsion auf der Implantatoberfläche gehindert. Davon sind auch phagozytierende Zellen und opsonisierende Partikel betroffen, was die Situation weiter verschlechtert; die Immunantwort erschöpft sich und wird ineffizient [Stocks 2000, S. S44]. Die weitgehend avitale und daher besonders vulnerable Knochen- und Knorpelmatrix,

zusätzlich durch das Trauma der Operation geschwächt, stellt einen optimalen Nährboden für die Bakterien dar [Gristina 1991, S. 364; Gristina 1993, S. 756]. Osteolysen und Implantatlockerung sind die Folgen. Meist kann die Infektion nur durch die Entfernung des Implantats beherrschbar gemacht werden [Gristina 1991, S. 363].

Komplizierend wirkt sich zudem die wachsende Zahl multiresistenter Bakterienstämme aus, die gefürchtete Herausforderungen in der Klinik darstellen und in den letzten 10 Jahren stark an Bedeutung gewonnen haben [Kilgus 2002, S. 117]. So lag die Prävalenz für methicillinresistente *S. aureus*- bzw. *S. epidermidis*-Stämme (MRSA bzw. MRSE) auf Intensivstationen 1999 bei bis zu 46,7 bzw. 85,7 % [Garvin 1999, S. 112]. Im Falle einer durch derartige Erreger verursachten Infektion verschlechtern sich die Aussichten auf den Erhalt des Implantats, wie auch auf Erfolg der Revisionsoperation, dramatisch [Kilgus 2002, S. 122].

#### **1.3.4 Bedeutung der Biokompatibilität des Implantats**

Die Anwesenheit eines körperfremden, avitalen und damit besonders infektgefährdeten Materials alleine genügt, um die notwendige minimale Menge an Bakterien zur Auslösung einer Infektion herabzusetzen [Elek 1957, S. 582; Gristina 1994, S. 107]. Ein Mikrozirkulationssystem, das essentiell für eine effektive Immunabwehr wie auch eine erfolgreiche antibiotische Therapie wäre, bildet sich in der unmittelbaren Umgebung des Implantats nicht aus [Zimmerli 2004, S. 1646]. Dies gilt, wenn auch in abgeschwächter Form, für Biomaterialien, die - ihrer möglichst inerten und atoxischen Zusammensetzung zum Trotz und in Abwesenheit von Bakterien - ebenfalls inflammatorische Reaktionen anzuregen vermögen [Tang 1995, S. 466]. Eingebrachte Biomaterialien führen aufgrund „frustranter Phagozytose“ zu einer Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten auf der Oberfläche des nicht phagozytierbaren Fremdkörpers. Daraus resultieren neben einer veränderten T-Zell-Reaktion, eine verminderte Makrophagen-, Lymphozyten-, Granulozyten- und Komplementaktivität die eine lokale Immundefizienz bedingen und zu einer Schwächung der notwendigen Zweitantwort gegen ebenfalls eintretende Mikroorganismen führen [Zimmerli 2004, S. 1646; Geipel 2004, S. 1413]. Je geringer die Biokompatibilität des Biomaterials ist, desto höher ist die periimplantäre Immundefizienz und somit die Gefahr, dass körpereigene Zellen das entscheidende „*race for the surface*“ verlieren. Zudem können durch die kontinuierliche Präsenz des körperfremden Materials ursprünglich niedrigvirulente Keime, wie etwa der auf der menschlichen Haut als Kommensale lebende *S. epidermidis*, ihren

Phänotyp ändern und bedeutendes pathogenes Potential erlangen [Gristina 1987, S 1589; 1991, S. 364].

*Nur die Kombination aus hoher Biokompatibilität und hoher Antiinfektiosität stellt daher einen wirklich sinnvollen materialwissenschaftlichen Ansatz zur Prävention implantatassoziiertes Infektionen dar.* Es muss also versucht werden, auf zellulärer Ebene den Ausgang des „race for the surface“ dahingehend zu beeinflussen, dass die Immunreaktion des Empfängers gegen den Fremdkörper normalisiert und die Tendenz zur Ausbildung von „fibro-inflammatory zones“ und bakterieller Besiedlung eliminiert wird [Gristina 1994, S. 116]. Tests zur Bestimmung der Biokompatibilität sind daher unerlässlich, um die Qualität derartiger Materialien zuverlässig bestimmen zu können.

#### **1.4 Entwicklung einer biokompatiblen und antiinfektiösen Endoprothesenbeschichtung auf TiO<sub>2</sub>-Basis mit antibakterieller Wirkkomponente durch Integration von Kupferionen**

Schon lange wird an unterschiedlichen Strategien zur antibakteriellen Modifikation von Implantatoberflächen geforscht. Zwei Oberflächeneigenschaften sind dabei ins besondere Blickfeld gerückt und erweisen sich in der klinischen Erprobung als zunehmend erfolgreich. Eine Komponente ist die antiadhäsive Modifikation einer Oberfläche, eine andere die antiinfektiöse, mit integrierten antibakteriellen Wirkstoffen wie Antibiotika, Antiseptika oder Schwermetallionen [Olsson 1992, Darouiche 1999, Pascual 2002, Hanna 2003, Gollwitzer 2003a/b]. Im Idealfall können beide Eigenschaften miteinander kombiniert werden.

Ausgangsmaterial der in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenbeschichtungen ist Titan-Aluminium-Vanadium (TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>). Seit vielen Jahren findet es als Werkstoff in der Medizin, speziell in der Endoprothetik, Verwendung. Neben den guten physikalischen und mechanischen Eigenschaften, spielt besonders die hohe Biokompatibilität des Metalls eine herausragende Rolle. Der für das verbesserte Anwachsverhalten von Zellen entscheidende Schritt ist dabei die Passivierung der Metalloberfläche mit einer Titanoxidschicht. Zur Erhöhung der positiven Wirkung dieser Schicht erscheint die Sol-Gel-Methode als in hohem Maße zielführend, mit deren Hilfe Titanoxidbeschichtungen auf unterschiedliche Materialien durch ein standardisiertes Tauchverfahren aufgebracht werden können [Heidenau 2001, S. 19]. Die Passivierung findet auf diese Weise nicht erst im Organismus des Implantatempfängers statt, die Oxidschicht ist dicker und die zu erwartende Biokompatibilität

höher [Advincula 2006, S. 2202]. Der Einfluss des Biomaterials auf die Immunantwort des Organismus soll durch die Oberflächenbeschichtung so gering wie möglich gehalten werden.

Integriert man nun noch Kupferionen auf molekularer Basis, deren antibakterielle Wirkung ebenso wie die von Silberionen seit längerem bekannt ist [Ahearn 1995; Gabriel 1996; Schierholz 1998; Carbon 1999; Kielemoes 2001; Olson 2002; Mulligan 2003; Gauger 2003; Suska 2001, 2003, 2005a/b], lässt sich zusätzlich eine antibakterielle Wirkkomponente installieren, wie Wachstumstests mit *S. aureus* und *S. epidermidis* zeigen konnten [Heidenau 2005, S. 886]. Durch mehrmaliges Eintauchen in das Sol-Gel können beliebig viele Schichten übereinander aufgebracht werden. Die Freisetzung der Ionen erfolgt auch aus den tieferen Schichten und ist nach wenigen Tagen abgeschlossen. Mit Hilfe von Wachstumsinhibitionstests und des WST-1 Assays, durchgeführt an Mausfibroblasten L929, konnte zudem bewiesen werden, dass die Biokompatibilität der Beschichtung trotz Integration bakterizider Mengen an Kupferionen auf einem hohen Niveau erhalten bleibt [Heidenau 2005, S. 888; Gollwitzer, 2003c].

Ausgehend von der Erkenntnis, dass eine dauerhafte Implantation eines Biomaterials gleichermaßen von Biokompatibilität und Antiinfektiosität determiniert wird, soll die klinische Komplikationsrate mit Hilfe einer möglichst idealen Oberflächenbeschichtung vermindert werden.

## **1.5 Biokompatibilität und Apoptose**

Die Quantifizierung und Differenzierung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen im Rahmen von Biokompatibilitätstests gehört heute in vielen materialwissenschaftlichen Labors zum Standard [Filippini 2001, S. 340; Postiglione 2003, S. 692; Suska 2005a, S. 519; Suska 2005b, S. 5942]. Verschiedenste Detektionssysteme stehen hierbei zur Verfügung. Gerade zur Untersuchung von Endoprothesenoberflächenbeschichtungen erfährt die Differenzierung apoptotischer und nekrotischer Zellen essentielle Bedeutung: Wird durch die Implantatoberfläche überwiegend der nekrotische Zelltod induziert, schließt sich *in vivo* in der Regel eine inflammatorische Reaktion des Empfängergewebes an. Apoptotische Zellen hingegen werden ohne eine solche Reaktion kontrolliert abgebaut. Überdies gibt es Hinweise darauf, dass die bevorzugte Art der Degradation von Zellen in Anwesenheit von Titan apoptotisch verläuft und dass zelluläre Apoptose im Rahmen der sterilen Reaktion des Empfängergewebes auf das eingebrachte Biomaterial induziert wird (siehe 1.3.4) [Matsunaga 2001, S. 317; Geipel 2004, S. 1413]. Diese Unterscheidung und Quantifizierung nekrotischer

und apoptotischer periimplantärer Zellen soll eine bessere Vorhersage über das klinische Schicksal des Biomaterials nach dessen Implantation erlauben.

Wurden bis vor kurzer Zeit Apoptose und Nekrose als zwei prinzipiell getrennt voneinander verlaufende Wege betrachtet, mehren sich die Hinweise darauf, dass die angenommenen Unterschiede zwischen beiden Phänomenen weit weniger gravierend sind als bisher angenommen. Vielmehr stellt man sich beide Wege als Extreme eines Kontinuums vor, dessen Gewicht, abhängig von Ausgangssituation und Auslöser, mehr zur einen oder zur anderen Form des Zelluntergangs neigt [Collatz 1998, S.1; Lecoeur 2001, S. 72].

Bei der Nekrose handelt es sich um einen Prozess, bei dem ganze Zellverbände durch starke pathogene Stimuli wie Hyperthermie, Hypoxie, mechanische Verletzungen, aber auch durch Komplement oder Viren irreversibel geschädigt werden. Der Zelle gelingt es nicht mehr homöostatische Bedingungen aufrechtzuerhalten, Einstrom von Wasser und Ionen führt zum Zellhydrops und letztlich zur Ruptur der Zellmembran.

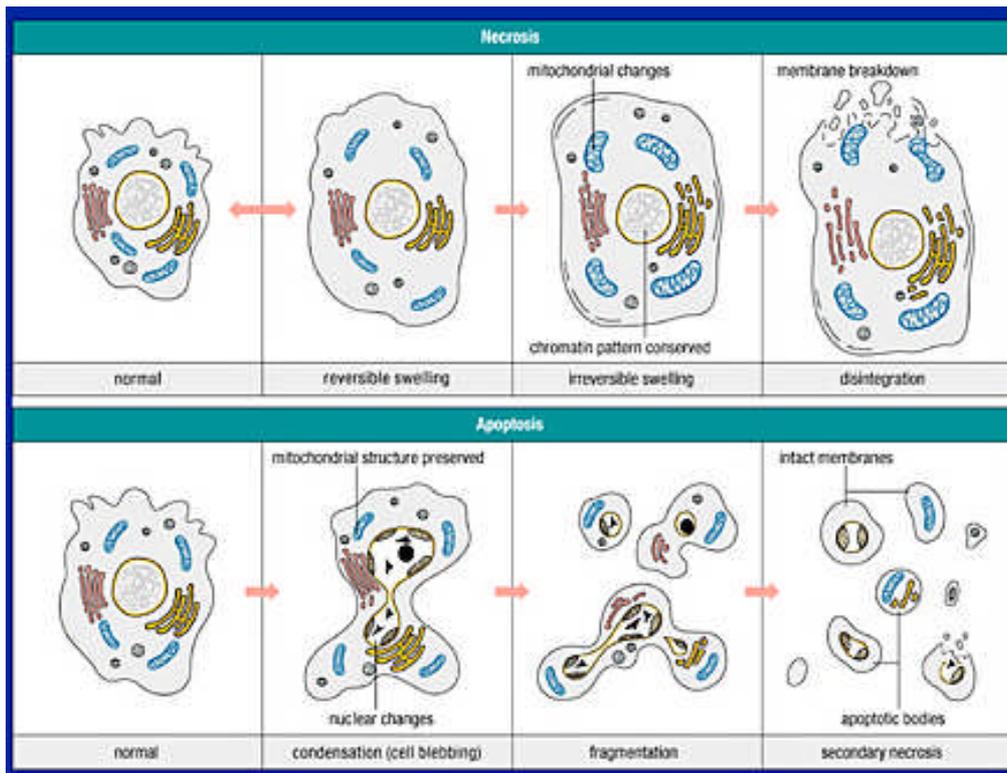
Im Gegensatz dazu vollzieht sich die Apoptose, der „programmierte Zelltod“, auch unter physiologischen Bedingungen. Die betroffenen Zellen sind sogar aktiv, u. a. durch Bereitstellung von Energie, an ihrem Absterben beteiligt („*cellular suicide*“) [Roche, S. 3]. Der Sinn des apoptotischen Zelltodes liegt in seiner wichtigen Funktion als Bewahrer der Zellhomöostase, des stabilen Verhältnisses von Proliferation und Absterben von Zellen.

Viele unterschiedliche Signalwege der Aktivierung des apoptotischen Programms sind mittlerweile bekannt. Neben diversen Mechanismen der externen Zellschädigung wie Hypoxie, Sauerstoffradikalen, Toxinen, Cytotoxinen, Schwermetallen und Bestrahlung, kann die Induktion der Apoptose auch durch Bindung endogener Faktoren wie dem Fas-Liganden, CD95-Liganden oder TNF- $\alpha$  an spezifische Rezeptoren der Zelle erfolgen. Umgekehrt kann Zellen durch Verlust von Tumorsuppressorgenen wie p53 oder BRCA2 der Eintritt in den apoptotischen Zelltod verwehrt werden.

Die von allen Stimuli der Induktionsphase initiierte Exekutionsphase beginnt wahrscheinlich mit der Aktivierung einer Kaskade von Caspasen, einer Reihe von Proteasen (Cysteinylaspartat-spezifische-Proteasen), die das apoptotische Programm ausführen, indem sie die Spaltung diverser Zellproteine und der DNA an charakteristischen Stellen einleiten. Wichtige Mechanismen in diesem Zusammenhang sind die Hemmung von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), einem DNA-Reparaturenzym oder SAF-A (scaffold attachment factor), der für die Aufrechterhaltung der Chromatinintegrität im Nukleus eine tragende Rolle spielt [Collatz 1998, S. 4; Hammill 1999, S. 16].

Ein weiterer wichtiger Ort der apoptotischen Signaltransduktion sind die Mitochondrien. Möglicherweise simultan zur Aktivierung der Caspasen und unabhängig von der Art der Apoptoseauslösung kommt es durch Öffnung eines durch bcl-2 regulierten Porenkomplexes zur Freisetzung von Cytochrom-C ins Zytoplasma und einer unmittelbar folgenden Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran. Dies führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials und damit zu einer Entkoppelung der Atmungskette mit Abbruch der ATP-Produktion. Ins Zytoplasma gelangtes Cytochrom-C aktiviert seinerseits pro-apoptotisch wirkende Caspasen im Sinne eines sich selbst verstärkenden Prozesses [Hamill 1999, S. 16]. Ein weiteres mitochondriales Protein, AIF (apoptoseinduzierender Faktor) wirkt direkt proteolytisch und pro-apoptotisch [Collatz 1998, S. 4; Roche, S. 5].

Apoptotische Zellen zeigen charakteristische biochemische und morphologische Merkmale, die sich – in Abhängigkeit vom grundlegenden Stimulus - teils gleichzeitig, teils in unterschiedlicher Reihenfolge entwickeln (s. Abb. 4). Zunächst löst sich die betroffene Zelle aus dem Zellverband. Sie beginnt zu schrumpfen und verändert ihre Oberflächenmorphologie. Mehr und mehr zytoplasmahaltige Vesikel stülpen sich aus und werden schließlich abgeschnürt. Die bei diesem „*membrane blebbing*“ entstandenen „*apoptotic bodies*“ werden *in vivo* dem phagozytotischen Abbau durch Makrophagen oder benachbarter Zellen zugeführt, der ohne inflammatorische Begleitreaktion abläuft [Roche, S. 3]. *In vitro* kommt es stattdessen zum Hydrops und schließlich zur Lyse der Zellen, was mit dem Terminus „sekundäre Nekrose“ bezeichnet wird. Ebenso wie das Zytoplasma, schrumpft auch der Nukleus, begleitet von einer Kondensation des Chromatins an der Kernmembran. Die Degradation verschiedener Zytoskelettproteine führt zu massiven weiteren Strukturveränderungen in der Zelle [van Engeland 1997, S. 421f]. Die Funktion der einzelnen Zellorganellen bleibt jedoch intakt und die metabolische Aktivität der Zelle lange Zeit erhalten.



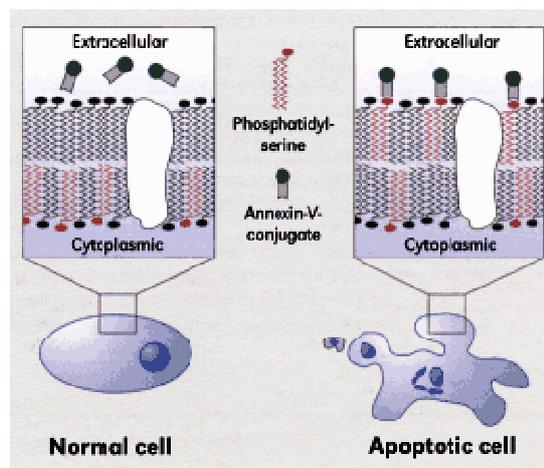
**Abbildung 4:** Zytomorphologischer Vergleich von Apoptose und Nekrose

(entnommen aus: [http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/scientific\\_information](http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/scientific_information))

Auch die Zusammensetzung der Zytoplasmamembran verändert sich: Bestandteile wie Phosphatidylserin (PS) werden bereits in der Frühphase der Apoptose von der zytoplasmatischen Seite auf die Außenseite der Membran transloziert und dienen als Markierung für Makrophagen [Fadok 1992, S. 2207]. Ursache dürfte hierbei ein Zusammenbruch der Flippaseaktivität sein, eines Enzyms, das durch permanenten Transport von Phosphatidylserin von der Außen- auf die Innenseite der Membran die Membranasymmetrie aufrechterhält [Zachowski 1989, S. 75; Daleke 2003, S. 233].

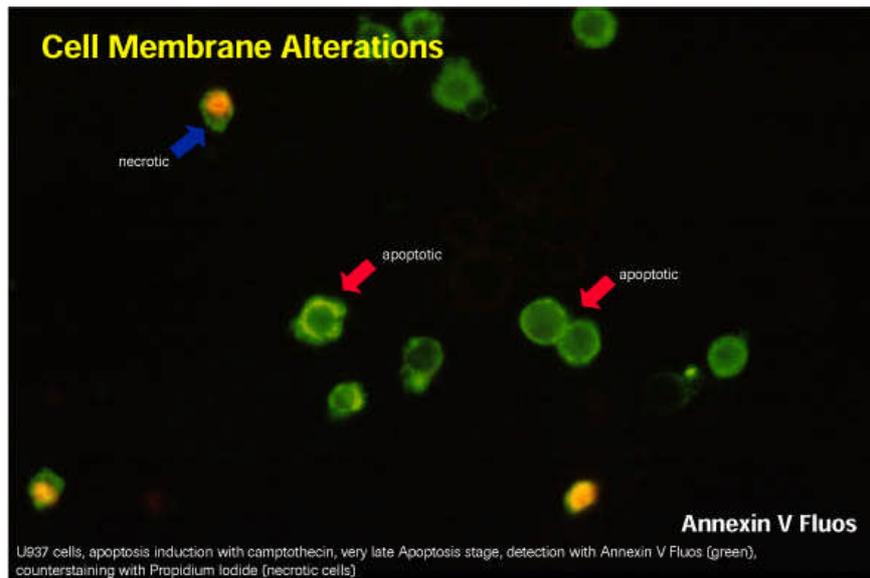
Im Nukleus vollzieht sich - teilweise in frühapoptotischen Phasen - die irreversible Degradation der genomischen DNA in kürzere Fragmente. Verantwortlich für diesen Abbau sind  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonukleasen, die die DNA innerhalb der sog. „*linker DNA*“, d.h. internukleosomal, in Fragmente von 180 Basenpaaren oder einem Vielfachen dessen, zerschneiden. Meist bildet sich eine charakteristische Leiterstruktur, die sich elektrophoretisch nachweisen lässt. Entstandene Einzelstrangbrüche werden als „*nicks*“ bezeichnet [Roche, S. 5 u. 9]. Hinzuzufügen ist, dass die Reihenfolge der beschriebenen Schritte sowohl vom Zelltyp als auch vom auslösenden Apoptosestimulus abhängig ist [Micoud 2001, S.111].

Das Prinzip, welches dem von uns verwendeten durchflusszytometrischen Test zur Detektion apoptotischer Zellen zu Grunde liegt, macht sich die Translokation des - bei vitalen Zellen an der zytoplasmatischen Zellmembranseite befindlichen - negativ geladenen Phosphatidylserins an die externe Seite der Zellmembran zunutze (s. Abb. 5). Makrophagen erkennen Phosphatidylserin und phagozytieren die apoptotischen Zellen bei dessen Präsentation in der äußeren Schicht der Membran [Fadok 1992, S. 2207]. In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  vermag (fluoresceinmarkiertes) Annexin-V bevorzugt an Phosphatidylserin zu binden, wohingegen kaum eine Affinität zu Phospholipiden, die wie Sphingomyelin oder Phosphatidylcholin, kontinuierlich an der Außenseite der Zellmembran präsentiert werden, besteht.



**Abbildung 5:** Translokation von Phosphatidylserin während der Apoptose  
(entnommen aus: [http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/scientific\\_information](http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/scientific_information))

Bleibt die Membran der rein apoptotischen Zelle anfangs, zum Zeitpunkt der eben beschriebenen Phosphatidylserintranslokation, noch intakt, so verliert sie im Stadium der sekundären Nekrose ihre Integrität und wird permeabel. Farbstoffe wie Propidiumjodid können nun in die Zelle eindringen und Nukleosomen im Kern bzw. bereits aus dem Kern freigesetzte DNA anfärben. Ist die Zellmembran perforiert, gelangt auch Annexin-V ins Zytoplasma und kann Phosphatidylserin auf der internen Membranseite markieren. Vermes et al. entwickelten einen auf diesen Erkenntnissen basierenden Ausschlusstest, wobei tote Zellen mittels Propidiumjodidgegenfärbung von apoptotischen Zellen unterschieden werden können. Apoptotische Zellen färben sich lediglich Annexin-V-positiv, nekrotische Zellen hingegen Annexin-V und Propidiumjodid-positiv. Vitale Zellen bleiben ungefärbt [Vermes 1995, S. 49]. Werden PI und Fluorescein mit Licht entsprechender Wellenlänge angeregt, kann das von den markierten Zellen emittierte Licht z. B. im FACS gemessen und ausgewertet werden (Abb. 6).

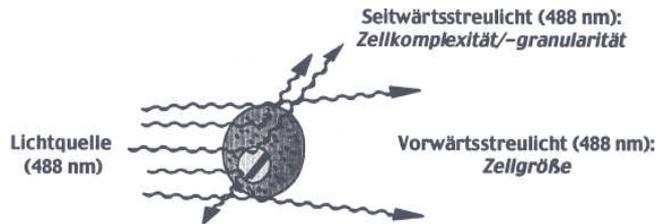


**Abbildung 6:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme apoptotischer und nekrotischer U937 Zellen (humanes histiocytäres Lymphom) nach AnV/PI Doppelfärbung. (entnommen aus: [http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/scientific\\_information](http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/scientific_information))

## 1.6 Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

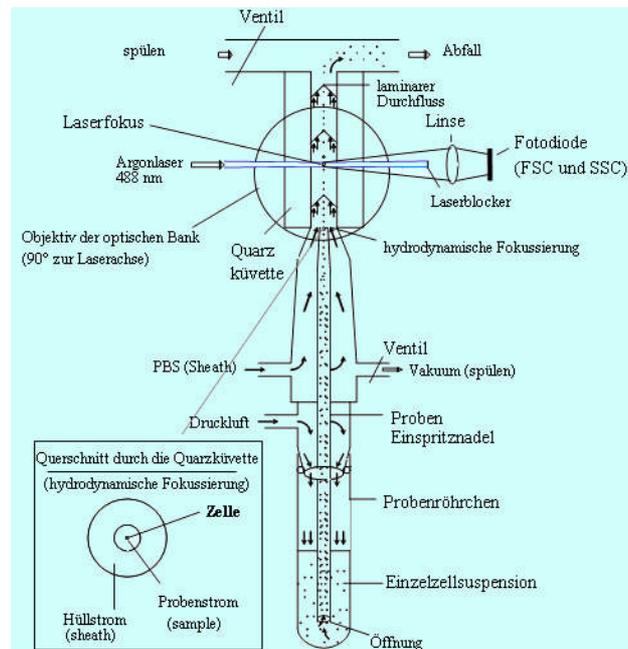
Das FACS misst im Wesentlichen optische Signale unterschiedlicher Qualität wie Fluoreszenz und Lichtstreuung. Diese Signale entstehen durch Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen oder autofluoreszierenden Partikeln durch eine Lichtquelle, in der Regel einem Laserstrahl, dessen Emissionsspektrum im Absorptionbereich des verwendeten Markers liegt. Die Fluorochrome werden angeregt und emittieren Licht eines für sie charakteristischen Wellenlängenspektrums, das mit Hilfe von Bandpassfiltern verschiedener optischer Detektoren (Photodioden) erfasst werden kann. Je nachdem, welche Zellkomponente durch den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff markiert wird, können Informationen über die verschiedensten Zellbestandteile und –funktionen gewonnen werden.

Es ist aber nicht nur die Wellenlänge des Lichts, die sich im FACS analysieren lässt. Auch aus der Messung des eingefangenen Streulichts lassen sich wichtige Informationen gewinnen. Dabei wird zwischen Vorwärtstreulicht (FSC: forward scatter) und Seitwärtstreulicht (SSC: sideward scatter) unterschieden (s. Abb. 7). FSC ist das durchflusszytometrische Korrelat zur Querschnittsfläche der Zellen und liefert Informationen über die Zellgröße. SSC entspricht dem Refraktionsindex und gibt über Granularität, Membranfaltung, innere Komplexität und äußere Form einer Zelle Aufschluss.



**Abbildung 7:** Entstehung von SS und FCSC im FACS  
[aus Becton Dickinson 1999, S. 2]

Um Zellen im FACS einzeln messen zu können, wird die Zellsuspension hydrodynamisch zu einem Strahl fokussiert, damit die Zellen den Messpunkt, den Ort an dem sie vom Lichtstrahl getroffen werden, „perlschnurartig“ passieren können. Das erzeugte Signal wird umgewandelt, verstärkt, digitalisiert und in Form von Histogrammen oder sog. Dotplots, im Sinne einer korrelierten Zweiparameterdarstellung, sichtbar gemacht. Je nach Streubreite der Signale der untersuchten Zellen kann zwischen einer linearen und einer logarithmischen Darstellung der Ergebnisse gewählt werden. Um die interessierenden Zellen von Zelltrümmern, unbekannten Partikeln, Zellkonglomeraten und anderen Zellarten abzugrenzen, können Auswertefenster definiert werden („gating“). Schließlich lassen sich die Ergebnisse statistisch auswerten. Eine optionale Zusatzfunktion besteht zudem in der Sortierung unterschiedlicher Zellen nach definierbaren Auswahlkriterien. Innerhalb kürzester Zeit kann eine Vielzahl einzelner Zellen untersucht und im Hinblick auf spezifische Fragestellungen analysiert werden.



**Abbildung 8:** Bauprinzip eines FACS (modifiziert nach: [www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp](http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp))

## 1.7 Aufgabenstellung

Die Notwendigkeit zur Verbesserung von Endoprothesenoberflächen wurde durch die Erläuterung der Problematik implantatassoziiertes Infektionen verdeutlicht. Dabei kommt der Tatsache, dass die meisten dieser Infektionen durch Keime ausgelöst werden, die bereits zum Zeitpunkt der Operation auf das Implantat gelangen, immense Bedeutung zu. Ein enormer Fortschritt wäre es daher, Endoprothesenoberflächen so modifizieren zu können, dass sie für Mikroorganismen nicht, oder nur in unerheblichem Maße kolonisierbar sind.

Zwei Wege stehen zur Prävention solcher Komplikationen im Vordergrund. Zum einen extrakorporal *prae implantationem*, durch die Optimierung und Neuentwicklung verschiedener Techniken der Implantatsterilisation und die Schaffung absolut steriler Operationsbedingungen. Zum anderen intrakorporal und über einen längeren Zeitraum wirksam, durch die Modifikation des Implantates im Sinne einer antibakteriellen und für Bakterien antiadhäsiven Oberflächenbeschichtung.

Eine derartige Beschichtung muss dabei drei entscheidenden Kriterien genügen: Neben der mechanischen Stabilität muss sie eine antibakterielle mit einer in hohem Maße biokompatiblen Komponente vereinigen. Für die Bakterizidie ist wichtig, dass sie besonders unmittelbar *post implantationem* ihre Wirkung entfaltet, da in dieser Phase das über den weiteren Verlauf entscheidende „*race for the surface*“ stattfindet, das die Bakterien unter keinen Umständen für sich entscheiden dürfen [Gristina 1988, S. 873; 1991, S. 368; 1994, S. 107]. Wichtig ist außerdem zu wissen, dass die Bakterien nicht nur unmittelbar dem Implantat anhaften, sondern auch ins umgebende Gewebe einwandern können. Die antibakterielle Wirkung der Implantatoberfläche sollte sich also auch auf die unmittelbare Umgebung erstrecken. Angesichts des immer weiter zunehmenden Anteils multiresistenter Keime bei Infektionen aller Art, scheint es zudem sinnvoll, nach Alternativen zu Antibiotika im Bereich der antimikrobiellen Therapie zu suchen. Die Biokompatibilität muss hingegen immer gewährleistet sein. Schließlich sind gerade orthopädische Endoprothesen darauf ausgerichtet, über lange Zeiträume im Körper eines Patienten zu verbleiben.

Zusammengefasst lässt sich die ideale Beschichtung einer Endoprothese wie folgt charakterisieren: Bei absoluter Biokompatibilität und mechanischer Stabilität werden für eine bestimmte Zeit nach der Implantation bakterizide Stoffe in einem Umfang freigesetzt, die das Risiko einer implantatassoziierten Infektion minimieren.

In den bisher durchgeführten Screeningverfahren (Wachstumshemmungstests und WST-1 Assay) zeigte die neu entwickelte biokompatible und antibakterielle Kupfer-Titanoxidbeschichtung eine gute Biokompatibilität. Einschränkungen dabei sind jedoch die

relativ geringe Sensitivität der durchgeführten Assays und die eingeschränkte Aussagekraft über den weiteren Verlauf der zellulären Besiedelung. Wachstumstests liefern lediglich grobe Momentaufnahmen von Oberflächenbesiedelung und Zellzahl (lebend vs. tot). Apoptose-/Nekroseuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie erlauben hingegen wesentlich genauere und detailliertere Aussagen über die Veränderungen von Morphologie und Vitalität der Zellen und stellen somit ein deutlich sensitiveres Verfahren mit prognostischer Wertigkeit für den weiteren Verlauf der Oberflächenbesiedelung und mögliche chronische periimplantäre Entzündungsreaktionen *in vivo* dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen durchflusszytometrisch gestützten Apoptoseassay als Zytokompatibilitätstest für Biomaterialien zu etablieren und zu validieren. Als Basis diente hierbei der von van Engeland et al. beschriebene AnnexinV-Propidiumjodid-Apoptoseassay [van Engeland 1996, S. 131]. Nach der Testvalidierung anhand von Untersuchungen zum Apoptoseablauf an gut charakterisierten Saos-2-Zellen (Einleitung der Apoptose mit Camptothecin), sollte der Assay praktisch im Rahmen von Zytokompatibilitätsuntersuchungen unterschiedlich stark antibakteriell beschichteter Endoprothesenoberflächen angewendet werden. Die verschiedenen Beschichtungen sollten dabei zum einen direkt miteinander verglichen werden, zum anderen sollten Aufschlüsse über den zeitlichen Ablauf von Apoptose und Nekrose gewonnen werden.

Dies ist die erste Arbeit, in der ein durchflusszytometrischer AnV/PI-Apoptosetest zur Zytokompatibilitätsuntersuchung von Biomaterialien etabliert und untersucht wurde.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zellen**

Saos-2:

Bezogen über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,  
Braunschweig

DSMZ No. ACC 243

Gut charakterisierte, adhärenz, monolayerbildende, humane Osteosarkomzellen;  
Verdopplungszeit ca. 43 h. [Ahmad 1999a/b; Hausser 2005; Li 2006]

#### **2.1.2 Zellkultur**

- Kulturmedium (DMEM):

Dulbecco's MEM (1x) Cat.No. F0425, Fa. Biochrom AG, Berlin  
+ 5% FCS und 1% Glutamin

- FCS (fetales calvines Serum):

Cat. No. S0115 tested for mycoplasma, Fa. Biochrom AG, Berlin  
Fetales Kälberserum als Wachstumsfaktorzusatz

Zugabe von je 25ml pro 500ml DMEM (entspricht 5%).

- L-Glutamin:

200mM Cat. No. K0283, Fa. Biochrom AG, Berlin

Zugabe von je 5ml pro 500ml DMEM (entspricht 1%)

- PBS (phosphate buffered saline / Phosphatpuffer):

PBS Dulbecco ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7,4

Fa. Biochrom AG, Berlin

- Splittinglösung zur Zellkultivierung:

Trypsin-EDTA (1x) IN, Fa. Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe

HBSS W/O CA & MG W/EDTA 4NA

(Hanks balanced salt solution ohne Calcium und Magnesium, mit EDTA und 4 Natrium)

- Camptothecin:

Cat. No. C-9911 25mg, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim

Camptothecin 1mg/ml in DMSO

Topoisomerase-I-Inhibitor zur standardisierten Apoptoseeinleitung; eingesetzt zur  
Validierung der Ergebnisse und zur FACS-Einstellung.

- Zellkulturflaschen:

Polystyren Zellkulturflaschen (250ml, 75cm<sup>2</sup>), 0,2µm Vented Blue Plug Seal Cap

Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

- Kulturwells:

Multiwell™ 12 Well aus Polystyren, Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

Multiwell™ 24 Well aus Polystyren, Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

### **2.1.3 Farbstoffe**

- Annexin-V-Fluorescein:

Annexin-V-FLUOS, Cat. No. 1 828 681, Fa. Roche, Penzberg

Fluoresceinmarkiertes Annexin-V ist ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin zur unspezifischen Markierung apoptotischer und nekrotischer Zellen. Bei Licht der Wellenlänge 488nm zeigt der Farbstoff seine maximale Fluoreszenz (Emissionswellenlänge 518nm).

Eingesetzt wurden i. d. R. 10µl Farbstoff pro 2ml DMEM und ca. 200.000 Zellen.

- Propidiumjodid:

Propidium Iodide P4170 10mg 1mg/ml Minimum 95% (HPLC), 1:20 verdünnt in DMEM, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

Propidiumjodid ist ein spezifischer Nekroseindikator, der an Nukleinsäuren im Zellkern bindet. Voraussetzung hierfür ist eine perforierte Zellmembran. Das Fluoreszenzmaximum wird durch Licht mit der Wellenlänge 488–540nm erreicht. Die Emissionswellenlänge beträgt 617nm.

Eingesetzt wurden 10µl Farbstoff pro 2ml DMEM und ca. 200.000 Zellen.

- 7-AAD (7-amino-actinomycin D)

eBioscience 7-AAD Viability Staining Solution, Cat. No. 00-6993

Fa. eBioscience, San Diego, CA, USA

Wie Propidiumjodid färbt 7-AAD Nukleosomen im Zellkern an und ist somit ein spezifischer Nekrosefarbstoff. Ein Unterschied besteht in der Emissionswellenlänge (650nm).

- Trypanblau

0,5% (w/v) in physiologischer Lösung, Cat. No. L6323, Fa. Biochrom AG, Berlin

Trypanblau diente als einfacher Vitalitätsmarker: Der Farbstoff kann nur bei defekter Zellmembran in Zellen eindringen und färbt nekrotische Zellen an.

#### **2.1.4 FACS**

Zur Untersuchung der Zellen im FACS wurde, wenn nicht gesondert darauf hingewiesen, das bereits zur Kultivierung der Zellen benutzte  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige DMEM (1x) + 5% FCS + 1% Glutamin verwendet.

- Inkubationspuffer

Aus dem Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Cat. No.1 988 549, Fa. Roche, Penzberg

Der Inkubationspuffer bietet gegenüber DMEM als FACS-Medium keine Vorteile und wurde nur als Vergleichsmedium in einigen Voruntersuchungen verwendet.

- Falconröhrchen

15ml Polypropylen Conical Tube Blue Max™Jr

Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

- FACS-Röhrchen

5ml Polystyren Round Bottom Tubes

Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

- Accutase™

Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Mischung kollagenolytischer Enzyme mit hoher Aktivität gegen verschiedene Kollagentypen zur Ablösung adhärenter Zellen. Zusätzlicher Bestandteil: 0.5mM EDTA.

- AccuMax™

Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Alternativprodukt zu Accutase™ ohne EDTA, aber mit dreifachem Enzymgehalt.

- Trypsin-EDTA

Trypsin-EDTA (1x) IN, Fa. Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe

HBSS W/O CA & MG W/EDTA 4NA

(Hanks balanced salt solution ohne Calcium und Magnesium, mit EDTA und 4 Natrium)

#### **2.1.5 Geräte**

- FACS:

FACS Calibur, Fa. Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

Software: BD CellQuest™ Pro, Version 4.0.2, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

Die Messgeschwindigkeit lag zwischen 15 und 200 counts/s, gemessen wurden jeweils 10.000 Zellen.

Messkanäle: FL1: 515-545nm      FL2: 563-607nm      FL3: 550-770nm

- Inkubator:

Function Line, Fa. Heraeus Instruments, Langenselbold

Inkubiert wurde – wenn nicht anders angegeben – bei 37 ° C und 5 % CO<sub>2</sub>.

- Mikroskop:

Zeiss Axiovert 25, Fa. Carl Zeiss, Jena

- Sterilbank:

Hera safe, Fa. Heraeus Instruments, Langenselbold

- UV-Sterilisator:

FLX-20.M, Fa. Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich

- Zellschaber:

Zellschaber 25cm, Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen

- Zentrifugen:

SIGMA 4K15 (FACS-Labor), Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode a. Harz

Rotor-Nr. 11156, 1000rpm=203g

Eppendorf Centrifuge 5804 R (Zellkulturlabor), Fa. Eppendorf, Hamburg

Rotor-Nr. A-4-44; 1000rpm =180g

### **2.1.6 Metallplättchen**

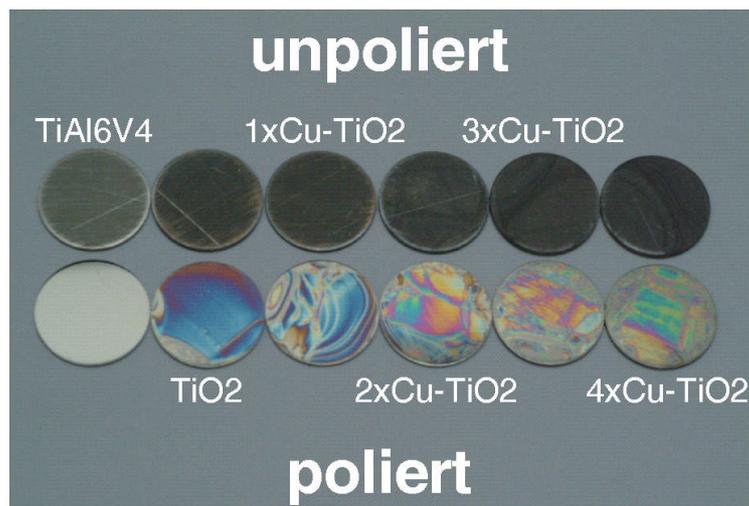
Die Beschichtungstechnologie wurde am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien der Universität Bayreuth entwickelt, das uns freundlicherweise die zu untersuchenden Implantatmaterialien zur Verfügung stellte. Verwendet wurden runde Plättchen aus TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> mit einem Durchmesser von 14,5 mm und einer Dicke von 1,5 mm (Fa. Goodfellow GmbH, Nauheim). Der Durchmesser entsprach damit dem eines 24er Wells.

Vor dem Beschichten wurden die Plättchen für zwei Minuten in Ethanol ultraschallgereinigt und mit Cyclohexan und Aceton getrocknet. Anschließend wurden die Xerogelschichten (Titandioxid als reines Anatas) aufgebracht. Als Standardsol für die Herstellung der Xerogelschicht diente ein Gemisch aus Tetrabutoxytitanat und n-Butanol, in das auch die Kupferionen in Form von Kupfer-(II)-Acetat Monohydrat (Fa. Merck, Darmstadt) in molekularer Form eingearbeitet werden konnten. Durch Eintauchen der Plättchen in das Sol erfolgte das Aufbringen der Schichten unter standardisierten Bedingungen. Die Hydrolyse des Lösungsmittels in Verbindung mit der Gelbildung erfolgte bei 40% Luftfeuchtigkeit und 25°C. Nach Trocknen bei Raumtemperatur für eine Stunde, wurden die Plättchen bei 500°C kalziniert. Höhere Konzentrationen an Kupferionen bzw. dickere

Beschichtungen, wurden durch mehrmaliges Eintauchen der Plättchen in das Sol erreicht. Die Schichtdicke eines Monolayers betrug im Mittel 100 nm [Heidenau 2001, S. 19f]. Bevor die Oberflächen mit den Saos-2 Zellen besiedelt werden konnten, wurden die Metallplättchen zur Sterilisation auf beiden Seiten UV-bestrahlt. Folgende Oberflächen und Beschichtungen wurden analysiert:

- $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ : Basislegierung ohne Titandioxidbeschichtung
- $\text{TiO}_2$  (einfache Titandioxidbeschichtung ohne Kupferionen)
- $1\text{xCu-TiO}_2$  (einfache Titandioxidbeschichtung mit Kupferionen)
- $2\text{xCu-TiO}_2$  (zweifache Titandioxidbeschichtung mit Kupferionen)
- $3\text{xCu-TiO}_2$  (dreifache Titandioxidbeschichtung mit Kupferionen)
- $4\text{xCu-TiO}_2$  (vierfache Titandioxidbeschichtung mit Kupferionen)

Als Vergleich wurde der unbedeckte Polystyrenboden der Wells herangezogen. Eine weitere Modifikation der Beschichtungen war durch unterschiedlich starkes Polieren der Grundkörper möglich. Außerdem wurden fehlerhaft aufgebrauchte Schichten untersucht, sodass jede Beschichtung in drei Formen (poliert, unpoliert, fehlerhaft) vorlag.



**Abbildung 9:** obere Reihe: unpolierte  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Plättchen  
untere Reihe: polierte  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Plättchen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Saos-Zellen wurden in  $75\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Als Nährmedium diente DMEM, versetzt mit 5% FCS und 1% Glutamin. Nach Ausbildung einer Monolayerschicht, was durchschnittlich nach 4 Tagen der Fall war, wurden die Zellen wie folgt gesplittet:

Absaugen und Verwerfen des Nährmediums, Spülen mit 4ml PBS und Absaugen. Zweiminütige Inkubation der Zellen mit 4ml Trypsin-EDTA 1x bei 37°C. Inaktivierung der Splittinglösung mit 4ml DMEM, Ablösen der Zellen durch Erschütterung und Absaugen der Zellsuspension bis auf 1ml. Auffüllen der Flaschen mit DMEM auf 10ml.

## **2.2.2 Aussaat der Zellen**

Für die standardisierte Durchführung der Untersuchungen mussten die Zellen gleichmäßig in Einzelwells ausgesät werden. Je nach Untersuchungsschwerpunkt wurden 12er bzw. 24er Wellplatten gewählt. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und somit in Suspension gebracht. Diese Suspension wurde gesammelt und die Zellen wie folgt quantifiziert: Je 10µl wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier Felder ausgezählt. Durch Errechnung des Mittelwerts, Multiplikation mit 10.000 und Multiplikation mit der Gesamtmenge der Suspension in Millilitern ergab sich die Gesamtmenge der geernteten Zellen.

Die Zellen wurden schließlich abzentrifugiert (10min, 20°C, 400g) und mit Medium auf eine Konzentration von 100.000 Zellen/ml resuspendiert. Die Wells wurden mit der gewünschten Zahl Saos-2-Zellen (siehe einzelne Versuche) besiedelt und mit Medium auf 2ml aufgefüllt. Die Platten wurden nun - wenn nicht gesondert darauf hingewiesen wird - für 72h unter den oben genannten Bedingungen bis zur Analyse inkubiert.

## **2.2.3 Apoptoseinduktion**

### **2.2.3.1 Untersuchung des zeitlichen Apoptoseablaufs von Saos-2-Zellen nach Camptothecinexposition**

Zunächst sollte der zeitliche Verlauf der Apoptose an Saos-2-Zellen nach Apoptoseinduktion mit Camptothecin untersucht werden. Nach Aussaat in 12-Well-Platten wurde den Zellen 12h Gelegenheit zur Adhäsion gegeben. Für die fünf Untersuchungszeitpunkte (6, 12, 24, 48 und 96h nach Apoptoseinduktion) wurden je 3 Wells à 50.000 Zellen angesetzt. Davon diente je ein Well der Ermittlung der Grundfluoreszenz, einem wurde je 2µg Camptothecin zugesetzt und eines als Kontrolle nativ belassen. Nach fünfstündiger Einwirkungszeit wurde in allen Wells das Medium ersetzt. Die Zellen wurden über die angegebenen Versuchszeiten erneut inkubiert und zum geplanten Messzeitpunkt im FACS untersucht. In dieser Testphase wurden die Zellen noch vor dem Ablösen sowohl mit AnV als auch mit PI angefärbt.

### 2.2.3.2 Untersuchung des Apoptoseablaufs in Abhängigkeit von der CamptothecinKonzentration

Angesetzt wurden je 50.000 Zellen/Well (12er) in 6 Wells. Nach 12h Adhärenzzeit wurden in 4 Wells 2, 4, 10 bzw. 20µg Camptothecin zugegeben und für 5h inkubiert. Anschließend wurde das Medium ersetzt und die Zellen weitere 48h inkubiert. Auch hier wurden die Zellen zur folgenden FACS-Untersuchung sowohl mit AnV als auch mit PI angefärbt und anschließend mit dem Zellschaber abgelöst.

## **2.2.4 Auswaschversuche**

### 2.2.4.1 Auswaschversuche mit PI

Je 50.000 Zellen wurden in 12er Wells ausgesät und für 72h inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden mit dem Zellschaber abgelöst und mit 10µl PI angefärbt. Die Suspension wurde für sechs Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss daran im FACS analysiert. Nach jedem FACS-Durchlauf wurden die Zellen wie oben beschrieben abzentrifugiert, mit 2ml DMEM gewaschen, erneut abzentrifugiert und mit 2ml DMEM resuspendiert um erneut gemessen werden zu können. Insgesamt wurden drei konsekutive FACS-Messungen durchgeführt.

### 2.2.4.2 Auswaschversuche mit 7-AAD

Die Auswaschversuche mit 7-AAD wurden analog zu denen mit PI, wie unter 2.2.3.3 beschrieben, durchgeführt.

## **2.2.5 Vorbereitung der Zellen auf die durchflusszytometrische Untersuchung**

Bei der Durchführung aller im Folgenden genannten Arbeiten ist auf zügiges und exaktes Arbeiten zu achten. Alle Arbeiten sind bei relativer Dunkelheit durchzuführen, um die Wirkung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe nicht zu mindern. Gefärbt wurde nach einer von van Engeland et al. für die Anfärbung von adhärennten Ovarialzellen (PA-1) beschriebenen Methode, die wir für unsere Zwecke modifizierten [van Engeland 2000, S.669].

Mit Ausnahme des Wells, in dem sich die Zellen befanden, an denen die Grundfluoreszenz gemessen werden sollte, wurden in alle Wells jeweils 10µl AnV pipettiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur und Dunkelheit für 6 Minuten inkubiert. Nun wurde mittels Pipette aus allen Wells das Kulturmedium entfernt und in 15ml Falconröhrchen aufbewahrt. Wie in der Literatur beschrieben [van Engeland 2000, S. 671; Clarke 2000, S.

148] und in eigenen Vorversuchen nachgewiesen, befinden sich in dieser Zellsuspension apoptotische und nekrotische Zellen, die sich aus dem Monolayer gelöst haben und frei im Medium schweben. Die adhärenen Zellen wurden dreimal mit je 1ml DMEM gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in die Falconröhrchen gegeben. Die Wells wurden bodenbedeckend mit Nährmedium wiederaufgefüllt um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, die Suspension bei 400g und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen und die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert. Dieses Procedere wurde wiederholt. Der nächste Schritt bestand in der Ablösung der adhärenen Zellen. Verschiedene Methoden wurden erprobt:

#### Zellschaber:

Zur Ablösung der adhärenen Zellen von PS-Oberflächen mittels eines Zellschabers, wurde der Schaber vorsichtig in der Mitte der mit 1ml Medium gefüllten Wells aufgesetzt und langsam unter leichtem Druck über den gesamten Wellboden bewegt. Anschließend wurde der Schaber über das Well gehalten und mit 1ml Medium gereinigt, um evtl. noch anhaftende Zellen in die Messlösung zurück zu spülen.

Für die Ablösung der Zellen von den Metallplättchen mussten die Plättchen behutsam mit einer anatomischen Pinzette vom Wellboden abgehoben werden. Mit einer anderen Pinzette wurde das Plättchen möglichst weit am Rand gegriffen, um so wenige Zellen wie möglich zu beschädigen und schräg über das Well gehalten. Unter leichtem Druck wurde der Schaber acht Mal über das Metall geschoben und alle Bereiche des Plättchens, ausgenommen der von der Pinzette verdeckte Teil, bearbeitet. Um möglichst alle Zellen für die Messung erfassen zu können, wurden Schaber und Plättchen mit 1ml DMEM abgespült und die Spüllösung im jeweiligen Well aufgefangen.

#### Trypsin-EDTA:

Pro abgesaugtes Well wurden 0,3ml Trypsin-EDTA eingesetzt und die Zellkulturplatten für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin mit 0,7ml Medium inaktiviert und die Zellen durch vorsichtiges Spülen der Kulturplatten mit der Pipette von der Oberfläche gelöst.

### Accutase™:

Pro abgesaugtes Well wurden je 0,3ml Accutase™ zugegeben und die Zellkulturplatten für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Wells wurden daraufhin mit 0,7ml Medium aufgefüllt und der Boden vorsichtig, doch gründlich, mit der Pipette abgespült.

### Accumax™:

Die Ablösung der Zellen mit Accumax™ erfolgte analog zur Ablösung mit Accutase™.

Bei allen Ablösemethoden wurde die Zellsuspension in FACS-Röhrchen gesammelt, das Well mit 1ml DMEM nachgespült und die Spüllösung zu den übrigen Zellen gegeben (pooling adhärenter und flottierender Zellen). Die FACS-Röhrchen wurden wie oben beschrieben abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit der Suspension der Zellen aus dem Überstand der Inkubationslösung resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen, erneut unter Ausnahme der Zellen für die Bestimmung der Grundfluoreszenz, mit 10µl PI gegengefärbt und für 6 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Unmittelbar im Anschluss daran wurde die FACS-Analyse durchgeführt.

*Diese Vorgehensweise gilt nicht für einige Vorversuche, in denen PI zusammen mit AnV vor dem Ablösen zugesetzt wurde. An betreffender Stelle wird gesondert darauf aufmerksam gemacht.*

## **2.2.6 FACS-Messungen**

### 2.2.6.1 Versuchsvorbereitung

Vor jedem Messzyklus war es erforderlich, das FACS 2-3 Mal zu „primen“. Dabei werden evtl. vorhandene Luftbläschen aus den Leitungen entfernt, die das Messergebnis verfälschen könnten. Die Zellen wurden anschließend in einem FACS-Röhrchen unter der Messpipette des FACS fixiert und vom Gerät automatisch zur Analyse angesaugt.

### 2.2.6.2 FACS-Einstellung auf Zellen und Farbstoffe

Um später die Messwerte korrekt einordnen, auswerten und interpretieren zu können, war zunächst eine genaue Ermittlung der für einen Annexin-V und Propidiumjodid gestützten Apoptoseassay optimalen Kompensations- und Spannungseinstellungen am FACS notwendig (s. Anhang). Die Notwendigkeit zu Kompensieren ergibt sich aus der Tatsache, dass zwischen Annexin-V und Propidiumjodid Überstrahlungseffekte auftreten, die eine eindeutige Differenzierung beider Signale unmöglich machen. Diese Überstrahlungseffekte des

Annexins beruhen auf der emittierten Lichtwellenlänge von 518nm, gemessen im Kanal FL1 (515-545nm), und den Messbereichen der Kanäle FL3 (550-770nm) für Propidiumjodid und dem freien Kanal FL2 (563-607nm).

Die Möglichkeiten, am Gerät selbst auf diese Phänomene einwirken zu können, sind durch die Variierbarkeit der „Detectors and Amps“ sowie der „Compensation“ gegeben. Die zusätzlich regulierbare „Voltage“ entspricht der Spannung, mit der die einzelnen empfangenen Signale verstärkt oder abgeschwächt werden können. Erhöht man zum Beispiel die Spannung des Messkanals für das Annexinsignal (FL1), so verstärkt sich das Signal der mit Annexin angefärbten Zellen.

Da einzelne Kanäle ineinander einstrahlen, können diese Effekte durch Veränderungen der Kompensation ausgeglichen werden. Die Signale betroffener Zellen können anteilig aus anderen Kanälen subtrahiert und damit reduziert werden. Dies ermöglicht ein weitaus genaueres Abgrenzen unterschiedlicher Zellpopulationen in den Dotplots und somit eine wesentlich aussagekräftigere Interpretation der durch das FACS generierten Informationen. Beispielhafte Geräteeinstellungen finden sich im Anhang.

### **2.2.7 Durchflusszytometrischer AnV-PI-Zytokompatibilitätstest zur Evaluierung verschiedener antibakterieller Oberflächenbeschichtungen**

Auf Basis der oben beschriebenen Grundlagenuntersuchungen wurde der AnV-PI-Zytokompatibilitätstest etabliert und auf die verschiedenen antibakteriellen Oberflächenbeschichtungen und Kontrollen angewandt. Für die Zytokompatibilitätsuntersuchungen (Ausnahme Versuch mit unterschiedlichen Inkubationszeiten) wurden pro Versuchszyklus die nachfolgenden Oberflächen mit je 50.000 Zellen in 24er Wells besiedelt und für 72h bei 37°C inkubiert. Die Ablösung erfolgte jeweils mit 0,3ml Accutase™ (5Min., 37°C), das wie unter 2.2.4 angegeben mit je 0,7ml DMEM inaktiviert wurde. Die Zellen wurden mit 10µl AnV vor, sowie 10µl PI nach dem Ablösen angefärbt.

Untersuchte Oberflächen bzw. Oberflächenbeschichtungen:

- Polystyren (PS) zur Bestimmung der Grundfluoreszenz G
- PS als Kontrolle
- $\text{TiAl}_6\text{V}_4$
- $\text{TiO}_2$
- 1xCu- $\text{TiO}_2$
- 2xCu- $\text{TiO}_2$
- 3xCu- $\text{TiO}_2$
- 4xCu- $\text{TiO}_2$  (nur für polierte Beschichtung)

### **2.2.8 Trypanblau-Vitalitätstest als etabliertes Standardverfahren**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte analog zu den FACS-Untersuchungen für die Oberflächenzytokompatibilität. Das Medium mit abgelösten Zellen wurde abgesaugt und aufbewahrt. Die adhärennten Zellen wurden mit je 0,3ml Accutase™/Well versetzt und über 5 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von je 0,7ml DMEM wurden die Zellen durch vorsichtiges Spülen wie im FACS-Versuch mit der Pipette abgelöst und mit den übrigen Zellen zusammengeführt. Eventuell zurückgebliebene Zellen wurden mit je 1ml DMEM ausgespült und ebenfalls gesammelt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (10 Min., 400g, 20°C) und mit 1ml DMEM resuspendiert. Jeweils 10µl wurden entnommen und mit der gleichen Menge Trypanblau für 5 Min. angefärbt. 10µl dieser Suspension wurden in die Neubauer-Zählkammer gegeben und durch Auszählen von je 4 Feldern quantifiziert. Die Gesamtzellzahl pro Well errechnete sich wie folgt:

Mittelwert aus 4 Feldern x 10.000 x 2(Trypanblau) x 2(ml/Well) = Gesamtzahl der Zellen pro Well

### **2.2.9 Untersuchung der Zytokompatibilität unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen im zeitlichen Verlauf mittels FACS und Trypanblaufärbung**

Die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Zytokompatibilität wurde auf folgenden unpolierten Oberflächenbeschichtungen durchgeführt:

- PS zur Bestimmung der Grundfluoreszenz (ohne AnV und PI)
- PS als Kontrolle
- TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>
- TiO<sub>2</sub>
- 1xCu-TiO<sub>2</sub>
- 2xCu-TiO<sub>2</sub>

Um ein Überwachsen der Wells während des langen Inkubationsintervalls von bis zu 6 Tagen zu verhindern, wurde die anfangs auszusäende Zellzahl nach unten korrigiert. So wurden die PS- Oberflächen (mit den im Vergleich besten Proliferationsbedingungen) mit je 20.000 und die metallischen Oberflächen mit je 30.000 Zellen besiedelt. Zu den Untersuchungszeitpunkten nach 70, 120 und 144 Stunden, wurden je 2 (PS) bzw. 3 (Metalle) Wells sowohl nach der oben beschriebenen Methode im FACS, als auch anschließend durch Trypanblaufärbung analysiert. In der Hälfte der Wells war nach dem Ansäen alle 24h das Medium ausgetauscht worden, um unterschiedliche physiologische Bedingungen simulieren zu können.

Die Ablösung der Zellen erfolgte nach Versuchsende wiederum durch Accutase™ (0,3ml, 5min. Inkubation bei 37°C), die Anfärbung mit – angepasst an die niedrigere Zellzahl – lediglich 0,8µl AnV und PI. Beim Ablösen mussten die Wells wesentlich häufiger gespült werden, da die Zellen auf den unpolierten Oberflächen eine stärkere Adhäsionstendenz zeigten.

Die Quantifizierung der Zellen mittels Trypanblaufärbung wurde dahingehend modifiziert, als dass aus den FACS-Röhrchen je 500µl Zellsuspension entnommen wurden, diese anschließend für 3 Minuten bei 3000U/Min. abzentrifugiert und die Pellets mit je 50µl Medium und 50µl Trypanblau resuspendiert wurden. Es folgte die Quantifizierung mit Hilfe der Neubauerzählkammer nach abgewandelter Formel:

Mittelwert aus 4 Feldern x 10.000 x 500µl/50µl= Gesamtzahl der Zellen pro Well

### **3 Ergebnisse**

Im folgenden Ergebnisteil sind die wesentlichen Resultate aus der Vielzahl der Untersuchungen zur Etablierung des AnV-PI-Zytokompatibilitätstests zusammengefasst. Während der Etablierungsschritte des Assays musste zum einen der experimentelle Aufbau wiederholt angepasst werden, zum anderen war die Durchführung einer Vielzahl von Experimenten mit modifizierten Geräteeinstellungen, Färbevorgängen etc. notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden können. Die Reihenfolge der hier wiedergegebenen Auswahl der wesentlichen Erkenntnisse ist nicht chronologisch, sondern wurde zum Zwecke einer besseren Verständlichkeit nach übergeordneten Fragestellungen zusammengestellt. Die Geräteeinstellungen, Einzelwerte der verschiedenen Experimente sowie eine detaillierte statistische Auswertung finden sich im Anhang.

Die Ergebnisse der FACS-Untersuchungen werden in sog. Dotplots dargestellt, in denen jeder Punkt einen Partikel, in der Regel also eine Zelle, repräsentiert. Zellen im linken unteren Quadranten (LL) haben nur eine geringe PI- und AnV-Fluoreszenz und entsprechen vitalen Zellen. Apoptotische Zellen weisen bei geringer PI-Intensität ein hohes AnV-Signal auf und finden sich im unteren rechten Quadranten (LR). Nekrotische Zellen sind sowohl stark PI- wie auch AnV-positiv und werden oben rechts (UR) widergespiegelt, während initial vitale Zellen, die nur während des Ablösens nach der AnV-Färbung geschädigt werden, lediglich mit PI angefärbt und folglich oben links abgebildet werden (UL). Diese Zellpopulation kann zu den vitalen Zellen addiert werden [van Engeland 1996, S. 135].

#### **FACS**

##### **Zeitlicher Apoptoseablauf von Saos-2-Zellen nach Camptothecin-exposition**

Um den zeitlichen Verlauf der Apoptose von Saos-2-Zellen untersuchen zu können und um den Zeitpunkt des maximalen Anteils apoptotischer Zellen zu ermitteln, wurden FACS-Analysen zu den Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 96 Stunden nach Apoptoseinduktion durchgeführt. Alle Zellen waren zur Apoptoseeinleitung für 5 Stunden mit der gleichen Menge (2µg) Camptothecin behandelt worden. Als Kontrollgruppe diente eine Zellpopulation, die jeweils zeitgleich untersucht wurde, aber nicht mit Camptothecin versetzt worden war.

Sowohl AnV wie auch PI wurden vor dem Ablösen der Zellen mit dem Zellschaber zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt gingen wir davon aus, dass beide Farbstoffe nach Bindung an die Zellen nicht mehr ausgewaschen werden konnten [Zamai 2001, S. 63; Postiglione 2003b, S. 311]. Allerdings mussten wir später feststellen, dass dies nur für AnV zutraf. PI

hingegen ließ sich aus den Zellen entfernen und war zum Messzeitpunkt nicht mehr nachweisbar (vgl. 3.1.3). Somit konnte eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose nicht realisiert werden. Es werden daher lediglich Werte für vitale und „avitale“ (d.h. apoptotische und nekrotische) Zellen angegeben, was uneingeschränkte Gültigkeit besitzt (Differenzierung alleine über die AnV-Färbung). Der Versuch, wie auch die folgenden, diente der Überprüfung der Sensitivität der Methode im Hinblick auf die AnV-Färbung sowie die Dynamik der Phosphatidylserinpräsentation.

Entsprach der Anteil avitaler Zellen nach 6 Stunden mit 12% in etwa der Rate avitaler Zellen innerhalb der unbehandelten Population (12%), steigerte sich ihr Anteil nach 12h bereits auf 15%. Insgesamt stieg der Anteil avitaler Zellen über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich auf bis zu 72% nach 96h an (vgl. Abb. 10). Die unbehandelten Zellen hingegen wiesen einen relativ stabilen Anteil avitaler Zellen auf. Der nach 12 Stunden gemessene Wert darf hierbei wohl als „Ausreißer“ gewertet werden.

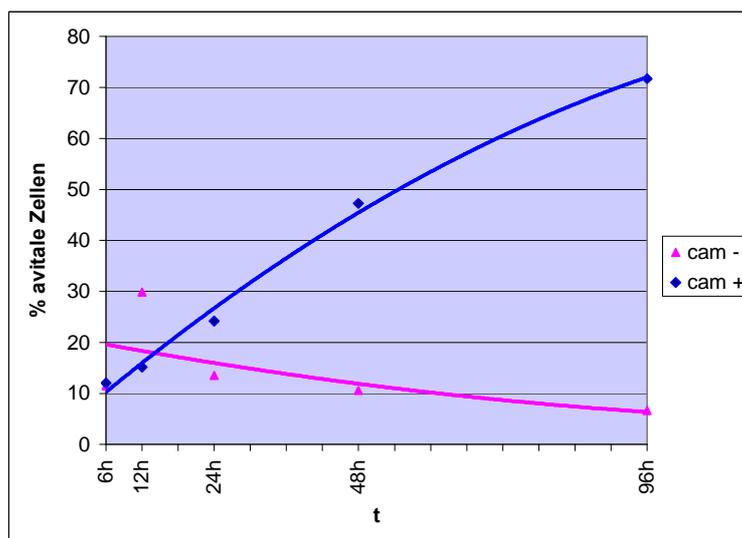
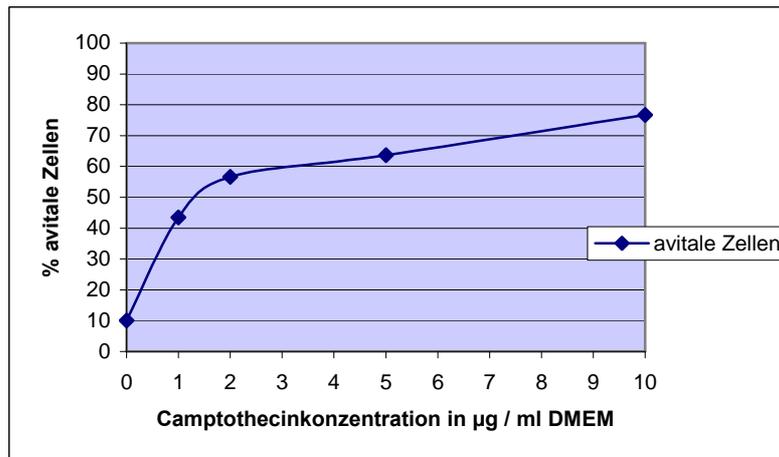


Abbildung 10: Zeitlicher Apoptoseablauf von Saos-2 nach Camptothecinexposition (n=1)

### **Apoptoseablauf in Abhängigkeit von der eingesetzten Camptothecin-konzentration**

Im Versuch zeigte sich eine deutliche Zunahme der toten Zellen in Abhängigkeit von der Camptothecinkonzentration. Auch hier konnte, wie unter 3.1.1 dargelegt, aufgrund der instabilen Bindung von PI nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in der nicht mit Camptothecin behandelten Zellkultur entsprach mit 9,9% nach 48h in etwa dem Wert, der auch schon in vorhergehenden Messungen an unbehandelten Zellen nachgewiesen werden konnte. Bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen des Apoptoseinduktors (1µg/ml) konnte eine intensive

Apoptoseeinleitung erreicht werden, bei weiteren Dosissteigerungen flachte die Kurve leicht ab und erreichte das Maximum von 76% bei 10µg Cam/ml (vgl. Abb.11).



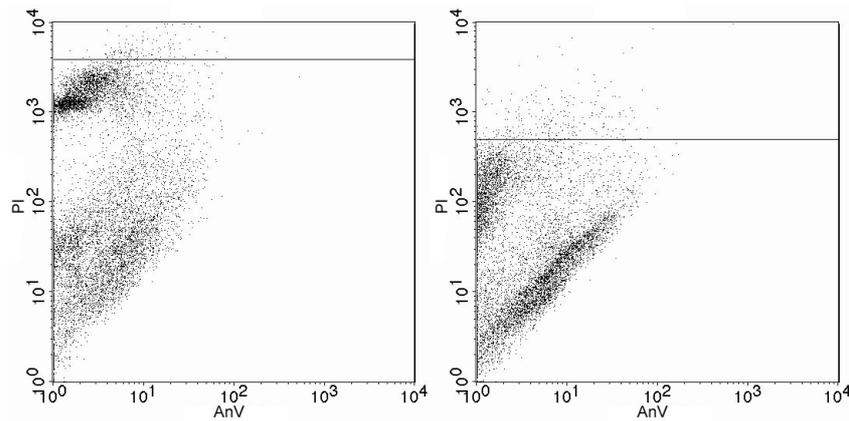
**Abbildung 11:** Abhängigkeit des Apoptoseablaufs von der eingesetzten Camptothecin-Konzentration nach 48h (n=1)

## **Auswaschversuche mit Propidiumjodid und 7-AAD**

### Propidiumjodid

In den bisher beschriebenen Versuchen imponierte trotz Zugabe teils sehr großer Mengen Camptothecin und bei mikroskopisch eindeutigem Vorhandensein nekrotischer Zellen (Trypanblau-Test) ein äußerst schwaches PI-Signal. Nach Ausschluss verschiedener Fehlerhypothesen konnte nachgewiesen werden, dass PI – entgegen vieler Literaturangaben [Zamai 2001, S. 63; Postiglione 2003b, S. 311] – trotz Bindung an Nukleosomen im Zellkern durch Waschen mit DMEM oder Inkubationspuffer wieder ausgewaschen und die Zellen somit entfärbt werden konnten.

Durch Ablösen der nativen Zellen mit dem Zellschaber wurden ausreichend Zellen geschädigt, die mit PI angefärbt werden konnten (vgl. 3.1.4.4). PI wurde zugegeben und die Fluoreszenz im FACS gemessen (vgl. Abb. 12 links). Deutlich war die dichte Punktwolke nekrotischer Zellen zu erkennen, deren relative Fluoreszenz über  $2 \times 10^3$  liegt. Nach der Messung wurden die Zellen mit 2ml DMEM gewaschen und erneut gemessen. In Abb. 12 rechts ist die durch das Waschen bedingte, drastische Abnahme der PI-Fluoreszenz auf nunmehr maximal ca.  $4 \times 10^2$  demonstriert. Wurden zwei weitere Waschgänge angeschlossen, war kein PI-Signal mehr im FACS nachweisbar und das Ergebnis falsch negativ. Dieses Phänomen zwang zu einer entscheidenden Änderung des Versuchsprotokolls: Fortan wurde PI nur noch unmittelbar vor der Messung zugegeben.



**Abbildung 12:** Auswaschen von PI mit DMEM: *links* – relative PI-Fluoreszenz vor dem Waschen; *rechts* - relative PI-Fluoreszenz nach dem Waschen

### 7-AAD

Zum Vergleich führten wir Messungen mit 7-AAD, einem weiteren Nekroseindikator, der ebenfalls Nukleosomen anfärbt und auf Grund seiner in der Literatur beschriebenen Eigenschaften geeignet schien, durch [King 2000b, S. 157; Lecoeur 2002, S. 81]. In den analog vorgenommenen Auswaschversuchen ließ sich feststellen, dass die Saos-2-Zellen mit diesem Farbstoff nahezu überhaupt nicht angefärbt werden konnten. Trotz schrittweiser Dosiserhöhung auf Werte, die weit über der vom Hersteller empfohlenen Menge lagen, konnten die - wie anschließend mit PI nachgewiesen werden konnte - eindeutig vorhandenen nekrotischen Zellen nicht verlässlich detektiert werden. Die relative 7-AAD-Fluoreszenz bewegte sich zwischen 3 und 5 und konnte auf maximal 10-40 gesteigert werden. Zum Vergleich sei in diesem Zusammenhang auf die von uns durchschnittlich gemessenen maximalen AnV- und PI-Fluoreszenzen mit Werten von bis zu  $10^5$  hingewiesen, wenn PI erst unmittelbar vor der Messung zugegeben wurde. Der Auswaschtest mit 7-AAD war ebenso wie bei PI positiv.

### Zellablöseverfahren

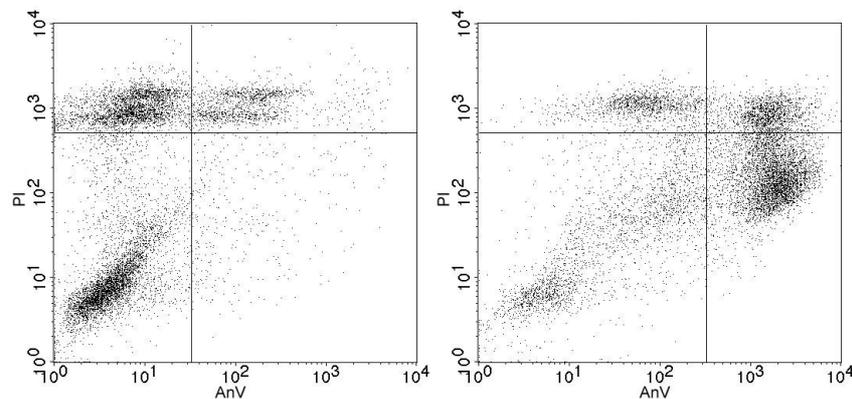
Der Vergleich unterschiedlicher Methoden der Zellablösung war erforderlich, um ein gründliches, doch zugleich schonendes Ablöseverfahren für die Anwendung von AnV im Zytokompatibilitätstest zu ermitteln. Die besondere Problematik ergibt sich aus der Tatsache, dass die meisten Ablösemedien die Zellmembran dahingehend verändern, dass sie die Bindungsstellen für membrangebundene Farbstoffe wie AnV modifizieren bzw. bereits gebundenes AnV wieder von den Zellen ablösen oder die Zellen gar irreversibel schädigen [van Engeland 1996, S. 136]. Vier verschiedene Zellablöseverfahren wurden verglichen,

wobei in jeweils der Hälfte der Proben als Positivkontrolle das apoptotische Programm durch Zugabe von Camptothecin eingeleitet wurde.

### Trypsin-EDTA

Unsere Erkenntnisse über Trypsin-EDTA stützen sich auf weit über 50 durchgeführte Messungen. In Tabelle 1 werden die Ergebnisse von Cam-positiven und Cam-negativen Proben nach 5-minütiger Trypsinexposition gezeigt. Alle Proben waren vor Ablösung mit AnV und danach mit PI angefärbt worden. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Messungen.

Zu Beginn der Untersuchungen benutzten wir ausschließlich diese Methode und erzielten sehr uneinheitliche Ergebnisse, die sich auch im Verlauf kaum verbessern ließen. Trypsin löste die Zellen sehr gut ab, was wir uns auch zur Präkultivierung der Zellen zunutze machten. Das Annexin-Signal wurde jedoch mitunter – wie in der Literatur beschrieben – abgeschwächt [van Engeland 1996, S. 136]. Die Zellpopulationen, entscheidend für die Auswertung, waren oft nur schwer voneinander abgrenzbar, sodass meist keine einheitlichen Gates gesetzt werden konnten. Außerdem wurde eine große Zahl Zellen durch das Ablösen geschädigt (Abb. 13). Der gravierendste Nachteil ist jedoch die unübersehbar große Varianz der Ergebnisse unter vergleichbaren Bedingungen, die eine korrekte Interpretation und Reproduktion der Messergebnisse stark erschwert.

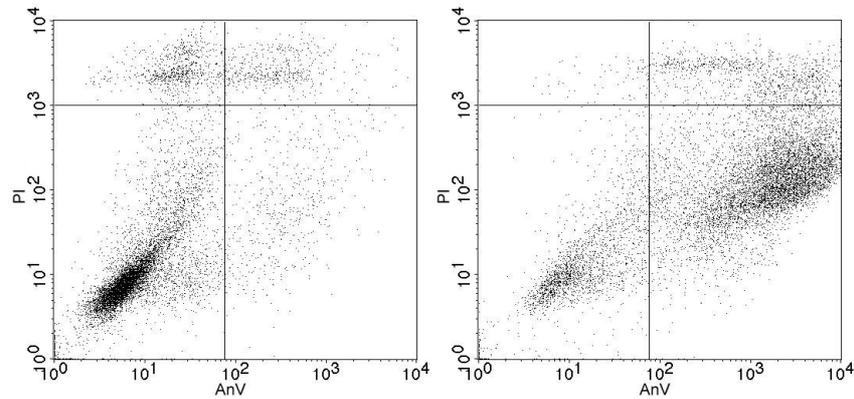


**Abbildung 13:** Ablösen mit Trypsin-EDTA: links - Cam-negativ, rechts - Cam-positiv. Man erkennt im oberen linken Quadranten (UL) eine große Menge an Signalen, welche nekrotische Zellen repräsentieren, die durch das Ablösen geschädigt wurden.

### Accutase™

Wie bei Trypsin-EDTA handelt es sich auch hierbei um ein enzymatisches Zellablöseverfahren. Laut Hersteller soll die Methode jedoch weniger aggressiv und somit schonender sein. Nach fünfminütiger Inkubation mit Accutase™ ließen sich die Zellen durch saches Anspülen mit der Pipette problemlos ablösen. Im Vergleich zu den anderen Verfahren

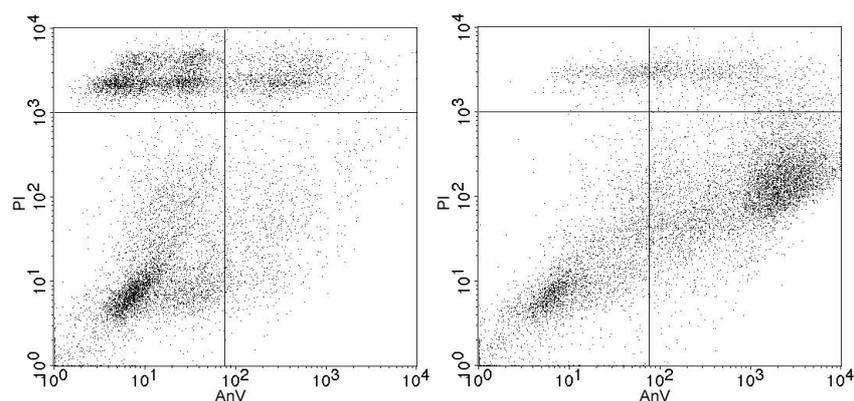
wurden die wenigsten Zellen durch den Ablösevorgang geschädigt (UL). Die errechneten Standardabweichungen waren nur gering und die Ergebnisse hervorragend zu reproduzieren. Ohne Zugabe von Camptothecin wurden nur kleine Populationen nekrotischer (UR) und apoptotischer Zellen gemessen, wohingegen eine Inkubation der Zellen mit dem Apoptoseinduktor zu einem signifikanten Anstieg dieser Fraktionen führte.



**Abbildung 14:** Ablösen mit Accutase™: *links* – Cam-negativ, *rechts* – Cam-positiv. Bei den Cam-negativen Zellen zeigte sich im wesentlich geringeren Anteil geschädigter Zellen (UL, UR, LR) die Überlegenheit einer sanfteren Zellablösung durch Accutase™ gegenüber Trypsin.

### AccuMax™

Bei erneut identischer Versuchsanordnung war die Anwendung von AccuMax™ gegenüber der von Accutase™ trotz vergleichbar geringer Varianz der Ergebnisse und Reproduzierbarkeit nicht vorteilhaft, da AccuMax™ ein weitaus zellschädigeres Potential – erkennbar am deutlich stärkeren Zellsignal im linken oberen Quadranten (UL) - als Accutase™ aufwies.



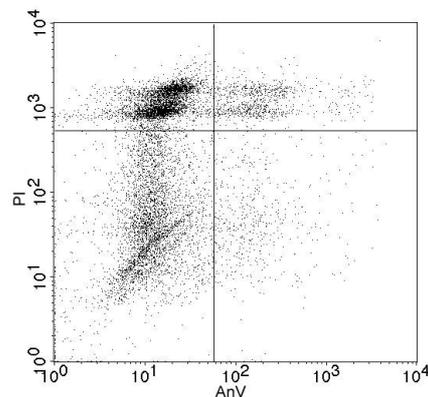
**Abbildung 15:** Ablösen mit AccuMax™: links - Cam-negativ, rechts - Cam-positiv. Zunahme geschädigter Zellen insb. in UL im Vergleich zu Accutase™ bei den Cam-negativen Zellen.

### Zellschaber

Gemäß den Empfehlungen von van Engeland et al. [van Engeland 1996; 2000] wurden die Zellen mechanisch mittels eines Zellschabers von der Oberfläche abgelöst. Hier waren die

einzelnen Zellpopulationen nicht so klar abgrenzbar und es gelang auch nach zahlreichen Wiederholungen nicht, die Methode für die Anwendung auf den  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Plättchen zu standardisieren, was sich in einer mangelnden Reproduzierbarkeit und enorm hohen Ergebnisvarianz niederschlug. Die Technik ist allen vorgestellten enzymatischen Verfahren deutlich unterlegen, zumal durch den Ablösevorgang große Verluste vitaler Zellen hingenommen werden müssen (33-44% UL).

Zudem konnte gezeigt werden, dass durch das Schaben auf den Metallplättchen mit den fehlerhaften Beschichtungen Partikel im Medium nachgewiesen werden konnten, die eine Anwendung auf derartigen Oberflächen unmöglich machen (vgl. 3.1.5).



**Abbildung 16:** Ablösen mit dem Zellschaber (PS, cam -). Im Vergleich zur enzymatischen Zellablösung fällt zum einen der hohe Anteil nekrotischer Zellen (UL), sowie die unzureichende Abgrenzbarkeit der einzelnen Zellpopulationen, am besten zu erkennen an den „verwischten“ Zellsignalen zwischen UL und LL auf.

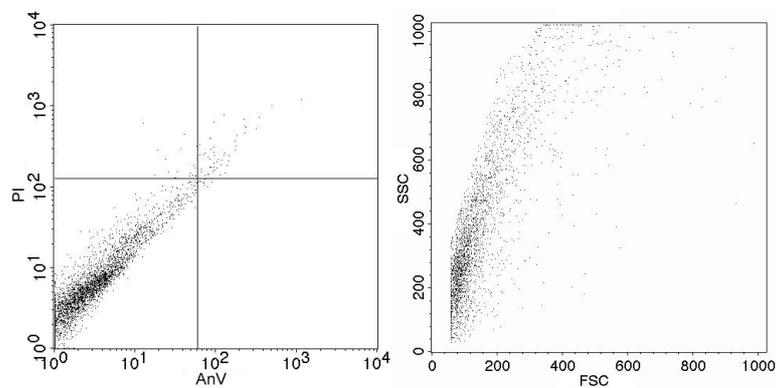
		AnV-/PI-	AnV-/PI+	AnV+/PI-	AnV+/PI+
<b>Trypsin-EDTA</b>	Cam-	70.33 ± 16.28	14.59 ± 14.28	5.29 ± 1.43	9.8 ± 3.27
	Cam+	32.17 ± 15.46	1.19 ± 0.87	52.73 ± 3.05	13.91 ± 11.91
<b>Accutase™</b>	Cam-	78.33 ± 4.57	9.43 ± 1.13	6.53 ± 2.00	5.7 ± 1.84
	Cam+	28.55 ± 3.61	1.93 ± 0.79	62.95 ± 3.72	6.56 ± 0.36
<b>AccuMax™</b>	Cam-	52.33 ± 1.24	29.74 ± 1.47	7.48 ± 0.94	10.43 ± 0.81
	Cam+	30.67 ± 3.22	4.4 ± 0.49	57.72 ± 3.60	7.2 ± 0.26

**Tabelle 1:** Ergebnisse der FACS-Analyse in % der mit (Cam +) oder ohne (Cam -) Camptothecin inkubierten Saos-2 Zellen nach enzymatischer Ablösung von PS mit unterschiedlichen Techniken (2x n=3 für jede Methode).

### Untersuchung der abgelösten Oberflächenpartikel

Da bei Verwendung des Zellschabers mit steigender Dicke der fehlerhaften Beschichtung neben den Zellen regelmäßig sehr kleine Partikel mit höchst unregelmäßigen Oberflächen als unspezifisches Rauschen im FACS aufgefallen waren, wurde eine Messung durchgeführt, um die Herkunft dieser Partikel zu ergründen. Ein fehlerhaft mit 3xCu-Xerogel beschichtetes Plättchen wurde analog zu den Zytokompatibilitätsuntersuchungen 72h in 2ml Medium unbesiedelt inkubiert und auf die oben beschriebene Weise abgeschabt.

Die FACS-Analyse ergab folgendes Bild: Wieder fanden sich relativ kleine, niedrigfluoreszente Teilchen unterschiedlicher Rauigkeit (vgl. Abb. 17). Ein Teil dieser Partikel lag im Emissionsbereich vitaler Zellen. Die Messdauer befand sich mit 3 Minuten für 10000 Ereignisse im Bereich des bei den Versuchen, in denen Zellen gemessen wurden Üblichen, was zeigt, dass die Menge der Partikel nicht unbeträchtlich war. Wurde kein Zellschaber eingesetzt, waren vergleichbare Partikel im Medium nicht nachzuweisen. Auch bei Abschabung von PS, unbeschichteten und korrekt beschichteten  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Plättchen trat das Phänomen nicht auf. Die Stoffe wurden also nicht während der Inkubation aus den Beschichtungen eluiert, sondern sind als Abriebpartikel zu interpretieren, die durch das Abschaben mit dem Zellschaber generiert wurden.



**Abbildung 17:** Partikelmessung. *links* – Fluoreszenzmessung; *rechts* - Messung von Partikelgröße (FSC) und –granularität (SSC). Die Partikel besitzen nur eine geringe Eigenfluoreszenz und sind relativ klein (FSC niedrig). Allerdings verfügen sie über eine unregelmäßige Außenstruktur, zu erkennen an der weiten Streuung der gemessenen Werte für das Seitwärtstreulicht (SSC).

## Untersuchung der Zytokompatibilität unterschiedlicher Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen mit dem durchflusszytometrischen AnV-PI-Zytokompatibilitätstest

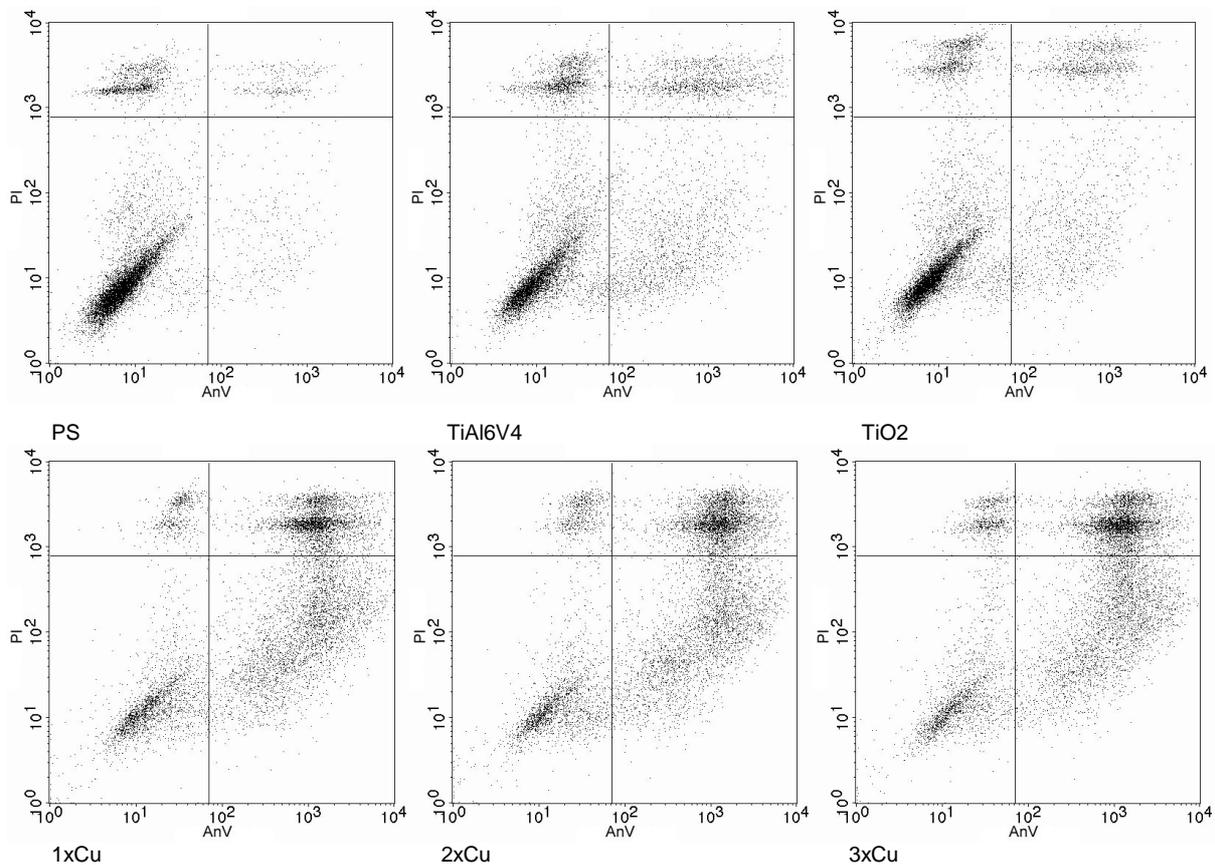
### fehlerhaft beschichtete Oberflächen

Untersucht wurden jeweils 6 Zellpopulationen à ~200.000 Zellen pro Oberflächenbeschichtung, sowie die jeweiligen Grundfluoreszenzen. Die genannten Werte stellen somit jeweils Mittelwerte dar (n=6), die demonstrierten Dotplots sind exemplarisch und entstammen je einer zusammenhängenden Messreihe (Abb. 18/19).

Blickt man auf den Dotplot für PS, so fällt gegenüber den Punktwolken aus den Vorversuchen die enorme Differenzierbarkeit der einzelnen Zellpopulationen auf. Dies wurde durch die immer weiter verbesserte Methode der Zellablösung und die Optimierung der Geräteeinstellung ermöglicht. Erwartungsgemäß am stärksten präsentierte sich die Fraktion der zum Messzeitpunkt lebenden Zellen (LL) mit 82,0%. Nur wenige Zellen (UL) wurden beim Ablösen geschädigt (7,7%). Addiert man diese beiden Werte, ergibt sich ein Anteil der

insgesamt lebenden Zellen von 89,7%. Sowohl AnV+/PI- wie auch AnV/PI+ Signale rangierten um 5%, lagen also relativ niedrig. Damit bewegten sich die Werte im Bereich des Erwartungshorizonts für eine gesunde Zellkultur unter optimalen Wachstumsbedingungen auf einer hochgradig zytokompatiblen Oberfläche.

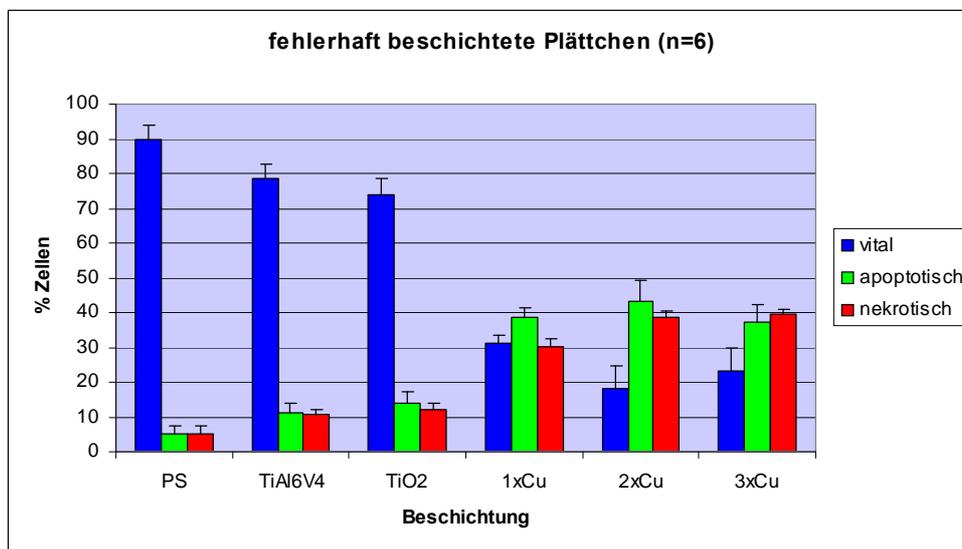
Betrachtet man nun den Dotplot der auf  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  gewachsenen Saos-Zellen, so war gegenüber PS eine Abnahme des Anteils vitaler Zellen auf 78,5% und eine deutliche Erhöhung des Anteils nekrotischer und apoptotischer Zellen erkennbar, die jetzt 10,5% und 11,2% ausmachten (jeweils  $p=0,005$ ). Durch den Ablösevorgang wurden 10,8% der Zellen geschädigt. Die fehlerhafte  $\text{TiO}_2$ -Beschichtung erwies sich nur als geringfügig weniger zytokompatibel: Die lebenden Zellen verringerten sich um weitere 5 Prozentpunkte auf 73,7%, AnV+/PI+ wurden 12,2% und AnV+/PI- 14,0% gemessen.



**Abbildung 18:** AnV-PI-Zytokompatibilitätstest von Plättchen mit fehlerhaft beschichteten Oberflächen. Gegenüber den Oberflächen mit hoher Zytokompatibilität (obere Reihe), zeigt sich in der unteren Reihe eine Abnahme des Anteils vitaler Zellen (LL) mit gleichzeitiger Zunahme apoptotischer (LR) und nekrotischer Zellen (UR) bei steigender Kupferkonzentration.

Deutliche Unterschiede, die in allen drei Kategorien (vital, apoptotisch, nekrotisch) gegenüber nicht kupferhaltigen Beschichtungen Signifikanz erreichten, ergaben sich in der Untersuchung der kupferhaltigen Oberflächen ( $p=0,004$ ). Schon bei einer Einfachbeschichtung (1xCu) war im Dotplot zu erkennen, dass die Mehrheit der Zellen auf

den fehlerhaften Oberflächen zytotoxischer Effekte ausgesetzt war. Lediglich 31,0% der Zellen konnten noch als vital gewertet werden, 38,6% waren apoptotisch und 30,4% nekrotisch. Dieser Trend setzte sich bei der 2xCu-Schicht und 3xCu-Schicht fort. Der Anteil der Zellen im Quadranten UL nahm bei den zytotoxischeren Beschichtungen kontinuierlich auf ca. 3% ab, da sich die geschädigten Zellen von selbst von der Oberfläche ablösten und in Suspension gingen, also nicht mehr durch den Ablösevorgang geschädigt werden konnten. Unterschiede zwischen den einzelnen kupferhaltigen Beschichtungen waren allerdings nur eingeschränkt zu erkennen. Mit der Abnahme der Zytokompatibilität ließ sich zudem eine Abnahme der Zählgeschwindigkeit im FACS verzeichnen, was auf deutlich niedrigere absolute Zellzahlen hindeutete. So wurden für PS durchschnittlich 200 counts/s gemessen, wohingegen für die Cu-Beschichtungen nur noch Werte von 15 counts/s erreicht wurden.



**Abbildung 19:** AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf fehlerhaft beschichteten Plättchen

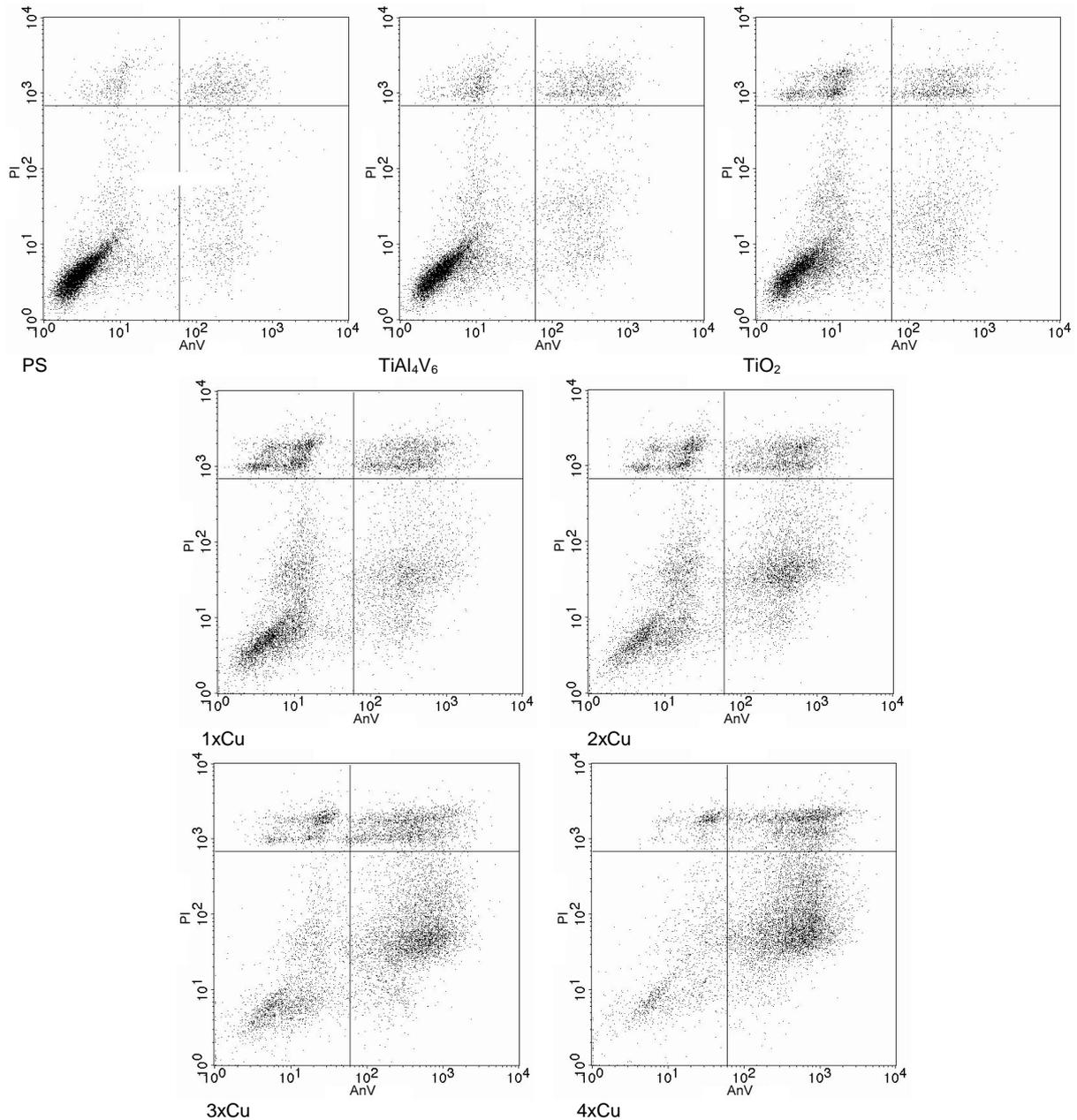
### polierte Oberflächen

In einer zweiten Versuchsreihe wurden korrekt und fehlerfrei beschichtete Plättchen untersucht, die vor dem Aufbringen der Oberflächenbeschichtung zusätzlich poliert worden waren. Außerdem konnte eine 4xCu-TiO<sub>2</sub>-Beschichtung analysiert werden. Exemplarische Dotplots einer zusammenhängenden Messreihe sind in Abbildung 20 dargestellt.

Für die Kontrollgruppe (PS) ergaben sich im Vergleich zu 3.1.6.1 keine nennenswerten Unterschiede. Im Vergleich zu poliertem TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> war PS hinsichtlich der Zellvitalität nicht signifikant überlegen (p=0,094).

Die Untersuchung der polierten TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>-Beschichtung ergab ebenfalls ein im Vergleich zu unpolierten Oberflächen nahezu identisches Ergebnis: die Zytokompatibilität war mit 78,4% vitalen Zellen im Vergleich zu den übrigen Beschichtungen hoch, apoptotische (11,6%) und

nekrotische (10%) Saos-2 befanden sich deutlich in der Minderheit und lagen nicht signifikant höher als auf PS ( $p=0,11$  bzw.  $p=0,074$ ) (vgl. Abb. 21). Die  $\text{TiO}_2$ -Schicht zeigte auch hier wieder geringfügig schlechtere Ergebnisse, allerdings unterschieden sich die Resultate zu unbeschichtetem  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  nicht signifikant ( $p=0,094$  bzw.  $p=0,172$ ).

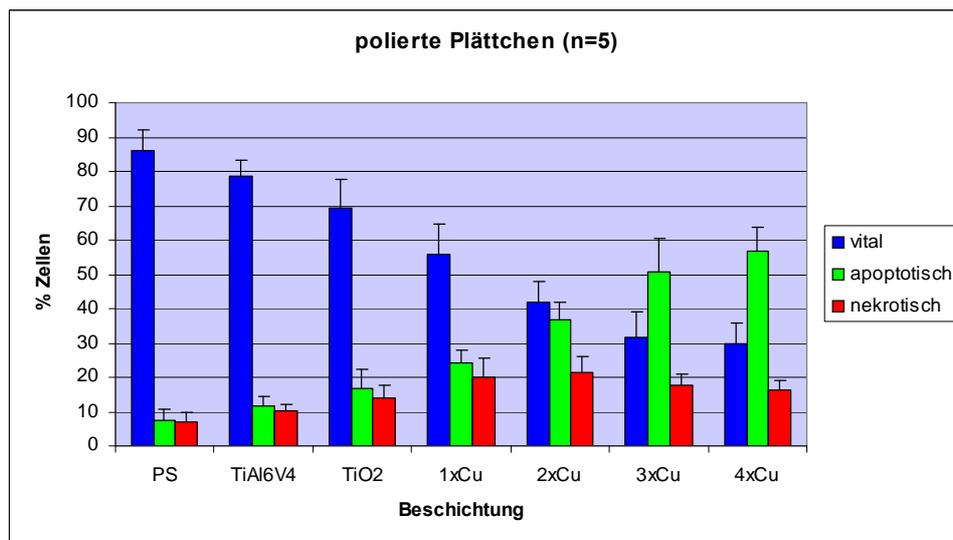


**Abbildung 20:** AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf polierten Plättchen

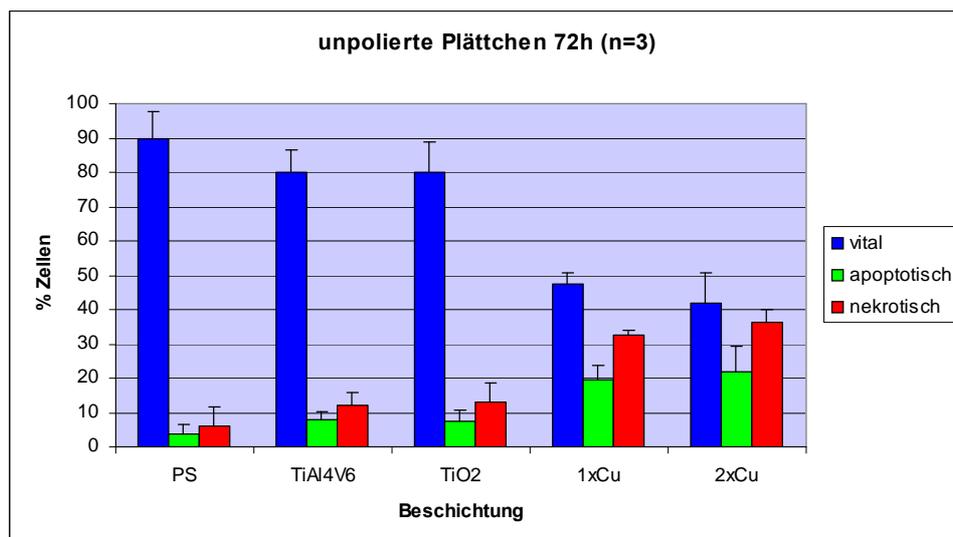
Auch auf den polierten Beschichtungen führte die Integration von Kupferionen zu einer Reduktion der Zytokompatibilität, jedoch weit weniger stark als dies auf der fehlerhaften Beschichtung der Fall gewesen war. Immerhin 56% der Zellen zeigten sich auf  $1x\text{Cu-TiO}_2$  nach Versuchsende vital, auf  $2x\text{Cu}$  waren es noch 41,9%, hingegen nur noch 31,9 und 29,7% auf  $3x\text{Cu-}$  bzw.  $4x\text{Cu-TiO}_2$ . Mit Ausnahme des Vergleichs der  $3x\text{Cu-}$  und  $4x\text{Cu-TiO}_2$ -

Beschichtung nahm der Anteil vitaler Zellen mit steigender Kupferkonzentration dabei signifikant ab ( $p \leq 0,036$ ). So kontinuierlich wie die Vitalität abnahm, ließ sich eine Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen registrieren ( $p \leq 0,02$ ).

Der Anteil nekrotischer Zellen innerhalb der Gruppe der kupferhaltigen Beschichtungen folgte hingegen keinem Trend. Die Werte lagen bei 19,8% (1xCu), 21,4% (2xCu), 17,5% (3xCu) und 16,4% (4xCu) und blieben somit in etwa konstant. Die Zählgeschwindigkeit sank auch hier mit der Zytokompatibilität stark ab (vgl. 3.1.6.1).



**Abbildung 21:** AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf polierten Plättchen



**Abbildung 22:** Im Vergleich zum AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf polierten Plättchen (Abb. 21) zeigte sich bei der Untersuchung der unpolierten Oberflächen, auf die im Abschnitt 3.3 näher eingegangen wird, v.a. eine Abnahme der Zytokompatibilität der 1xCu-TiO<sub>2</sub>-Beschichtung, jedoch auch eine Zunahme der Zytokompatibilität der TiO<sub>2</sub>-Schicht. Zu berücksichtigen ist die geringere Fallzahl.

## **Trypanblau-Vitalitätstest**

Der Trypanblau-Vitalitätstest diente als einfacher Standardtest zur Validierung der im FACS gewonnenen Ergebnisse. Zwar kann hiermit nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden, doch sind die gewonnenen Daten über das Verhältnis „tot zu lebendig“ zur grob vergleichenden Beurteilung ausreichend. Der Test ist in seiner Handhabung sehr einfach und wenig anfällig für Fehler, allerdings weit weniger akkurat als der AnV-PI-Assay. Ein Nebeneffekt ist die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung gewachsener Zellen, was so im FACS nicht möglich ist [Mascotti 2000, S. 693].

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen aus 6 Messreihen. Ausgezählt wurden analog zu den FACS-Versuchen je eine Zählkammer pro Kulturwell. Untersucht wurden die identischen Oberflächen wie für den AnV/PI-Apoptoseassay.

## **fehlerhaft beschichtete Oberflächen**

Für PS zeigte sich, dass die errechnete Zellzahl von ca. 200.000 in etwa erreicht wurde. Einer überwiegenden Anzahl vitaler Zellen standen nur ~30.000 avitale gegenüber. Hierbei muss natürlich wieder der durch die Ablösung entstandene Zellschaden berücksichtigt werden, der sich jedoch mit dem Trypanblau-Verfahren nicht quantifizieren lässt; somit wird die Anzahl nekrotischer Zellen falsch-hoch bewertet.

Das Wachstum auf der  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Schicht zeigte sich im Vergleich zu PS deutlich inhibiert ( $p=0,004$ ). Zwar überwog die Zahl lebender Zellen deutlich, doch hatte die absolute Zellzahl massiv auf ca. 120.000 abgenommen. Die reine  $\text{TiO}_2$ -Beschichtung zeigte ähnliche Ergebnisse im Vergleich zu PS, jedoch keine signifikante Abweichung zu  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  (Abb. 23). Auf den Kupferschichten war auch mittels Trypanblau-Test ein signifikanter zytotoxischer Einfluss zu erkennen ( $p=0,004$ ). So kehrte sich das Verhältnis „vital zu avital“ zu Gunsten der avitalen Zellen um. Die Zahl der vitalen Zellen verminderte sich mit zunehmender Kupfermenge von ~18.000 (1xCu) bis auf ~8.000 (3xCu). Die Zahl der avitalen Zellen lag annähernd konstant um 35.000. Diese Abnahme der Zellzahlen deckt sich mit den qualitativen Beobachtungen aus dem FACS-Versuch.

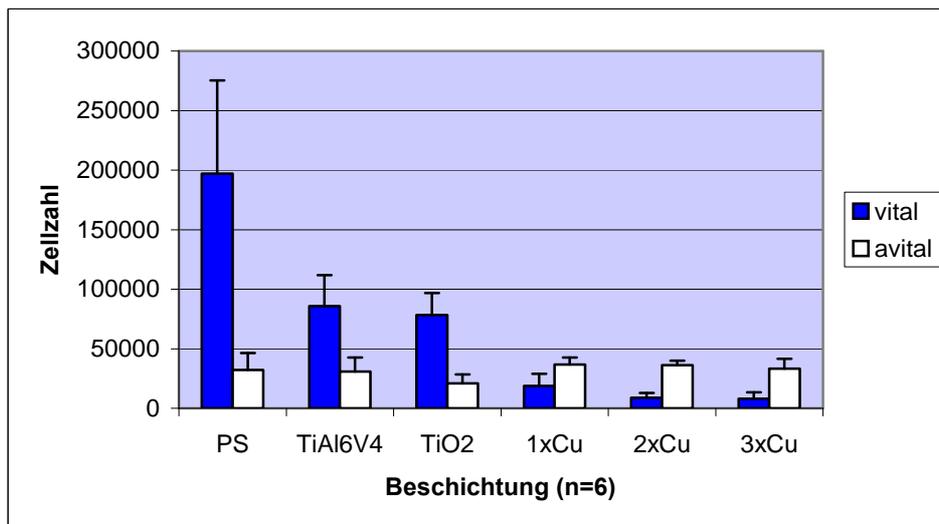


Abbildung 23: Trypanblau-Vitalitätstest auf fehlerhaften Oberflächenbeschichtungen

### polierte Oberflächen

Auch bei der Auszählung der Zellen, die auf korrekt beschichteten, polierten Oberflächen gewachsen waren, bestätigten sich die im FACS gewonnenen Ergebnisse (Abb. 24). Die Zellzahl auf PS entsprach wiederum in etwa den angestrebten 200.000 Zellen, war aber etwas höher als in der Untersuchung mit den fehlerhaft beschichteten Oberflächen. Die gute Zytokompatibilität von PS und das ungestörte Zellwachstum bestätigten sich mit ~220.000 vitalen zu ~25.000 nekrotischen Zellen. Poliertes  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  zeigte im Vergleich zur Reihe der fehlerhaften  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen ein geringfügig besseres Zellwachstum, was aber durch die schon bei PS sichtbare, generell in dieser Versuchsreihe höhere Zellzahl relativiert wurde. Das Verhältnis „tot zu lebendig“ blieb hingegen unverändert. Erneut etwas ungünstigere Wachstumsbedingungen gegenüber  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  die aber nicht signifikant waren, bot die  $\text{TiO}_2$ -Beschichtung.

Bei der Untersuchung der kupferhaltigen Beschichtungen zeigte sich eine deutliche Steigerung der Zytokompatibilität gegenüber der fehlerhaften Serie: Von der 1xCu-Schicht konnten ca. 60.000 vitale Zellen abgelöst werden, wobei die Zahl der toten Zellen sogar geringfügig darunter lag. Bei der fehlerhaften Variante hatte die Zahl der Toten die der Lebenden noch um mehr als das Doppelte übertroffen. Hiermit ergab sich in Bezug auf die lebenden Zellen kein signifikanter Unterschied gegenüber  $\text{TiO}_2$  und  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  ( $p=0,199$ ). Auch bei der 2xCu-Schicht lag die Zytokompatibilität noch im Toleranzbereich. 3xCu und 4xCu führten erwartungsgemäß zu einer starken Reduktion von Zellzahl und Vitalität. Auch hier entsprachen die Ergebnisse im wesentlichen den im FACS gewonnenen.

Zusätzlich konnte bei der Ablösung der Zellen von den polierten Oberflächen eine weitere hochinteressante Beobachtung gemacht werden. Die Ablösung der Zellen von PS und

TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> gelang durch nur 2-3 maliges Spülen mit der Pipette problemlos und vollständig. Auf den verschiedenen Beschichtungen hingegen hafteten die Zellen ungleich fester und waren nicht vollständig zu lösen. Dies war auf den fehlerhaften Beschichtungen auf Grund der modifizierten Oberflächenbeschaffenheit und des fehlenden Lichtreflexes nicht sichtbar gewesen, kann aber auch hier nicht ausgeschlossen werden. Die Gesamtzahl der gewachsenen Zellen kann also auch für die Titanoxidbeschichtungen höher angenommen werden, als in der Grafik angedeutet. Dies führt in Konsequenz auch zu einer Zunahme der Zytokompatibilität. Weiterhin ist zu erwarten, dass v. a. die vitalen Zellen an der Oberflächenbeschichtung fest anhafteten und somit beim Ablösen geschädigt wurden.

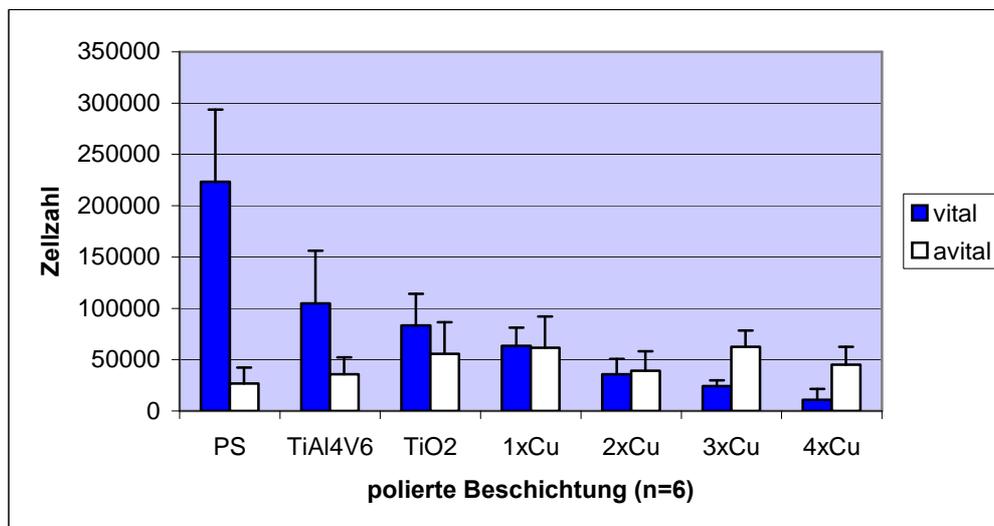


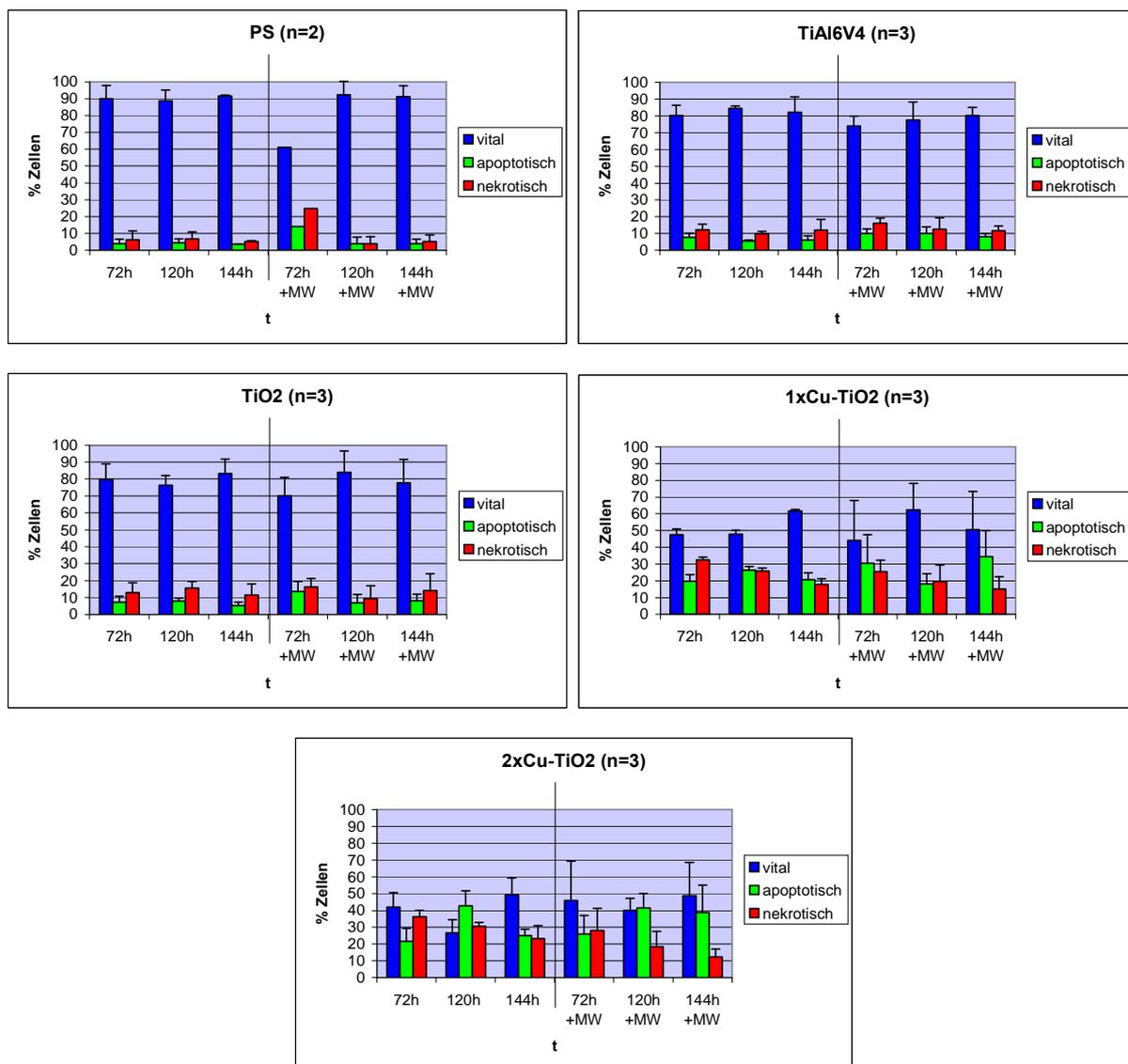
Abbildung 24: Trypanblau-Vitalitätstest auf polierten Oberflächenbeschichtungen

## Untersuchung des zeitlichen Verlaufs von Apoptose und Nekrose auf unterschiedlichen Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen mittels FACS und Trypanblaufärbung

### FACS

Untersucht wurden je 6 Zellpopulationen auf unpolierten Oberflächen zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (72h, 120h, 144h). In der Kontrollgruppe (PS) wurden je 4 Wells analysiert. Bei der Hälfte der Wells war nach dem Ansäen alle 24h das Nährmedium ausgetauscht worden, um möglichst physiologische Bedingungen simulieren zu können. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Vitalitäts-, Apoptose- und Nekroserate der Saos-2 Zellen auf unpolierten, korrekt aufgetragenen Oberflächenbeschichtungen (Abb. 25). Aufgrund der relativ niedrigen Fallzahlen (n=3 je Gruppe) besitzen die p-Werte nur eingeschränkte Aussagekraft.

Die Resultate für PS zeigten sich hinsichtlich Vitalität, Apoptose und Nekrose mit den Ergebnissen der vorausgehenden Versuche vergleichbar. Lediglich zum Versuchszeitpunkt 72h mit Mediumwechsel lag die Zahl vitaler Zellen deutlich niedriger, wobei hier eher von einem Ausreißer auszugehen ist. Der Anteil vitaler Zellen lag konstant über 80% und nahm auch bei sehr langen Inkubationszeiten nicht ab. Der Mediumwechsel zeigte nur nach 72h in der PS-Gruppe einen Effekt, der am ehesten als Fehlmessung gewertet werden muss da aus Beobachtungen während der Kultivierung und Anzucht der Zellen bekannt ist, dass Saos-2 schon nach wenigen Stunden adhären und nach 72h beim Splitting nur durch Trypsinisieren von PS gelöst werden können.



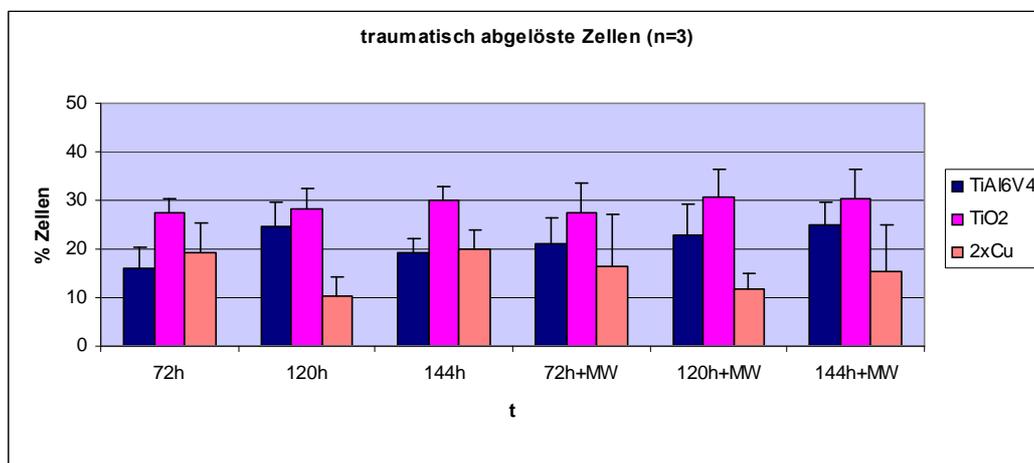
**Abbildung 25:** Zeitliche Abhängigkeit der Zytokompatibilität auf unterschiedlichen unpolierten Oberflächenbeschichtungen (FACS); +MW = Ergebnisse nach regelmäßigem Wechsel des Nährmediums alle 24h.

Für TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> ergab sich erneut in Vergleich zu PS eine leicht, aber nicht signifikant erniedrigte Zytokompatibilität (p=0,284). Die Rate vitaler Zellen pendelte um 80% und blieb

ebenfalls im Verlauf konstant. Auch hier ließ sich kein Anhalt für Auswirkungen eines Mediumwechsels erkennen. Weitgehend identisch war die Verteilung für  $\text{TiO}_2$ : Die Zytokompatibilität entsprach der von  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ , mit zunehmender Inkubationsdauer sowie durch Austausch des Kulturmediums ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen ( $p > 0,05$ ).

Wie nach den vorangegangenen Versuchen zu erwarten war, kam es in Anwesenheit von Cu-Ionen zu einer massiven Reduktion der Zytokompatibilität. Die Vitalitätsrate auf  $1x\text{Cu-TiO}_2$  lag nach 72h bei 47%, stieg aber im Verlauf auf bis zu 62% nach 120h an. Die Zytokompatibilität der  $2x\text{Cu}$ -Beschichtung erreichte ihr Maximum mit 49% vitalen Zellen nach 144h. Auffallend war der hohe Anteil rein apoptotischer Zellen von bis über 40% (120h). Auf beiden Beschichtungen zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Rate nekrotischer und eine tendentielle Zunahme der Rate vitaler Zellen nach Überschreiten des 120h-Intervalls. Der Mediumwechsel erbrachte auf beiden Beschichtungen keine messbaren Veränderungen.

Deutliche Unterschiede zwischen  $\text{TiO}_2$  und  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  wurden jedoch bei Betrachtung des Adhäsionsverhaltens der Zellen, welches durch den Vergleich der beim Ablösen zerstörten Zellen (UL) abgeschätzt werden kann, offenbar (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Vergleich des Anteils durch Ablösen zerstörter Zellen (UL) im FACS

Eindeutig war zu erkennen, dass durchgängig mehr Zellen bei der Ablösung von der  $\text{TiO}_2$ -Beschichtung traumatisiert und damit An-/PI+ wurden, als dies auf der  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Oberfläche der Fall gewesen war. Dies weist auf eine stärkere Adhäsion der osteoblastären Zellen auf  $\text{TiO}_2$  im Vergleich zu  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  hin. Die Integration von Kupferionen verminderte hingegen das Adhäsionsvermögen. Ein Austausch des Mediums wirkte sich nicht aus.

### **Trypanblau-Vitalitätstest**

Die Bestimmung der absoluten Zellzahl wurde auch zur Analyse des zeitlichen Verlaufs von Apoptose und Nekrose auf den unterschiedlichen Oberflächen durch Untersuchung der Zellen mittels Trypanblau-Vitalitätstest vorgenommen. Dazu wurden jeweils 500µl aus der für die FACS-Messung bestimmten Zellsuspension entnommen und untersucht. Um den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und dem langen Inkubationszeitraum Rechnung zu tragen, wurden auf PS nur je 20.000, auf den übrigen Beschichtungen jeweils 30.000 Zellen angesät (Abb. 27).

Die Zellen, die auf PS gewachsen waren, erreichten nach 72h ohne MW die Gesamtzahl von ~60.000 und lagen damit in etwa im Erwartungshorizont. Etwa 42.000 blieben vital, 20.000 waren als nekrotisch einzustufen. In diesem Versuch wurde nun im Gegensatz zur FACS-Untersuchung in allen Vergleichsgruppen ein massiver Effekt des Mediumwechsels bei gleichen Messzeitpunkten deutlich. Die Zellzahl wurde durch den Mediumwechsel massiv reduziert. Mit zunehmender Inkubationszeit stieg sie auf max. ~250.000 nach 144h bei hoher Vitalitätsrate weiter an.

Ähnliche Aussagen erlaubte die Analyse der  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Oberfläche. Die nach 72h gemessene Zellzahl lag mit knapp über 30.000 noch nahe an der Zahl der eingesetzten Zellen, stieg aber dann rapide auf über 140.000 nach 120h und 220.000 Zellen nach 144h an. Insgesamt waren die erreichten Zellzahlen im Vergleich zu PS, trotz der dichteren Aussaat, niedriger ( $p=0,083$ ). Auch wurden im Verhältnis mehr tote Zellen gemessen. Der Mediumwechsel verminderte auch hier die absoluten Zellzahlen deutlich.

Zu merklich schlechteren Ergebnissen im Trypanblau-Vitalitätstest führte auch in dieser Untersuchung die Aussaat der Zellen auf  $\text{TiO}_2$  ( $p>0,05$ ). Zum ersten Untersuchungszeitpunkt hatte die Gesamtzellzahl von ausgesäten 30.000 auf unter 20.000 gemessenen abgenommen. Der erste Mediumwechsel schien kaum mehr Zellen zurückzulassen. Die Populationen erholten sich jedoch und erreichten ohne Mediumwechsel Werte von ca. 140.000 (120h) bzw. 170.000 (144h). Wiederum wurden zahlreiche Zellen durch den Mediumwechsel aus den Wells entfernt, aber auch mit Mediumwechsel kam es zu einer Besiedelung der Oberfläche und kontinuierlich steigenden Zellzahlen. Nicht vergessen werden darf auch hier wieder, dass die Zahl der toten Zellen, wie unter 3.2.1 beschriebenen, im Rahmen des Trypanblau-Tests falsch-hoch bewertet wird, da insbesondere an  $\text{TiO}_2$  anhaftende Zellen durch die Ablösung geschädigt wurden.

Zellen, die auf der  $1x\text{Cu-TiO}_2$ -Schicht angesät wurden, fanden offensichtlich erheblich schlechtere Wachstumsbedingungen vor. Nach 72h reduzierte sich die Zellzahl auf unter

10.000. Die Zahl der toten Zellen lag zu allen Messzeitpunkten über der Zahl der lebendigen. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine langsame Erholung des Zellwachstums. Das Maximum an Zellen wurde nach 144h mit ~40.000 erreicht. Der Mediumwechsel führte auch in dieser Gruppe zu einer Reduktion der Zellzahl.

Auf der 2xCu-Beschichtung konnten kaum noch vitale Zellen gezählt werden. Die Zellzahl zeigte nur schwer erkennbare Zuwächse, die maximale Zellzahl überschritt die Marke von 20.000 Zellen nicht.

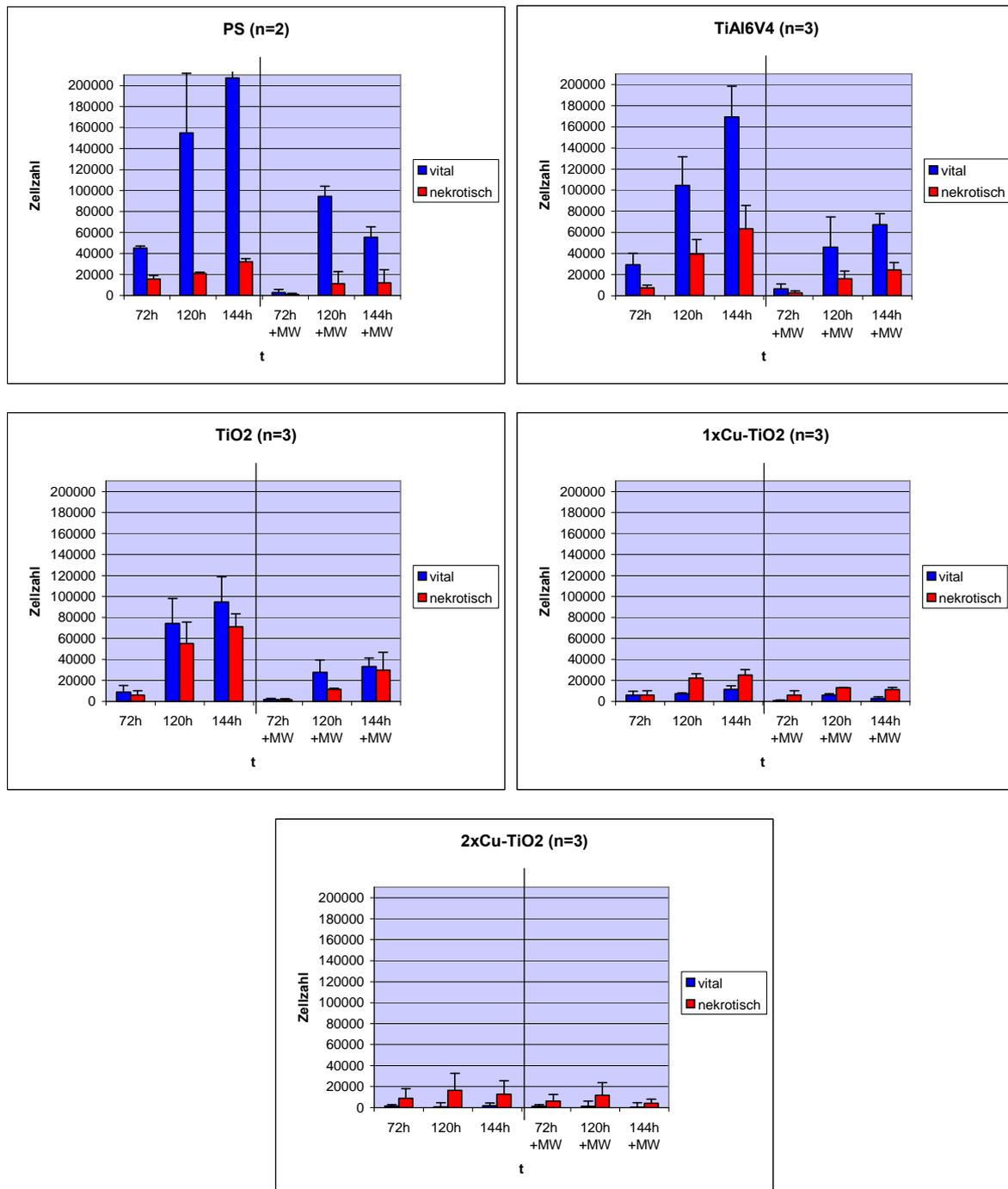


Abbildung 27: Zeitliche Abhängigkeit der Zytokompatibilität auf unterschiedlichen Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen (Trypanblau-Vitalitätstest)

## **4 Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war, ein geeignetes Testsystem für die Überprüfung der Zytokompatibilität einer neuartigen antiinfektiösen Oberflächenbeschichtung für Endoprothesen zu etablieren. Als Basis diente ein AnV-PI-Apoptoseassay, der in einigen Punkte modifiziert werden musste, um in einem zweiten Schritt die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen miteinander vergleichen zu können.

### **4.1 Neuanwendung des AnnexinV-Propidiumjodid-Assays als Zytokompatibilitätstest für Biomaterialien**

#### **4.1.1 Bisherige Anwendung des AnnexinV-Propidiumjodid-Apoptoseassays**

Seit seiner Erstbeschreibung durch Vermes et al. 1995 ist der AnnexinV-Propidiumjodid-Assay zur Unterscheidung apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen für zahlreiche nicht-adhärenente Zelllinien etabliert worden und gehört heute zu den Standardmethoden vieler Labors auf der ganzen Welt [Vermes 1995, S. 39]. Die Untersuchung adhärenenter Zellen hingegen ist in der Literatur mehrfach als ein äußerst schwierig durchzuführendes Verfahren beschrieben worden, was nach unseren Kenntnissen erst einer Arbeitsgruppe an Zellen des Typs MR65 (nicht-kleinzelliges Bronchialcarcinom) und PA-1 (Ovarialcarcinom) gelang [van Engeland 1996, S. 131; 1998, S. 5; 2000, S. 669; Micoud 2001, S. 110]. Der Hersteller des Annexin-V-FLUOS-Staining Kits rät aus mehreren Gründen von der Anwendung seines Tests an derartigen Zellen ausdrücklich ab [vgl. Produktbeschreibung Roche Annexin-V-FLUOS-Staining Kit Version 3, Okt. 2002, S. 2].

Die Untersuchung adhärenenter Zellen beinhaltet immer die gleichzeitige Analyse mindestens zweier eigenständiger Zellpopulationen, nämlich die der adhärenenten wie auch der spontan abgelösten, frei im Medium flottierenden Zellen. Beide Gruppen müssen in einer Messung erfasst werden können. Ein weiteres Problem ergibt sich beim Ernten der Zellen. Einerseits sollen möglichst alle Zellen von der Oberfläche abgelöst werden, um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Andererseits gilt es, Veränderungen charakteristischer Zelleigenschaften durch ein möglichst schonendes Vorgehen zu verhindern. Werden die Zellen zu aggressiv abgelöst, erhöht sich die Zahl der nekrotischen Zellen, da die Zellen beim Ablösen zum Teil zerstört werden. Reagenzien wie Trypsin-EDTA greifen die Zellmembran an und können Oberflächencharakteristika wie die Phosphatidylserinpräsentation direkt beeinflussen [Corver 1995, S. 272]. Das Messergebnis kann zusätzlich z. B. durch enzymatische Ablösung von zellgebundenem Annexin-V oder durch die Komplexbildung von essentiellen  $\text{Ca}^{2+}$  durch EDTA – verfälscht werden [van Engeland 1996, S. 136].

Viele Arbeitsgruppen, die am FACS, zum Teil auch im Rahmen von Zytokompatibilitätsuntersuchungen mit adhärenen Zellen arbeiten, umgehen das Problem, indem sie alternativ die sub-G<sub>1</sub>-Population des Zellkollektivs über eine einfache PI-Färbung bestimmen [Pucci 1999; Filippini 2000; Lauricella 2001; Hotta 2003; Postiglione 2003a]. Auch wird, wenn mit Annexin gefärbt wird, gelegentlich gänzlich auf eine Nekrose-Gegenfärbung verzichtet [Hotta 2003, S. 953].

Die von uns initial anvisierte Methode, die adhärenen Zellen *in situ* mit AnV und PI zu färben und erst nach Auswaschen der ungebundenen Farbstoffe zu ernten, um dem hohen Zellverlust durch Ablösen aus dem Weg zu gehen, hat sich aufgrund der unzureichend stabilen Bindung von PI als nicht durchführbar erwiesen (vgl. 3.1.3), wurde aber dennoch von mindestens zwei Arbeitsgruppen publiziert [Clarke 2000, S. 143; Zamai 2001, S. 58]. Auch das von mehreren Gruppen beschriebene Zugeben von AnV *und* PI bzw. anderen Markern *nach* dem Ablösen der Zellen erlaubt aus unserer Sicht keine verlässliche quantitative Aussage über die Anteile der einzelnen Zellpopulationen und damit über die zugrundeliegenden Nekrose- bzw. Apoptosestimuli [Lassus 1998, S. 5233; Yuan 2003, S. 36; Sandrock 2003, S. 211]. In diesem Fall kann der Anteil der artifiziell durch das Ablösen geschädigten Zellen nicht von den Zellen differenziert werden, welche bereits zuvor auf der Oberfläche apoptotisch bzw. nekrotisch waren. Somit läßt dieses Vorgehen keine korrekte Ergebnisinterpretation zu. Der AnV-PI-Assay musste also, insbesondere im Hinblick auf die Quantifizierung des Anteils adhärenen Zellen, methodisch optimiert werden.

#### **4.1.2 Vergleich der unterschiedlichen Zellablöseverfahren**

##### **4.1.2.1 Trypsin-EDTA**

Wie vielfach in der Literatur beschrieben, scheint sich Trypsin-EDTA, trotz seiner hervorragenden Eigenschaften für die Zellkultivierung nicht als Zellablösemittel im Rahmen eines annexinabhängigen Experiments zu eignen [van Engeland 1996, S. 136; 1998, S. 5; Micoud 2001, S.110]. Dies lässt sich sehr leicht durch die enthaltenen Bestandteile erklären (vgl. 4.1.1). Wir entschlossen uns dennoch, die Methode zu überprüfen, da uns keine aussagekräftigen Daten über die Kombination Saos-2/Trypsin-EDTA/Annexin-V vorlagen. In unseren Versuchen wurden die beschriebenen Phänomene jedoch bestätigt: Die einzelnen Zellpopulationen waren in den Dotplots nur schlecht voneinander abzugrenzen, das Annexin-Signal wurde abgeschwächt und die Rate geschädigter Zellen war relativ hoch. Insgesamt waren die Ergebnisse unter vergleichbaren Bedingungen variabel und relativ unzuverlässig.

#### 4.1.2.2 Zellschaber

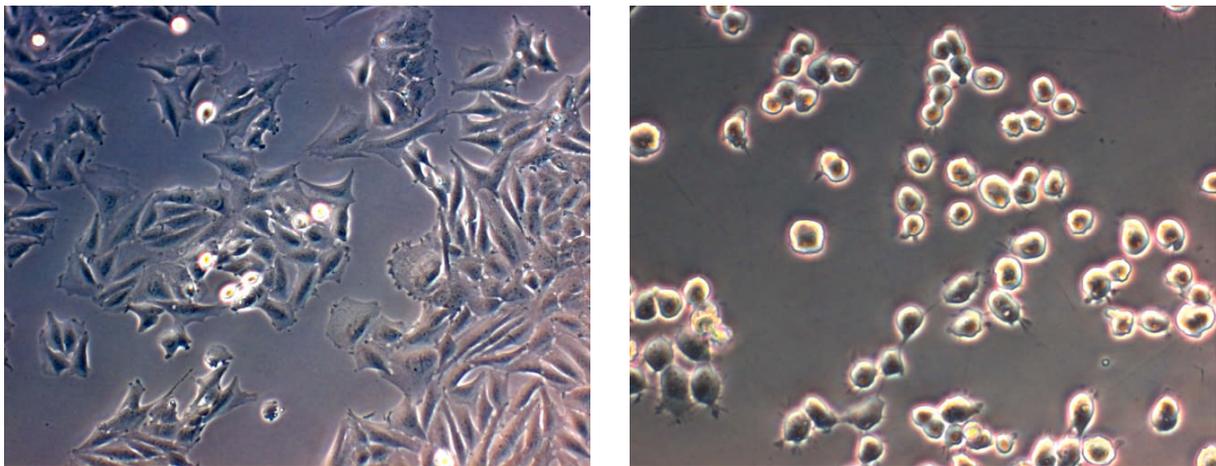
Bei der Zellablösung mit dem mechanischen Zellschaber handelt es sich um die von van Engeland et al. bei der Erstbeschreibung des AnV-PI-Apoptoseassays an adhärenen Zellen gewählte Methode [van Engeland 1996; 2000]. Hierbei wird die Problematik der Annexinbindung in Zusammenhang mit der Zellablösung relativ elegant umschifft, indem beim Ablösen traumatisierte Zellen ausschließlich PI-positiv markiert werden und somit zu identifizieren sind. Voraussetzung hierfür ist die Zugabe des PI-Farbstoffes erst nach der Ablösung der Zellen. Der eindeutige Vorteil liegt darin, dass Interferenzen durch ablösende Enzyme oder EDTA mit den für das FACS notwendigen Farbstoffen vermieden werden können. Der große Nachteil jedoch ist, dass sehr hohe Raten vitaler Zellen (33-44% auf PS) durch die mechanische Ablösung zugrunde gehen [van Engeland 1997, S. 425]. Überdies ist die Handhabung unpraktisch und lässt sich nur schwer standardisieren, sodass auch unsere Ergebnisse sehr starken Schwankungen unterlagen, die ein Festhalten an diesem Verfahren nicht erlaubten. Für die Nutzung im Rahmen der Zytokompatibilitätsuntersuchungen ist der Zellschaber schließlich gänzlich ungeeignet, da durch das Abschaben der Oberflächen Abriebpartikel generiert werden können, die die Messergebnisse massiv verfälschen; unregelmäßige, strukturierte Oberflächen können ebenfalls nicht untersucht werden (vgl. 3.1.5 und 4.1.4). Positiv zu vermerken ist, dass die gernteten Zellpopulationen im Gegensatz zu trypsinbehandelten Zellen hervorragend zu unterscheiden sind. Die besseren Ergebnisse von van Engeland et al. mögen darin begründet sein, dass die von ihnen untersuchten Zellen weniger stark an Oberflächen adhäreren als Knochen- oder Bindegewebszellen.

#### 4.1.2.3 Accutase™

Der kombiniert proteolytisch-kollagenolytische Wirkmechanismus von Accutase™ führt laut Hersteller zu einer wesentlich schonenderen Ablösung adhärenen Zellen von den Zellkulturoberflächen als Trypsin-EDTA. Die genaue Zusammensetzung des Produkts wird vom Hersteller bedauerlicherweise nicht offengelegt. Die Dissoziation erfolgt unter Intaktbleiben von Oberflächenepitopen und Zellmatrixproteinen innerhalb weniger Minuten. Auch in der Literatur wird die Accutase™-Wirkung auf adhärenen Zellen als weit weniger aggressiv als die des Trypsins beschrieben. Insbesondere was die Wirkung auf membranständige Rezeptoren betrifft, die ja für die AnV-Färbung von großer Bedeutung sind, ist es plausibel anzunehmen, dass eine intensive Degradation wie beim Trypsinverdau nicht stattfindet [Hoppmann 2002, S. 45; Wachs 2003, S. 958; Weikert 2003, S. 880]. Die einzige Modifikation, die für die Kombination mit AnnexinV vorgenommen werden musste, war die

Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem DMEM anstatt des vom Hersteller empfohlenen PBS. Da  $\text{Ca}^{2+}$  essentiell für die AnV-Bindung an Phosphatidylserin ist und EDTA als Komplexbildner auch in geringen Mengen Accutase™ zugesetzt wird, musste ausreichend  $\text{Ca}^{2+}$  für die AnV-Bindung zur Verfügung gestellt werden.

Schon in unseren ersten Versuchen mit Accutase™ erzielten wir sehr stabile Ergebnisse. Die Rate der durch das Ablösen geschädigten Zellen war verglichen mit den vorher genannten Methoden mit Abstand am geringsten und lag konstant unter 10% (vgl. 3.1.4.2). Bemerkenswert ist auch das hohe Auflösungsvermögen dieser Technik, die eine optimale Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen im Dotplot ermöglichte. Trotzdem gelang eine fast vollständige Lösung der Zellen vom Boden der Kulturwells. Eine Minderung des Annexinsignals konnte nicht beobachtet werden. Diese auf PS durchgeführten Vorstudien ließen sich schließlich vollständig auf die Anwendung an metallischen Oberflächen übertragen.



**Abbildung 28:** links - Saos-2 nativ: flache Zellen mit weiten Ausläufern; rechts - 5 Min. nach Inkubation mit Accutase™: abgekugelte Zellen mit beginnender Ablösung vom Untergrund

Insgesamt ließ sich durch die Anwendung von Accutase™ eine deutliche Optimierung des von van Engeland et al. entwickelten Testkonzeptes erreichen. Der Umstieg vom Zellschaber auf Accutase™ führte zu einer massiven Reduktion des „Kollateralschadens“ (>40% → <10% sekundär geschädigte Zellen) sowie zu einer nachhaltigen Stabilisierung der Ergebnisse. Dies ist insofern bedeutsam, als dass primär apoptotische Zellen (AnV+/PI-) auch durch das Ablösen geschädigt werden könnten, PI aufnehmen und fälschlicherweise den primär nekrotischen Zellen zugeordnet werden. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Zahl der beim Ablösen geschädigten Zellen zu minimieren. Der Test ist leichter durchzuführen, weniger zeitaufwändig, besser standardisierbar und weist eine geringere Fehleranfälligkeit auf. Da keine Abriebpartikel auf den Implantatoberflächen entstehen, können auch

Zytokompatibilitätsuntersuchungen an instabileren und strukturierten Oberflächen problemlos durchgeführt werden. Die Anwendung von Accutase™ im Rahmen eines Zytokompatibilitätstests und in Kombination mit AnV/PI wurde nach unseren Kenntnissen bisher nicht beschrieben.

#### 4.1.2.4 AccuMax™

Ein weiteres, der Accutase™ verwandtes Produkt ist AccuMax™. Laut Hersteller besitzt es den dreifachen Enzymgehalt und verfügt darüber hinaus über DNase-Qualitäten, beinhaltet allerdings kein EDTA. In unseren Versuchen zeigte sich, dass verglichen mit Accutase™ wesentlich mehr Zellen durch die Behandlung zerstört werden, sodass wir diesen Weg nicht weiterverfolgten (vgl. 3.1.4.3).

### **4.1.3 Untersuchung der abgelösten Oberflächenpartikel**

Diese sehr kleinen Partikel, die als Nebenprodukt beim Abschaben der Zellen von den fehlerhaften Titanoxidschichten entstanden, können das Messergebnis zum einen verfälschen, indem sie die Punktwolken der vitalen Zellen unscharf erscheinen lassen und das Gating der Ergebnisse erschweren. Zudem verringert sich durch ihre Anwesenheit der relative Anteil der Zellen an der festgelegten Gesamtmesszahl (10.000 Ereignisse), da das FACS nicht zwischen Zellen und sonstigen Partikeln zu unterscheiden vermag. Dies gewinnt insbesondere vor dem Hintergrund der großen Zahl der Partikel an Bedeutung, die in Form der relativ hohen Zählgeschwindigkeit im FACS erkennbar war. Bezüglich ihrer Fluoreszenz (FL-1/FL-3) waren die Partikel im untersten Spektrum angesiedelt, dem einzelne vitale Zellen zugeordnet werden können. In Bezug auf Größe und Granularität besteht die Vermutung einer Interferenz mit Zellfragmenten, wie sie während Apoptose und Nekrose entstehen. Für die geplante Anwendung auf TiO<sub>2</sub>-Beschichtungen schied diese Ablösemethode daher aus.

### **4.1.4 Apoptoseeinleitung mit Camptothecin**

Ziel der Versuche mit Camptothecin war, den zeitlichen Verlauf des Absterbens der Saos-2 Zellen bei standardisierter Apoptoseeinleitung untersuchen zu können, um zu prüfen, in wie weit diese Zellen überhaupt für einen Versuch mit Annexin-V und Propidiumjodid geeignet waren. Zudem diente Camptothecin als Apoptoseinduktor in der Frühphase, in der die umfangreichen Geräteeinstellungen vorgenommen wurden. Erst nach Abschluss und Auswertung dieser Versuchsreihe, erfolgten die Experimente mit den verschiedenen Implantatoberflächen.

Die Testergebnisse (vgl. 3.1.1/3.1.2) wiesen sehr anschaulich den zum Zelltod führenden Camptothecineffekt nach. Sowohl mit steigender Cam-Konzentration wie auch bei zunehmender Inkubationsdauer erhöhte sich die Zahl der avitalen Zellen. Der Versuch zeigte bereits, dass sich der Test prinzipiell zu Untersuchung von Saos-2 Zellen eignet. Die Wirkung des Camptothecins war sehr gut nachzuweisen und deckte sich mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen [Lauricella 2001, S. 192].

#### **4.1.5 Auswaschversuche**

Um die Entstehung der von van Engeland et al. beschriebenen großen Zahl PI positiver/AnV-negativer, also durch „Abschaben“ beschädigter Zellen zu vermeiden, wurden zunächst beide Färbungen vor Ablösung der Zellen durchgeführt [van Engeland 1997, S. 425]. Durch Auswaschen der ungebundenen Farbstoffe nach Ablauf der Inkubationszeit sollte erreicht werden, dass zum Zeitpunkt des Ablösens weder freies AnV noch PI in der Zellsuspension enthalten waren und somit konsekutiv durch Ablösen zerstörte Zellen nicht mehr markiert werden konnten. Umfangreiche Experimente ergaben jedoch, dass PI entgegen von Literaturangaben [Zamai 2001, S. 63; Postiglione 2003b, S. 311] durchaus durch Waschen von seiner Bindung an die DNA gelöst werden kann, was wiederum von anderen Autoren bestätigt wurde [King 2000a, S. 156].

Dieses Verhalten zwang uns zur Modifikation des Assays. PI kann nach unseren Erkenntnissen nur eingesetzt werden, wenn keine weiteren Waschschrte mehr folgen und wurde somit in den weiteren Versuchen erst unmittelbar vor der FACS-Analyse zugefügt. 7-AAD, welches als alternativer Nekroseindikator getestet wurde, war für unsere Zwecke nicht geeignet. Zum einen zeigte sich, dass die Markierung nekrotischer Saos-Zellen ungleich schwächer als durch PI ausfällt, zum anderen, dass der Farbstoff ebenfalls durch wenige Waschschrte von den Zellfragmenten entfernt werden kann.

#### **4.1.6 Alternative Methoden zur Bestimmung von Apoptose und Nekrose**

Zur Untersuchung von Apoptose und Nekrose wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Vielzahl an Testverfahren entwickelt, von denen im Folgenden einige häufig eingesetzte vorgestellt und mit dem von uns etablierten Verfahren verglichen werden.

##### Licht-/Fluoreszenz-Mikroskopie:

Als Farbstoffe dienen hier z.B. Acridinorange, Propidiumjodid oder DAPI. Die quantifizierbare Zellzahl ist gegenüber dem FACS weit kleiner, die abgelösten Zellen in Suspension werden in der Regel nicht analysiert und das Ergebnis unterliegt immer einer

gewissen Subjektivität des Mikroskopeurs. Die Untersuchung undurchsichtiger Metallplättchen wie im vorgestellten Fall ist nur mittels Auflichtmikroskopie unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen möglich.

#### TUNEL (Terminal-Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP nick end labeling):

Mit Hilfe dieser sehr sensitiven Technik werden Einzelstrangbrüche innerhalb der genomischen DNA nachgewiesen, die im Verlauf der Apoptose durch die Aktivität der Nukleasen entstehen. Durch die terminale Desoxyribosyltransferase werden die Bruchstellen mit modifizierten Nukleotiden markiert und können entweder direkt oder indirekt, u.a. auch im FACS, sichtbar gemacht werden. Eine Untersuchung undurchsichtiger Implantatoberflächen und Probekörper ist mit dieser Methode nicht möglich. Die Beschichtung durchsichtiger Objektträger erschien uns, da in diesem Fall ein Vergleich mit  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  unmöglich geworden wäre, nicht sinnvoll. Diese relativ zeitaufwändige und fehleranfällige Methode erlaubt keine Unterscheidung von Apoptose und Nekrose. Zudem liefert sie bei kleiner Untersuchungsmenge nur eingeschränkte Informationen über das jeweilige Apoptosestadium der Zellen [van Engeland 1996, S. 132].

#### Bestimmung des sub-G<sub>1</sub>-Peaks:

Bei diesem von Nicoletti et al. beschriebenen Apoptoseassay macht man sich die Entstehung kleinster DNA-Fragmente während der Apoptose zunutze [Nicoletti 1991, S. 271]. Permeabilisiert man mit Hilfe von Detergentien die Zellmembranen, kann diese niedermolekulare DNA die Zellkerne verlassen. Die verbliebene hochmolekulare DNA im Zellkern wird im nächsten Schritt mit Propidiumjodid angefärbt. Im FACS kann die Fluoreszenz und damit die DNA-Menge genau quantifiziert werden, wodurch sich die einzelnen Zellpopulationen unterscheiden lassen. Vitale Zellen mit höherem DNA-Gehalt erscheinen bei der Auswertung als G<sub>1</sub>-Peak, apoptotische (aber auch nekrotische) Zellen enthalten weniger hochmolekulare genomische DNA und erscheinen als sub-G<sub>1</sub>-Peak.

Allerdings hat der Test verschiedene Nachteile: Die DNA-Fragmentation tritt erst in einem relativ späten Stadium der Apoptose auf. Zelldébris, der ebenfalls wenig DNA-haltig ist, verfälscht das Ergebnis. Zellen, die in der späten S- oder G<sub>2</sub>-Phase in Apoptose gehen, wie auch geringe Mengen apoptotischer Zellen, werden nicht erkannt. Eine Unterscheidung von Apoptose und Nekrose ist nicht möglich, da auch im Rahmen der Nekrose DNA-Fragmente den Zellkern verlassen [van Engeland 1996, S. 132; Clarke 2000, S. 142/148f]. Die Technik erlaubt nur rein quantitative Untersuchungen ohne kinetische Aspekte zu vermitteln. Durch

die notwendige Permeabilisierung der Membran gehen wichtige Epitope zur Identifikation der Zellen verloren und Zellen, die sich von selbst von den Oberflächen lösen, sind nur schlecht erfassbar [Vermes 1991, S. 49; Lassus 1998, S. 5233; Clarke 2000, S.148].

#### DNA-Ladder:

Bei der DNA-Ladder-Methode werden während der Apoptose entstehende DNA-Bruchstücke von ca. 180 Basenpaaren Länge aus den Zellen isoliert und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Bruchstücke ergeben ein apoptosetypisches Muster, die sog. DNA-Ladder. Der Test hat keine hohe Sensitivität, da er nur größere Mengen apoptotischer Zellen nachweist und erlaubt im wesentlichen nur die Feststellung, dass prinzipiell apoptotische Zellen vorliegen, ohne jedoch eine Quantifizierung oder Identifikation einzelner Zellen zuzulassen. Spätapoptotische Zellen können von nekrotischen nicht differenziert werden und es gibt Hinweise darauf, dass die Technik zur Untersuchung adhärenter Zellen nicht geeignet ist [Clarke 2000, S. 142/148; Micoud 2001, S.111].

#### **4.1.7 Bewertung des neu etablierten AnV-PI-Zytokompatibilitätstests für adhärenente Zellen**

Die Anwendung des AnV-PI-Apoptoseassays in der von uns etablierten Form an Saos-2-Zellen im Rahmen einer materialwissenschaftlichen Zytokompatibilitätsstudie stellt eine Weiterentwicklung dar, die gegenüber vielen anderen Verfahren entscheidende Vorteile bringt. Die prinzipielle Eignung von AnV und PI als Marker einer durch Metallionen verursachten Zytotoxizität wurde von Catelas bzw. Suska et al. bereits nachgewiesen [Suska 2005b, S. 5942; Catelas 2005, S. 2441].

Auf die Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose, gerade im Hinblick auf die Induktion einer postnekrotisch-inflammatorischen Reaktion, wurde unter 1.5 ausgiebig eingegangen. Da der Test als Zytokompatibilitätstest für neuartige Implantatoberflächen dient, ist es wichtig, diese Unterscheidung zu treffen, um die Reaktion des Empfängerorganismus auf das Implantat prognostizieren zu können. Annexin-V und Propidiumjodid stellen ein optimales Testsystem dar, das eine zuverlässige Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Vitalität erlaubt. Annexin-V spielt dabei eine besondere Rolle, da die meisten Zelllinien bereits in einer frühapoptotischen Phase hochspezifisch markiert und erkannt werden können, wodurch die Testsensitivität erhöht wird [Martin 1995, S. 1552; Hammill 1999, S. 16; King 2000b, S. 16].

In allen vorgestellten Messungen fiel bei den apoptotischen Zellen eine relativ zu den nekrotischen Zellen etwas stärkere AnV-Fluoreszenz auf. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die noch intakten apoptotischen Zellen im Gegensatz zu den zerfallenden nekrotischen Zellen deutlich größer sind und damit mehr Farbstoff binden können. Dass apoptotische Zellen auch immer eine gewisse PI-Fluoreszenz erkennen lassen, könnte einerseits eine gewisse Permeabilisierung der Zytoplasmamembran bedeuten, aber auch - und in unseren Augen wahrscheinlicher - durch nicht vollständig zu eliminierende Überstrahlungseffekte des AnV-Signals verursacht sein.

Die vorliegenden Ergebnisse zeichnen sich durch eine hohe Stabilität und sehr gute Reproduzierbarkeit aus. Aufgrund der geringen Standardabweichungen und der präzisen Ergebnisse waren trotz der relativ geringen Fallzahlen ( $n=5$  bzw.  $n=6$ ) statistisch begründete Aussagen möglich. Die Änderungen, die zur optimalen Geräteeinstellung vor jedem Messzyklus vorgenommen werden mussten, waren nur marginal und weisen ebenfalls auf die hohe Verlässlichkeit der Methode hin. Bemerkenswert ist diese Stabilität der Ergebnisse insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass nun zuverlässig mit diesem Test an adhären Zellen gearbeitet werden kann, was bisher nicht empfohlen wurde [Micoud 2001, S.110].

Ein weiterer Vorteil ist die Individualzellmessung. Jede Zelle passiert einzeln den Detektor und wird separat analysiert. Dies erlaubt wesentlich tiefere Einblicke in die Kinetik des Zelltodes (vgl. 3.1/3.3) und stellt die Unterschiede hinsichtlich der Zytokompatibilität einzelner Beschichtungen prägnant dar. Durch die große Anzahl der jeweils gemessenen Zellen (10.000) wird bei enormer Zählgeschwindigkeit eine hohe Sensitivität und Genauigkeit in der Ergebnisgewinnung erzielt. So lassen sich sehr treffsicher und mit hoher Konstanz die Unterschiede in der Zytokompatibilität in Abhängigkeit von Beschichtungstyp, Oberflächenbeschaffenheit und Inkubationszeit nachweisen. Qualitative wie quantitative Analytik ist gleichermaßen möglich.

Von immenser Bedeutung für die Messung adhären Zellen ist des Weiteren, dass sowohl an der Oberfläche haftende, wie im Medium schwebende Zellen gleichzeitig oder getrennt analysiert werden können. Die Analyse nicht-adhären Zellen ist wichtig, da sich apoptotische, nekrotische und mitotische Zellen häufig von der Oberfläche ablösen [van Engeland 2000, S.671; Clarke 2000, S. 149; Suska 2005b, S. 5948]. Ein großer Vorteil gegenüber anderen Tests ist zudem, dass dieses Verfahren nicht objektträgergebunden ist. Diese Tatsache ist essentiell für die Untersuchung der Zytokompatibilität opaker Implantate, welche nicht mittels Durchlicht untersucht werden können.

Das FACS liefert in ein und demselben Messvorgang eine Fülle unterschiedlicher Informationen. Im vorliegenden Fall waren die untersuchten Parameter die Fluoreszenzsignale der Apoptose- und Nekrosemarker, Zellgröße und Zellgranularität. Durch Austausch der eingesetzten Marker und Messgrößen lässt sich das Untersuchungsspektrum variieren und neu kombinieren.

Schließlich ist die Methode insgesamt in ihrer Handhabung relativ einfach und wenig zeitaufwändig. Die Darstellung der Ergebnisse ist anschaulich, durch Gating und Kompensationseinstellungen können auch unter schwierigen Messbedingungen (z. B. Überstrahlungseffekte, viel Zelldébris) verwertbare Resultate gewonnen werden.

Der vorgestellte Test eignet sich sehr gut, die Zytokompatibilität verschiedener Biomaterialien einzuschätzen. Einschränkungen ergeben sich aber insofern, als dass Saos-2-Zellen auf die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften nur zum Teil durch vermehrte Apoptose und Nekrose, am deutlichsten jedoch in Form unterschiedlicher Proliferationsgeschwindigkeiten zu antworten scheinen. Diese erniedrigte Proliferationsfähigkeit wird erst durch die Kombination von FACS und Methoden der absoluten Zellzählung (z.B. Trypanblau-Vitalitätstest) erkennbar. Die Kombination beider Tests kann daher noch verlässlichere Angaben über die Zytokompatibilität liefern und erreicht eine sehr hohe Sensitivität. Allerdings korrelierte das FACS-Ergebnis in unseren Untersuchungen mit dem Zählergebnis des Trypanblau-Vitalitätstests, so dass dieser evtl. im Rahmen eines „Zytokompatibilitätsschnelltests“ überflüssig sein könnte.

## **4.2 Ergebnisse der Zytokompatibilitätsuntersuchungen**

Die hohe Inzidenz und Kostenintensität implantatassoziiertes Infektionen sowie ihre schwierige und komplikationsträchtige Behandlung erfordern die Suche nach neuen, alternativen Therapiestrategien. Es ist daher nicht verwunderlich, dass dieses Feld seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung ist. Ein Ansatzpunkt im Rahmen der Infektionsprävention ist dabei die Entwicklung antiadhäsiver und antiinfektiöser Oberflächenbeschichtungen für medizinische Implantate. Im vorliegenden Fall in Form einer kupferhaltigen Titanoxidbeschichtung.

Heidenau et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass einer deutlichen Reduktion des Wachstums von *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) um fünf Logarithmusstufen nur eine relativ geringe Inhibition von Zellwachstum und Vitalität (Fibroblasten L929) gegenübersteht [Heidenau 2005, S. 888]. Die 2xCu-TiO<sub>2</sub>-Beschichtung wies dabei das günstigste Verhältnis

von Bakterizidie und Zytokompatibilität auf. Überdies konnte ein reduziertes Adhäsionsvermögen der Bakterien an den mit Kupfer modifizierten Oberflächen im Vergleich zu nicht-antiinfektösen Beschichtungen beobachtet werden. Die Kupferionen werden auch aus tieferliegenden Schichten freigesetzt und beeinflussen nicht nur die unmittelbare Implantatumgebung, sondern lassen sich auch im freien Medium mit antibakterieller Wirkung nachweisen. Damit könnte auch periimplantäres Bakterienwachstum inhibiert werden [Heidenau 2005, S. 888]. Da die schnell proliferierenden Bakterien von der toxischen Kupferwirkung wesentlich massiver getroffen werden als langsam wachsende körpereigene Zellen, verschieben sich die Chancen im sog. „*race for the surface*“ zugunsten des Empfängergewebes. Besonders das Risiko von Infektionen durch während der Implantation eingebrachte Bakterien könnte sich auf diese Weise reduzieren lassen.

Zur detaillierteren Überprüfung der Zytokompatibilität der vorgestellten Beschichtungen wurde das vorliegende Testverfahren etabliert. Durch eine hohe Zytokompatibilität bzw. eine möglichst weitreichende Biomimetisierung des Implantats kann eine optimierte Implantateinheilung und damit eine verringerte Infektanfälligkeit erreicht werden, die durch die antiinfektöse Komponente in Form der integrierten Kupferionen zusätzlich unterstützt wird.

#### **4.2.1 Abhängigkeit der Zytokompatibilität von der Beschichtungszusammensetzung**

Der wichtigste untersuchte Aspekt war der Vergleich der Zytokompatibilität in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der aufgetragenen Oberflächenmatrix. Die hier getroffenen Aussagen beziehen sich im Folgenden nicht auf die fehlerhaft beschichtete Charge. Den Ausgangswerkstoff stellte, als standardmäßig in der orthopädischen und unfallchirurgischen Implantologie verwendetes Material, eine  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Legierung dar. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die auf PS angezüchtet worden waren. Zieht man einen Vergleich zwischen diesen beiden völlig unterschiedlichen Kulturflächen, wird eine deutliche Abnahme des Anteils vitaler Zellen sowie der Zellzahl auf dem Metall deutlich. Trotz dieser Abnahme wird offenbar, dass die Zellen  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  als Kulturfläche sehr gut tolerieren. Die ungünstigeren Wachstumsbedingungen wurden dabei nicht einmal so sehr bei der Betrachtung des Verhältnisses „vital/apoptotisch/nekrotisch“, als vielmehr durch die massiv herabgesetzte Proliferationstätigkeit der Zellen im Trypanblau-Vitalitätstest deutlich. Dieser Effekt trat in allen folgenden Versuchen auf.

Vergleicht man  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  mit  $\text{TiO}_2$ , so fiel bei den direkten Gegenüberstellungen (3.1.6.2 und 3.2.2) auf, dass entgegen der in den Vorversuchen auf  $\text{TiO}_2$  nachgewiesenen verbesserten Zytokompatibilität [Heidenau 2005, S. 886], diese sogar leicht – wenn auch nicht signifikant – herabgesetzt wurde. Dies äußerte sich in einer Abnahme vitaler Zellen, vor allem zu Gunsten einer erhöhten Apoptoserate, zudem in einer reduzierten Zellzahl. Gleichauf liegen beide Beschichtungen hingegen im FACS-Langzeitversuch (3.3.1).

Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen den vorgestellten Resultaten und den Ergebnissen von WST- und Wachstumstests an MC3T3-Zellen und Fibroblasten [Heidenau 2005; Gollwitzer 2003c] sehen wir im photokatalytischen Effekt von Titanoxid, der in Form verschiedenster Oberflächen wie Sol-Gel-Beschichtungen, porösen  $\text{TiO}_2$ -Filmen und Titanpartikeln nachgewiesen werden konnte [Raulio 2006, S.261; Kiwi 2005, S. 4631; Zhang 2004, S. 3191]. Als bedeutende Wirkung der Photokatalyse mittels  $\text{TiO}_2$  konnte eine signifikante antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden, welche auch industriell Einsatz findet. So zeigte sich eine deutliche Reduzierung der Biofilmbildung bzw. eine Zerstörung bakteriellen Biofilms durch photokatalytische Aktivität [Raulio 2006, S. 261]. Praktische Anwendungen finden Titanoxidoberflächen vornehmlich zur Wasserdesinfektion [Salih 2002, S. 920; Choi 2004, S. 43] und Oberflächendesinfektion [Kuhn 2003, S. 71].

Als Wirkmechanismen konnten v.a. destruirende Effekte auf Zellmembransysteme nachgewiesen werden, wie die Peroxidation ungesättigter Phospholipide durch hochreaktive OH-Radikale [Maness 1999, S. 4094; Salih 2002, S. 920; Kuhn 2003; S. 71] und physikalisch-chemische Veränderungen mit Reorientierung membrangebundener Proteine der Zellmembran gefolgt von Zellmembranzerstörung und abnormer Zellteilung [Amezaga-Madrid 2003, S. 45; Maness 1999, S. 4094]. Auch ein synergistischer Effekt mit Kupfer wurde beschrieben [Sunada 2003, S. 4785], welcher v.a. bei der Anwendung kupferhaltiger Titanoxidschichten bedeutend sein könnte. Die antibakterielle Wirksamkeit photokatalytischer Titanoxidschichten erstreckt sich über ein breites Erregerspektrum wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus*, Algen und *Giardia lamblia* [Maness 1999, S. 4094; Salih 2002, S. 920; Kuhn 2003, S. 71; Raulio 2006, S. 261; Gopal 2004, S. 167; Lee 2004, S. 713]. Desinfektionsraten von mehr als 6 Logarithmusstufen wurden beschrieben [Kuhn 2003, S. 71].

Im Gegensatz zur antibakteriellen Wirkung photokatalytisch wirksamer Titanoxidoberflächen wurden zytotoxische Effekte gegenüber humanen Zelllinien weit weniger ausführlich untersucht. Experimentell wurde der Einsatz photokatalytisch wirksamer Titanpartikel gegen maligne Colocarcinomzellen beschrieben [Zhang 2004, S. 3191]. Zytotoxische Einflüsse

durch Photokatalyse der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Titanoxidbeschichtung sind auch auf die untersuchten SaOS-2-Zellen zu erwarten. Hier sind weitere Experimente zur Abschätzung der zytotoxischen Effektgröße notwendig. Ebenso muss untersucht werden, ob der photokatalytische Effekt auch zur Optimierung der antibakteriellen Wirksamkeit kupferhaltiger TiO<sub>2</sub>-Beschichtungen eingesetzt werden kann.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Zelladhärenz auf unpoliertem TiO<sub>2</sub> viel stärker als auf TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> ausfiel. Dies ergab ein Vergleich der beim Ablösen von unpolierten Flächen geschädigten Zellpopulationen (vgl. 3.3.1). Auf den polierten Oberflächen fand sich dieses Phänomen jedoch nicht (vgl. 4.2.2). Postiglione et al. stellten diesbezüglich dar, dass - zumindest nach 3h - die Adhäsion von Saos-2 auf TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>-Oberflächen nicht von deren Topographie abhängig ist [Postiglione 2004, S. 220]. Damit wäre die von uns beobachtete Verstärkung der Adhärenz materialabhängig und somit ein deutlicher Vorteil der TiO<sub>2</sub>-Beschichtung gegenüber TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>. Die Gründe für das Ausbleiben des Effekts auf polierten Oberflächen sind bisher noch ungeklärt.

Die Integration von antibakteriellen Konzentrationen an Cu-Ionen in die TiO<sub>2</sub>-Schicht führte erwartungsgemäß und wie von anderen Arbeitsgruppen bestätigt zu einer Reduktion von Zellvitalität und -proliferation [Suska 2001; 2003; 2005a/b]. Wie in den Versuchen von Heidenau et al. kam es bei zunehmender Anzahl der Schichten zu einer Verstärkung des zytotoxischen Effekts, der sich in allen durchgeführten Versuchen eindeutig nachweisen ließ [Heidenau 2005, S. 886]. Als günstig zu werten war, dass es sich hierbei v. a. um eine proapoptische, weniger eine pro-nekrotische Wirkung handelte (vgl. 1.5). Die Drei- und Vierfachbeschichtung zeigten eine deutliche Zytotoxizität. Aus den Vorversuchen ist jedoch bekannt, dass bereits mit einer Zweifachbeschichtung eine ausgeprägte antibakterielle Wirkung erzielt werden kann [Gollwitzer 2003c]. Diese war als polierte und unpolierte Variante mit immerhin ca. 40% vitalen Zellen (3.1.6.2 bzw. 3.3.1) hinsichtlich ihrer Zytokompatibilität nach 72h den toxischeren Beschichtungen signifikant überlegen. Insbesondere auf den polierten Oberflächen wurde die Abnahme der Zytokompatibilität mit steigender Kupferionendosis erkennbar (vgl. 3.1.6.2/3.2.2). Denkbar ist zudem, dass die Saos-2 Zellen durch die autokatalytische Wirkung von Titanoxid eine verstärkte Vulnerabilität gegenüber zusätzlichen Noxen wie den Kupferionen zeigten und es daher zu einer synergistischen Hemmung des Zellwachstums kam. Der Einfluss der autokatalytischen Wirkung muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Die reduzierte Rate und Zahl vitaler Zellen auf den Schichten mit hohem Kupfergehalt mag auf den ersten Blick ungenügend für eine erfolgreiche Implantatintegration wirken.

Wiederholt ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die absolute Zahl vitaler Zellen höher als angegeben anzusetzen ist, da der Trypanblau-Vitalitätstest durch das Ablösen zerstörte Zellen nicht als vital erfasst. Gerade die an der TiO<sub>2</sub>-Beschichtung fester haftenden Zellen werden bei der Ablösung geschädigt und die vitalen Zellen somit im Trypanblautest falsch-niedrig bewertet. Für die AnV+/PI- Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach Wegnahme des pro-apoptischen Stimulus eine Wiederherstellung des Membranasymmetrie und somit der Abbruch des Apoptoseablauf vor Erreichen des „*point of no return*“ erfolgt [Hammill 1999, S. 20]. Des Weiteren wirkt sich die Toxizität des Kupfers auf die rasch proliferierenden pathogenen Keime weit drastischer als auf körpereigene Zellen aus, denen dadurch ein Standortvorteil verschafft wird [Heidenau 2005, S. 887]. Der oben angesprochene autokatalytische Effekt des Titanoxids muss schließlich auch hier mitbedacht werden.

Der Langzeitinkubationsversuch zeigte, dass die Zellen, wenn auch nur sehr langsam, auch auf kupferhaltigen Oberflächen proliferieren können. Dieses Verhalten dürfte sich im weiteren Verlauf, wenn die Freisetzung der Ionen abgeschlossen ist, noch verstärken. Es verbleibt schließlich nur noch die biokompatible TiO<sub>2</sub>-Schicht auf dem Implantat, die eine optimale Integration in das Empfängergewebe ermöglichen soll. Aus unseren Versuchen ließ sich als Trend ein Abfallen der vitalen Zellpopulation mit einem Nadir nach 120h erkennen, worauf jedoch eine Erholungsphase mit erneuter Zunahme der vitalen Zellen folgte. Auch diese Ergebnisse bedürfen weiterer Nachuntersuchungen mit längerer Beobachtungszeit.

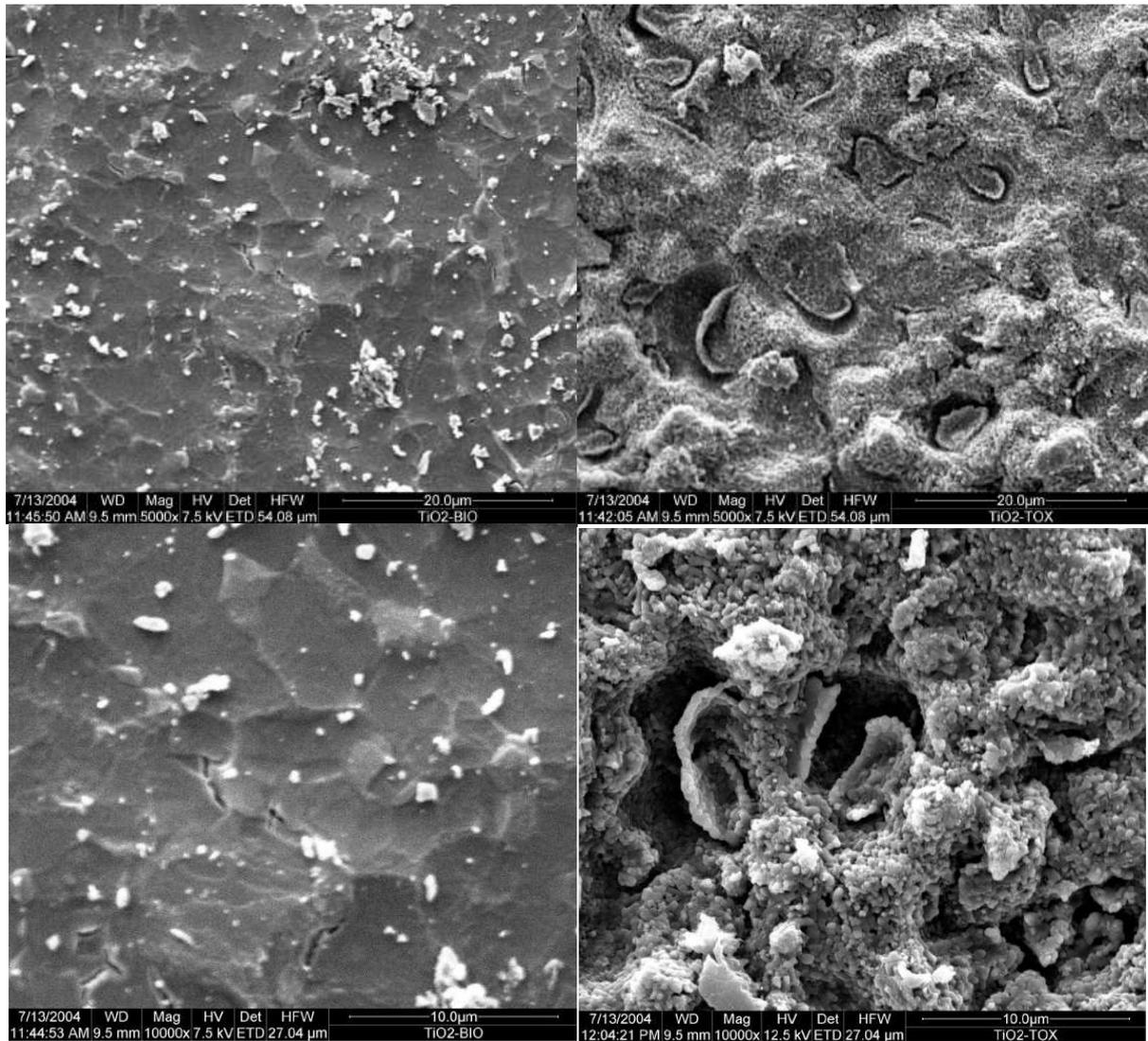
#### **4.2.2 Abhängigkeit der Zytokompatibilität von der Oberflächentopographie**

Neben der chemischen Zusammensetzung der Implantatoberfläche nimmt auch die Oberflächentopographie direkten und indirekten Einfluss auf die adhärenen Zellen sowie Art und Ausmaß der adsorbierten Proteine, die wiederum die zelluläre bzw. bakterielle Adhäsion wie auch die Osteointegration beeinflussen können [Advincula 2005, S. 29; Sader 2005, S. 669]. Damit repräsentiert sie eine weitere relevante Variable zur Beeinflussung der Zytokompatibilität.

Zum einen lässt sich die Oberflächenrauigkeit durch mehrfaches Auftragen der TiO<sub>2</sub>-Schichten vermindern [Advincula 2006, S. 2210], zum anderen kann die Oberfläche maschinell poliert werden. Postiglione oder auch Zhao et al. konnten zeigen, dass glatte Titanoberflächen die Proliferation von Saos-2-Zellen fördern. Eine verstärkte Differenzierung der Zellen hin zu einem osteoblastischen Phänotyp mit Produktion extrazellulärer Matrix und erhöhter Aktivität der alkalischen Knochenphosphatase konnte hingegen mit zunehmender Oberflächenrauigkeit beobachtet werden. Die Autoren gehen von einer besseren

Implantatintegration bei rauhen Implantatoberflächen *in vivo* aus [Postiglione 2003a, S. 696; 2004, S. 221; Zhao 2006, S. 258]. Gollwitzer et al. diskutierten eine verbesserte Zytokompatibilität im Sinne einer erhöhten Proliferationsrate der glatteren, mehrfach beschichteten Oberflächen [Gollwitzer 2003c]. Dies ließ sich von uns nicht nachvollziehen, da in unseren Versuchsreihen mit mehrfacher Beschichtung immer auch eine Erhöhung der Kupferionendosis einherging. Sader et al., die Titanoberflächen unterschiedlicher Rauigkeit verglichen, konnten zeigen, dass rauhe Oberflächen die Differenzierung hin zu einem ECM-produzierenden Osteoblastentypus mit zu vermutender hoher Osteointegrationskapazität fördern, wohingegen Osteoblasten auf glatten Flächen eine flache Form bei höherer Proliferationstätigkeit annehmen und das eingebrachte Implantat im Gewebe einkapseln [Sader 2005, S. 673]. Eisenbarth et al. zufolge, die ebenfalls mit dem Sol-Gel-Verfahren aufgebraute TiO<sub>2</sub>-Beschichtungen analysierten, ergibt sich eine Zunahme von Proliferations- und Adhäsionsgeschwindigkeit mit Abnahme der Oberflächenrauigkeit. Das Maximum von Adhäsionsstärke und Kollagenproduktion fand sich hingegen auf Oberflächen mittlerer Rauigkeit (R<sub>a</sub>=15nm) [Eisenbarth 2006, S.6]. Ergänzend sei auf die Ergebnisse von Zhu et al. hingewiesen, die die Mechanismen der Zelladhäsion auf glatten und porösen Titanoberflächen verglichen, die sich fundamental voneinander zu unterscheiden scheinen. Signifikante Unterschiede in der initialen Zelladhäsionsstärke in Abhängigkeit von der Rauigkeit konnten allerdings nicht bestätigt werden [Zhu 2004, S. 20].

In unseren Studien konnten wir drei Varianten der TiO<sub>2</sub>-Cu-Beschichtungen mit unterschiedlicher Oberflächentopographie untersuchen: polierte und unpolierte Plättchen sowie Proben einer Ausschusscharge, welche eine unregelmäßige und rissige Beschichtung zeigte. Vergleicht man die FACS-Analysen, so ergaben sich für TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> und TiO<sub>2</sub> keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Zellvitalität. Auf den antiinfektiösen Oberflächen hingegen wurde deutlich, dass die polierte 1xCu-TiO<sub>2</sub>-Oberflächenbeschichtung eine deutlich höhere Zytokompatibilität aufwies als die unpolierte Beschichtung und die fehlerhafte Charge. Der Anteil vitaler Zellen auf der polierten und unpolierten Form der 2xCu-Schicht war hingegen identisch, die fehlerhafte rissige Beschichtung schnitt deutlich schlechter ab, was evtl. durch eine schnellere und stärkere Freisetzung von Ionen durch die rissige Beschichtung zu erklären ist. Bei der unpolierten 1xCu-TiO<sub>2</sub>-Beschichtung mag zudem die durch die Rauigkeit vergrößerte Oberfläche mit konsekutiv vermehrter Kupferfreisetzung relevant sein. Auf der 2xCu-TiO<sub>2</sub>-Oberfläche zeigte sich dieser Effekt hingegen nicht.

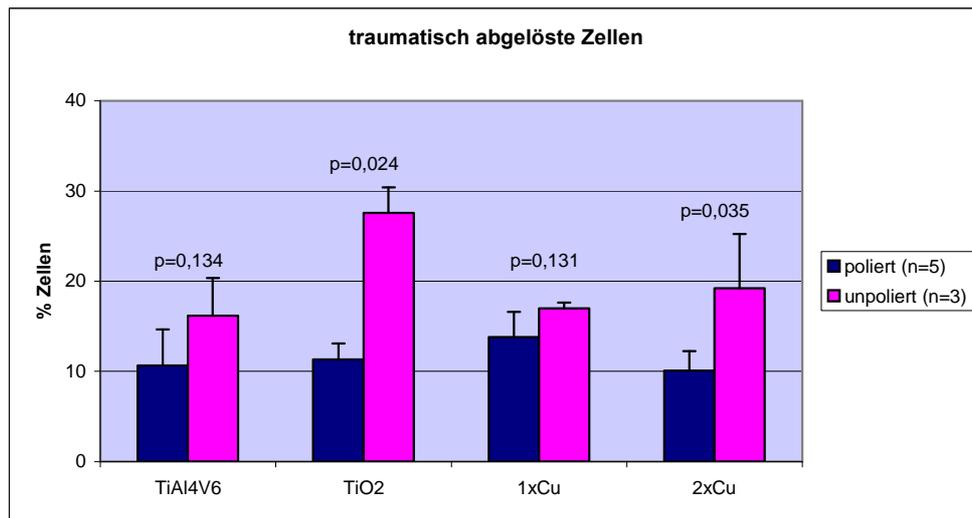


**Abbildung 29:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der unpolierten, biokompatiblen TiO<sub>2</sub>-Beschichtung (links) nach Besiedelung mittels Saos-2-Zellen und Zellablösung. Es zeigt sich eine gleichmäßige Oberfläche mit einzelnen Zellrückständen. Rechts hingegen die rissige und unregelmäßige Oberfläche der fehlerhaften Beschichtung.

Ein Vergleich des Proliferationsverhaltens ergab einen eindeutigen Wachstumsvorteil der Zellen auf glatten kupferhaltigen Flächen (poliert) gegenüber rauen rissigen Beschichtungen (vgl. 3.2). Der direkte Vergleich mit der unpolierten Beschichtung (vgl. 3.3.1) ist nicht möglich, da im Langzeitinkubationsversuch unterschiedliche Zellzahlen angesetzt werden mussten.

Die Beurteilung des Adhäsionsverhaltens anhand des Anteils traumatisch abgelöster Zellen (poliert vs. unpoliert) zeigte hingegen eindeutig, dass sich Saos-2 von rauen unpolierten Oberflächen wesentlich schlechter ablösen lassen als von glattpolierten Flächen. Dies trifft, wie schon unter 4.2.1 erwähnt, insbesondere für TiO<sub>2</sub> ( $p=0,024$ ) und 2xCu-TiO<sub>2</sub> ( $p=0,035$ ) zu (vgl. Abb. 30). In wie weit die Zellen tatsächlich fester anhaften oder möglicherweise auf Grund des andersartigen Adhäsionsmechanismus [Zhu 2004, S.17] nur weniger effektiv durch

Accutase™ abgelöst werden können, sollte Gegenstand weiterer Forschungsbemühungen sein. Postiglione bzw. Li et al. konnten dergleichen zumindest nicht beobachten, legten jedoch einen wesentlich kürzeren Beobachtungszeitraum (3h) zugrunde [Postiglione 2004, S. 220; Li 2006, S.374]. In wie weit die Oberflächentopographie in unserem Falle ebenfalls, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, eine osteoblastische Aktivitätszunahme zu induzieren vermag, sollte ebenfalls näher untersucht werden, da sich hiermit evtl. genauere Vorhersagen über das zu erwartende Osteointegrationspotential des Implantates treffen ließen.



**Abbildung 30:** Vergleich des Adhäsionsverhaltens von Saos-2-Zellen in Abhängigkeit von der Oberflächentopographie (t=72h)

#### 4.2.3 Abhängigkeit der Zytokompatibilität von der Inkubationsdauer

Die Abgabe von Kupferionen aus der Oberflächenbeschichtung im Sinne eines „*slow release drug delivery systems*“ an die Umgebung erfolgt wahrscheinlich nur für wenige Tage, wobei hierzu noch weiterreichende Untersuchungen ausstehen [Heidenau 2005, S. 888]. In dieser Zeit entscheidet sich das „*race for the surface*“. Danach ist das von körpereigenen Zellen integrierte Implantat relativ gut vor bakterieller Besiedlung geschützt [Gristina 1994, S. 107]. In unserem Versuch wollten wir an unpolierten Plättchen die Effekte der unterschiedlichen Beschichtungen auf die Zellen während der entscheidenden frühen Phase nach Implantation ermitteln.

In FACS (vgl. 3.3.1) verhielten sich die Proportionen der verschiedenen Zustandsbilder der Zellen relativ statisch. Die Ausgangswerte entsprachen weitgehend den in den vorangegangenen Versuchen ermittelten Werten, eine eindeutige Kinetik war zumindest bei TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> und TiO<sub>2</sub> nicht auszumachen. Anders verhielt es sich mit 1xCu-TiO<sub>2</sub> und 2xCu-TiO<sub>2</sub>-Beschichtung: Hier erhöhte sich der Anteil lebender Zellen leicht, die Abnahme nekrotischer Zellen war eindeutig.

Bei der Auswertung des Trypanblau-Vitalitätstests zeigte sich einmal mehr der antiproliferative Effekt der Kupferionen. Während sich bei  $1x\text{Cu-TiO}_2$  ohne Mediumwechsel noch eine langsame Erholung der Population auf niedrigem Niveau abzeichnete, schien die  $2x\text{Cu-TiO}_2$ -Beschichtung zunächst annähernd alle vitalen Zellen abgetötet zu haben. Auf den atoxischen Schichten ließ sich eine weit rasantere Wachstumskinetik erkennen: Die Zellzahl nahm in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu, auf  $\text{TiO}_2$  erneut langsamer als auf  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ . Durch den Mediumwechsel wurde die Zellzahl massiv reduziert, was verschiedene Ursachen haben kann. Zum einen lösen sich mitotische Saos-2-Zellen kurzzeitig zum Zwecke der Teilung vom Boden ab und könnten bei einem Mediumwechsel entfernt werden. Saos-2 sind als maligne Tumorzellen (Osteosarkomzellen) allgemein nicht allzu adhärenzabhängig: Sie können auch in halbfestem Medium und in Form einander lose überwuchernder Zellagen wachsen. Auch solche weniger stark haftenden Zellen könnten entfernt werden. Da sich auch apoptotische und nekrotische Zellen von der Oberfläche ablösen, reduziert sich deren Zahl ebenfalls [van Engeland 2000, S.671; Clarke 2000, S. 149; Suska 2005b, S. 5948]. Der Mediumwechsel würde sich auch dann als nachteilig für die Zellen erweisen, wenn diese als Abwehrmaßnahme beispielsweise komplexierende Proteine gegen die Kupferionen abscheiden, die durch den ständigen Mediaustausch entfernt würden. Die Zellen sähen sich somit immer wieder einem neuen Übergewicht der Ionen ausgesetzt und würden sich in der Produktion defensiver Stoffe regelrecht erschöpfen. Zudem würden bis zur Einstellung eines Lösungsgleichgewichts immer wieder neue, aktive Ionen in Lösung gehen, die die Zellen schädigen. Auch diese Mechanismen sind noch weitgehend unverstanden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

#### **4.2.4 Allgemeine Bewertung der Oberflächenbeschichtungen und Ausblick**

Versucht man sich in einer allgemeinen, zusammenfassenden Bewertung der untersuchten kupferhaltigen Titanoxidbeschichtung, gilt es, alle einzelnen im vorangegangenen beleuchteten Facetten auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen. Die Untersuchungsergebnisse erlauben es dabei derzeit nicht, einem bestimmten Beschichtungstypus den generellen Vorzug einzuräumen. Individuell angepasste, sog. „*custom made*“-Beschichtungen erscheinen jedoch realisierbar.

Auf den glatten Beschichtungen zeigte sich eine gesteigerte Zellproliferation, wohingegen die Zellen auf den raueren Oberflächen besser zu adhären scheinen. Zudem kann hier eine gesteigerte osteoblastische Zelldifferenzierung erhofft werden [Postiglione 2003a, S. 696; 2004, S. 221; Sader 2005, S. 673; Eisenbarth 2006; Zhao 2006, S. 258]. Die fehlerhafte

Schicht schnitt durchweg schlechter ab, was die Notwendigkeit einer regelmäßigen Qualitätskontrolle bei derartigen Herstellungsprozessen unterstreicht.

Von den antiinfektiösen Beschichtungen lieferten polierte 1x- bzw. 2xCu-TiO<sub>2</sub>-beschichtete Proben, sowie die unpolierte 1xCu-Beschichtung die besten Gesamtergebnisse. In wie weit einer glatten Beschichtung mit höheren Proliferationsraten oder eine raueren Beschichtung mit möglicherweise günstigerer Zelldifferenzierung und besserer Osteointegration der Vorzug gegeben werden muss, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Auch der autokatalytische Effekt der TiO<sub>2</sub>-Beschichtung muss weiter quantifiziert werden: Zum einen, um den Einfluss auf die Zytokompatibilität der Beschichtung abzuschätzen. Zum anderen könnte über die Autokatalyse auch eine zusätzliche antibakterielle Wirksamkeit erreicht werden.

Ob die verminderte Proliferationsgeschwindigkeit auf unpolierten Cu-haltigen Oberflächen jedoch mit der verminderten Zytokompatibilität unter Einfluss der Kupferionen oder aber einer topographisch bedingten Änderung des Phänotyps der Zellen mit Sekretion osteoblastentypischer Extrazellulärmatrix zusammenhängt, ist nicht konkludent beurteilbar. Dies zu erkennen ist aber für eine korrekte Einschätzung der Zytokompatibilität, die schon durch geringe Veränderungen von Topographie und Zusammensetzung der jeweiligen Beschichtung manipulierbar ist, unabdingbar [Ahmad 1999b]. Daher sollte in weiteren Versuchen die Differenzierung der Zellen auf den unterschiedlichen Oberflächen untersucht werden. Durch die unterschiedlichen Beschichtungsmodifikationen scheint in jedem Falle eine indikationsabhängige maßgeschneiderte Anpassung der Oberflächeneigenschaften – je nach Infektionsrisiko - möglich.

Wie bei jedem Fremdkörper, ist auch bei Einbringen der hier vorgestellten Beschichtung in einen Empfängerorganismus die Induktion einer mehr oder weniger starken inflammatorischen Reaktion zu erwarten. Suska et al. konnten zeigen, dass durch Titanimplantate eine transiente inflammatorische Antwort ausgelöst wird, wohingegen es durch Kupfer zu einer prolongierten Entzündungsreaktion mit hohem Influx inflammatorischer Zellen, gesteigerter IL-6-Produktion und Absterben von Zellen kam. Die Profile der ausgeschütteten chemotaktischen Enzyme auf beiden Metallen sind dabei stark unterschiedlich, der Ablauf der jeweiligen Enzymkaskaden zum großen Teil noch weitgehend unverstanden und ebenfalls weiter untersuchungsbedürftig [Suska 2001, S. 943; 2003, S.466; 2005a, S.525].

Trotz der Vielzahl an vorliegenden *in-vitro*-Daten wird nur ein groß angelegter *in-vivo*-Versuch die Verträglichkeit und antiinfektiöse Potenz der modifizierten Implantate definitiv

klären können. Dies gilt insbesondere unter Beachtung der komplexen Interaktion aus Zellen des Stütz- und Bewegungsapparats, immunologischen Faktoren sowie Bakterien. Sollten sich die kupferhaltigen Titanoxidbeschichtungen schließlich auch darin als ausreichend zytokompatibel erweisen, ist durch ihren klinischen Einsatz eine deutliche Reduktion der implantatassoziierten Infektionen zu erhoffen. Dies betrifft in erster Linie die Früh- und die verzögerten Infektionen, da in diesen Fällen die dem Implantat zum Implantationszeitpunkt anhaftenden Bakterien direkt durch die Kupfertoxizität reduziert werden könnten.

## **5 Zusammenfassung**

Implantatassoziierte Infektionen in Orthopädie und Unfallchirurgie stellen trotz bedeutender Fortschritte in Therapie und Prophylaxe auch heute noch gefürchtete Komplikationen im klinischen Alltag dar. Ein Ansatz zur Verhinderung derartiger Infektionen ist die antiinfektiöse und antiadhäsive Modifikation der Implantatoberflächen, in der vorliegenden Arbeit in Form einer auf dem Sol-Gel-Verfahren basierenden Titanoxidbeschichtung, in die Kupferionen in unterschiedlicher Dosierung eingearbeitet werden können. Die Titanoxidschicht soll dabei die Zytokompatibilität des Implantats erhöhen, die Kupferionen die Bakterien in der unmittelbaren Umgebung des Implantats abtöten. Beides ist von essentieller Bedeutung für eine dauerhafte und komplikationslose Implantateinheilung.

Ziel der Arbeit war es, einen geeigneten Test zur Untersuchung der Zytokompatibilität der verschiedenen Beschichtungsvarianten zu etablieren und diesen anschließend im Rahmen von Zytokompatibilitätsstudien praktisch anzuwenden.

Bei der Bestimmung der Zytokompatibilität einer Oberfläche ist die Unterscheidung avitaler Zellen in nekrotische und apoptotische Zellen von klinischer Relevanz, da sich in der Regel nur dem nekrotischen Zelltod *in vivo* eine inflammatorische Reaktion anschließt. Ein für derartige Untersuchungen geeignetes Testsystem ist der FACS-gestützte AnnexinV-Propidiumjodid-Assay, der noch nicht im Rahmen eines Zytokompatibilitätstests Verwendung fand. Als Testzellen wurden osteoblastenähnliche Saos-2-Zellen ausgewählt.

Die Hauptproblematik bei der Etablierung des Test bestand in der gleichzeitigen Verwendung von AnnexinV, das an von apoptotischen Zellen präsentiertes Phosphatidylserin bindet, und der Notwendigkeit, die Zellen von den Kulturoberflächen abzulösen. Wie vielfach in der Literatur beschrieben, wird die Phosphatidylserinpräsentation durch Trypsin-EDTA massiv gestört und das Ausmaß der Annexinbindung beeinflusst. Die alternativ erprobte Ablösung der Zellen mit dem mechanischen Zellschaber führte zu Zellschäden und erzeugte auf den Beschichtungsproben störende Abriebpartikel. Mit Accutase™ konnte hingegen ein enzymatisches Zellablösereagenz gefunden werden, mit dem ein störungsarmes Ablösen möglich war. Die Anwendung im Rahmen des Zytokompatibilitätstests gelang problemlos. Ergänzend wurde zur Bestimmung der Zellzahl ein Trypanblau-Vitalitätstest durchgeführt.

Der von uns etablierte Test zeichnet sich durch die schnelle (Einzelzell-)Messung großer Zellmengen, hohe Sensitivität, die Analyse verschiedener Parameter sowie adhärenter und nicht-adhärenter Zellen zur gleichen Zeit aus. Damit wird die relativ unkomplizierte und zuverlässige Analyse von Apoptose und Nekrose adhärenter Zellen möglich, die sich hervorragend für Zytokompatibilitätsstudien nutzen lässt.

Bei den anschließenden Zytokompatibilitätsuntersuchungen wurden folgende Oberflächen mit unterschiedlicher Oberflächenstruktur (poliert, unpoliert, fehlerhaft) verglichen: Polystyren (Kontrolle),  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $1\text{xCu-TiO}_2$ ,  $2\text{x-Cu-TiO}_2$  und  $3\text{xCuTiO}_2$ . Dabei zeigte sich in beiden Tests eine deutliche Abnahme der Zytokompatibilität mit steigender Kupfermenge. Die Polierung der kupferhaltigen Oberflächen wirkte sich positiv auf Vitalität und Proliferation der Zellen aus. In einem Langzeitinkubationsversuch konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl nach initial drastischer Abnahme auf den kupferhaltigen Proben nach kurzer Zeit wieder zu steigen beginnt. Die Zytokompatibilität der  $\text{TiO}_2$ -Beschichtung unterschied sich nicht signifikant von der  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ -Oberfläche. In allen Teilversuchen nahm die Zytokompatibilität weniger durch forcierte Apoptose/Nekrose, als vielmehr durch eine herabgesetzte Proliferationsrate ab. Dies macht die Kombination des FACS-Assays mit einem quantitativen Test wie dem Trypanblau-Vitalitätstest sinnvoll. Insgesamt zeigten auch die kupferhaltigen Oberflächenbeschichtungen (1x und 2x) insbesondere im Langzeitversuch eindeutig zytokompatibles Verhalten, sodass nun weitere Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf Proteinadhäsion, Sekretion osteoblastentypischer Extrazellulärmatrix und *in vivo* Verhalten durchgeführt werden sollten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Advincula MC, Fan X, Lemons J, Advincula R. Surface modification of sol-gel derived titanium oxide films by self-assembled monolayers (SAMs) and non-specific protein adsorption studies. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2005; 42: 29-43
- Advincula M, Rahemtulla FG, Advincula RC, Ada ET, Lemons JE, Bellis SL. Osteoblast adhesion and matrix mineralization on sol-gel-derived titanium oxide. *Biomaterials* 2006; 27: 2201-2212
- Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G. An in vitro model for human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999a; 20: 211-220
- Ahmad M, Gawronski D, Blum J, Goldberg J, Gronowicz G. Differential response of human osteoblast-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4. *J Biomed Mater Res* 1999b; 46: 121-131
- Ahearn DG, May LL, Gabriel MM. Adherence of organisms to silver-coated surfaces. *J Ind Microbiol* 1995; 15: 372-376
- Amezaga-Madrid P, Silveyra-Morales R, Cordoba-Fierro L, Nevarez-Moorillon GV, Miki-Yoshida M, Orrantia-Borunda E, Solis FJ. TEM evidence of ultrastructural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO<sub>2</sub> thin films. *J Photochem Photobiol B* 2003; 70 : 45-50
- Bauer TW, Schils J. The pathology of total joint arthroplasty. II. Mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiol* 1999; 28: 483-497
- Bayston R, Rodgers J. Production of extra-cellular slime by *Staphylococcus epidermidis* during stationary phase of growth: Its association with adherence to implantable devices. *J Clin Pathol* 1990; 43: 866-870
- Becton Dickinson. Trainingshandbuch: Durchflusszytometrie FACSCalibur™. Becton Dickinson Deutschland. Heidelberg 1999; S. 2
- Bengtson S, Knutson K. The infected knee arthroplasty. A 6-year follow-up of 357 cases. *Acta Orthop Scand* 1991; 62: 301-311
- Bengtson S. Prosthetic osteomyelitis with special reference to the knee: Risks, treatment and costs. *Ann Med* 1993; 25: 523-529
- Carbon RT, Lugauer S, Geitner U, Regenfus A, Boswald M, Greil J, Bechert T, Simon SI, Hummer HP, Guggenbichler JP. Reducing catheter-associated infections with silver-impregnated catheters in long-term therapy of children. *Infection* 1999; 27 Suppl 1: S69-73
- Catelas I, Petit A, Vali H, Fragiskatos C, Meilleur R, Zukor DJ, Antoniou J, Huk OL. Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro. *Biomaterials* 2005; 26: 2441-2453
- Choi JY, Kim KH, Choy KC, Oh KT, Kim KN. Photocatalytic antibacterial effect of TiO<sub>2</sub> film formed on Ti and TiAg exposed to *Lactobacillus acidophilus*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 80: 353-359
- Clarke RG, Lund EK, Johnson IT, Pinder AC. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using Annexin-V binding, but not by TUNEL assay or sub-G<sub>0</sub> DNA content. *Cytometry* 2000; 39: 141-150
- Collatz KG. Apoptose. in: [www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/bio/4488](http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/bio/4488), 1998

- Corver WE, Cornelisse CJ, Hermans J, Fleuren GJ. Limited loss of nine tumor-associated surface antigenic determinants after tryptic cell dissociation. *Cytometry* 1995; 19: 267-272
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22
- Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003; 44: 233-242
- Darouiche RO, Landon GC, Patti JM, Nguyen LL, Fernau RC, McDevitt D, Greene C, Forster T, Klima M. Role of *staphylococcus aureus* surface adhesins in orthopaedic device infections: Are results model-dependent? *J Med Microbiol* 1997; 46: 75-79
- Darouiche RO, Raad II, Heard SO, Thornby JI, Wenker OC, Gabrielli A, Berg J, Khardori N, Hanna H, Hachem R, Harris RL, Mayhall G. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. *N Engl J Med* 1999; 340: 1-8
- Darouiche RO. Antimicrobial approaches for preventing infections associated with surgical implants. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1284-1289
- Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004; 350: 1422-1429
- Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2000; 46: S47-52
- Eisenbarth E, Velten D, Breme J. Biomimetic implant coatings. *Biomol Eng* 2006; 24: 27-32
- Elek SD, Conen PE. The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man: A study of the problems of wound infection. *Br J Exp Pathology* 1957; 38: 573-586
- Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: A review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 473-490
- Eynon-Lewis NJ, Ferry D, Pearse MF. Themistocles Gluck: an unrecognised genius. *BMJ* 1992; 305: 1534-6
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-2216
- Filippini P, Rainaldi G, Ferrante A, Mecheri B, Gabrielli G, Bombace M, Indovina PL, Santini MT. Modulation of osteosarcoma cell growth and differentiation by silane-modified surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 338-49
- Gabriel MM, Mayo MS, May LL, Simmons RB, Ahearn DG. In vitro evaluation of the efficacy of a silver-coated catheter. *Curr Microbiol* 1996; 33: 1-5
- Gallo J, Kolár M, Novotný R, Riháková P, Tichá V. Pathogenesis of prosthesis-related infection. *Biomed Papers* 2003; 147: 27-35
- Garvin KL, Hinrichs SH, Urban JA. Emerging antibiotic-resistant bacteria. Their treatment in total joint arthroplasty. *Clin Orthop* 1999; 369: 110-123
- Gauger A, Mempel M, Schekatz A, Schafer T, Ring J, Abeck D. Silver-coated textiles reduce *Staphylococcus aureus* colonization in patients with atopic eczema. *Dermatology*. 2003; 207: 15-21

- Geipel U, Herrmann M. Das infizierte Implantat. Teil 1: Bakteriologie. *Orthopäde* 2004; 33: 1411-1428
- Gollwitzer H, Meyer H, Stemberger A. Implantatinfektionen und Strategien zur antibakteriellen Beschichtung. *Trauma Berufskrankh* 2003a; 5: S347-S352
- Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A. Antibacterial poly(D,L-lactid acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother* 2003b; 51: 585-591
- Gollwitzer H, Heidenau F, Stenzel F, von Eiff C, Ziegler G, Mittelmeier W. A biocompatible sol-gel derived titania coating for medical implants with antibacterial modification by copper integration. Zur Publikation eingereicht. 2003c
- Gollwitzer H, Heidenau F, Stenzel F, Haenle M, Ziegler G, Mittelmeier W. Titania coating as a local „drug“ delivery system with antibacterial and biocompatible properties. In: *Transactions 7th World Biomaterial Congress, Sydney 2004*. Australian Society for Biomaterials, Brunswick Lower, Australia, 172.
- Gollwitzer H, Diehl P, Gerdesmeyer L, Mittelmeier W. Diagnostische Strategien bei Verdacht auf periprothetische Infektion einer Kniegelenktotalendoprothese. Literaturübersicht und aktuelle Empfehlungen. *Orthopäde* 2006a; 35: 904-916
- Gollwitzer H, Gerdesmeyer L. Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtung. In: Grading R, Gollwitzer H. (Hrsg.). *Ossäre Integration*. Springer Verlag 2006b. ISBN 978-3-540-22721-2
- Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987; 237: 1588-1595
- Gristina AG, Dobbins JJ, Giammara B, Lewis JC, DeVries WC. Biomaterial-centered sepsis and the total artificial heart. Microbial adhesion vs tissue integration. *JAMA* 1988; 259: 870-874
- Gristina AG, Naylor PT, Myrvik QN. Mechanisms of musculoskeletal sepsis. *Orthop Clin North Am* 1991; 22: 363-371
- Gristina AG, Giridhar G, Gabriel BL, Naylor PT, Myrvik QN. Cell biology and molecular mechanisms in artificial device infections. *Int J Artif Organs* 1993; 16: 755-763
- Gristina AG. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop* 1994; 298: 106-118
- Hammill AK, Uhr JW, Scheuermann RH. Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment of apoptotic death. *Exp Cell Res* 1999; 251: 16-21
- Hanna HA, Raad II, Hackett B, Wallace SK, Price KJ, Coyle DE, Parmley CL, M. D. Anderson Catheter Study Group. Antibiotic-impregnated catheters associated with significant decrease in nosocomial and multidrug-resistant bacteremias in critically ill patients. *Chest* 2003; 124: 1030-1038
- Hausser HJ, Brenner RE. Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 216-222
- Heidenau F, Stenzel F, Schmidt H, Ziegler G. Offenporige, bioaktive Oberflächenbeschichtung auf Titan. *BIOMaterialien* 2001; 2: 19-24

- Heidenau F, Mittelmeier W, Detsch R, Haenle M, Stenzel F, Ziegler G, Gollwitzer H. A novel antibacterial titania coating: Metal ion toxicity and *in vitro* surface colonization. *J Mater Sci: Mater in Med* 2005; 16: 883-888
- Hoppmann JT. Beitrag zur Rolle von Keratinozyten für die Aktivierung und Regulation von immunologisch bedingten Abwehrreaktionen der Haut. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Justus-Liebig-Universität Giessen 2002
- Hotta T, Suzuki H, Nagai S, Yamamoto K, Imakiire A, Takada E, Itoh M, Mizuguchi J. Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J Orthop Res* 2003; 21: 949-957
- Kielemoes J, Varstraete W. Influence of copper-alloying of austenitic stainless steel on multi-species biofilm development. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 148-152
- Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A. Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clin Orthop* 2002; 404: 116-124
- King MA. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000a; 243: 155-166
- King MA, Radicchi-Mastroianni MA, Wells JV. There is substantial nuclear and cellular disintegration before detectable phosphatidylserine exposure during the camptothecin-induced apoptosis of HL-60 cells. *Cytometry* 2000b; 40: 10-18
- Kirkpatrick D, Gandhi R, Van Sickels JE. Infections associated with locking reconstruction plates: A retrospective review. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 462-466
- Kiwi J, Nadtochenko V. Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wallmembrane at the TiO<sub>2</sub> interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy. *Langmuir*. 2005; 21: 4631-4641
- Kramhoft M, Bodtker S, Carlsen A. Outcome of infected total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 1994; 9: 617-621
- Kuhn KP, Chaberny IF, Massholder K, Stickler M, Benz VW, Sonntag HG, Erdinger L. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere* 2003; 53: 71-77
- Lauricella M, Calvaruso G, Carabillò M, D'Anneò A, Giuliano M, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. pRb suppresses camptothecin-induced apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells by inhibiting c-Jun N-terminal kinase. *FEBS letters* 2001; 499: 191-197
- Lassus P, Hibner U. Detection and quantification of apoptosis in transiently transfected adherent cells. *Nucleic Acids Research* 1998; 26: 5233-5234
- Lecoeur H, Prévost MC, Gougeon ML. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration on the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry* 2001; 44: 65-72
- Lecoeur H, de Oliveira-Pinto LM, Gougeon ML. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods* 2002; 265: 81-96

- Lee JH, Kang M, Choung SJ, Ogino K, Miyata S, Kim MS, Park JY, Kim JB. The preparation of TiO<sub>2</sub> nanometer photocatalyst film by a hydrothermal method and its sterilization performance for *Giardia lamblia*. *Water Res.* 2004; 38: 713-719
- Lentino JR. Prosthetic joint infections: Bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1157-1161
- Li C, Gao S, Terashita T, Shimokawa T, Kawahara H, Matsuda S, Kobayashi N. In vitro assay for adhesion and migration of osteoblastic cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 369-375
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *staphylococcus epidermidis* is a linear  $\beta$ -1,6-linked glucosaminoglycan: Purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996; 178: 175-183
- Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang Z, Wolfrum EJ, Jacoby WA. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: towards an understanding of its killing mechanism. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4094-4098
- Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader J, van Schie RCAA, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. Inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *J Exp Med* 1995; 182: 1545-1556
- Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange versus propidium iodide. *Transfusion* 2000; 40: 693- 696
- Matsunaga T, Kojo T, Tsujisawa T, Fukuizumi T, Wada S, Uchida Y, Inoue H. Preferential degradation of osteoclasts by titanium tetrachloride. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 313-319
- Micoud F, Mandrand B, Malcus-Vocanson C. Comparison of several techniques for the detection of apoptotic astrocytes *in vitro*. *Cell Prolif* 2001; 34: 99-113
- Mulligan AM, Wilson M, Knowles JC. The effect of increasing copper content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. *Biomaterials* 2003; 24: 1797-1807
- Murdoch DR, Roberts SA, Fowler VG jr., Shah MA, Taylor SL, Morris AJ, Corey GR. Infection of orthopedic prosthesis after *staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Inf Dis* 2001; 32: 647-649
- Nasser S. The incidence of sepsis after total hip replacement arthroplasty. *Semin Arthroplasty* 1994; 5: 153-159
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139: 271-279
- Olson ME, Harmon BG, Kollef MH. Silver-coated endotracheal tubes associated with reduced bacterial burden in the lungs of mechanically ventilated dogs. *Chest* 2002; 121: 863-870
- Olsson J, van der Heijde Y, Holmberg K. Plaque formation *in vivo* and bacterial attachment *in vitro* on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Caries Res* 1992; 26: 428-433
- Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: Lessons for new designs. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 256-264

- Perdreau-Remington F, Stefanik D, Peters G, Ludwig C, Rutt J, Wenzel R, Pulverer G. A four-year prospective study on microbial ecology of explanted hips in 52 patients with “aseptic” prosthetic joint loosening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 160-165
- Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, Salzano S, Di Meglio F, Sbordone L, Vitale M, Rossi G. Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J Dent Res* 2003a; 82: 692-696
- Postiglione L, Di Domenico G, Giordano-Lanza G, Ladogana P, Turano M, Castaldo C, Di Meglio F, Coccozza S, Montagnani S. Effect of human granulocyte macrophage-colony stimulating factor on differentiation and apoptosis of the human osteosarcoma cell line SaOS-2. *Eur J Histochem* 2003b; 47: 309-316
- Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Di Lauro AE, Di Meglio F, Montagnani S. Different titanium surfaces modulate the bone phenotype of SaOS-2 osteoblast-like cells. *Eur J Histochem* 2004; 49: 213-222
- Pucci B, Bellincampi L, Tafani M, Masciullo V, Melino G, Giordano A. Paclitaxel induces apoptosis in Saos-2 cells with CD95L upregulation and Bcl-2 phosphorylation. *Exp Cell Res* 1999; 252: 134-143
- Raulio M, Pore V, Areva S, Ritala M, Leskela M, Linden M, Rosenholm JB, Lounatmaa K, Salkinoja-Salonen M. Destruction of *Deinococcus geothermalis* biofilm by photocatalytic ALD and sol-gel TiO<sub>2</sub> surfaces. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006; 33: 261-268.
- Roche Molecular Biochemicals. Apoptosis and cell proliferation. 2<sup>nd</sup> revised edition. Eisel D, Fertig G, Fischer B, Manzow S, Moritz A, Schmelig K (eds.). Roche
- Rüttimann B. Anfänge der Hüftchirurgie – heroische Zeiten? *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1990; 128: 243-248
- Sader MS, Balduino A, de Almeida Soares G, Borojevic R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation and differentiation. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 667-675
- Salih FM. Enhancement of solar inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *J Appl Microbiol.* 2002; 92: 920-926
- Sandrock R, Wheatley W, Drees E, Lualhati M, Kamb A, Caponigro G. A genetic selection method for expression products that induce apoptosis in adherent mammalian cell lines. *Apoptosis* 2003; 8: 209-219
- Schierholz JM, Lucas LJ, Rump AFE, Pulverer G. Efficacy of silver-coated medical devices. *J Hosp Infect* 1998; 40: 257-262
- Schierholz JM, Morszeck C, Brenner N, König DP, Yücel N, Korenkov M, Neugebauer E, Rump AFE, Waalenkamp G, Beuth J, Pulverer G, Arens S. Besonderheiten der implantatassoziierten Infektion in der orthopädischen Chirurgie. Von der Pathophysiologie zu maßgeschneiderten Präventionsstrategien. *Orthopäde* 2004; 33: 397-404
- Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. Bactericidal activity of copper-deposited TiO<sub>2</sub> thin film under weak UV light illumination. *Environ Sci Technol* 2003;37: 4785-4789
- Steckelberg JM, Osmon DR. Prosthetic joint infections. In: Waldvogel FA, Bisno AL (eds.). *Infections associated with indwelling medical devices*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2000: 173-209

- Stocks G, Janssen HF. Infection in patients after implantation of an orthopedic device. *ASAIO J* 2000; 46: S41-46
- Suska F, Källtorp M, Esposito M, Gretzer C, Tengvall P, Thomsen P. *In vivo/ex vivo* cellular interactions with titanium and copper. *J Mater Sci: Mater in Med* 2001; 12: 939-944
- Suska F, Esposito M, Gretzer C, Källtorp M, Tengvall P, Thomsen P. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion during *in vivo/ex vivo* cellular interactions with titanium and copper. *Biomaterials* 2003; 24: 461-468
- Suska F, Gretzer C, Esposito M, Emanuelsson L, Wennerberg A, Tengvall P, Thomsen P. *In vivo* cytokine secretion and NF- $\kappa$ B activation around titanium and copper implants. *Biomaterials* 2005a; 26: 519-527
- Suska F, Gretzer C, Esposito M, Tengvall P, Thomsen P. Monocyte viability on titanium and copper coated titanium. *Biomaterials* 2005b; 26: 5942-5950
- Tang L, Eaton JW. Inflammatory responses to biomaterials. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 466-471
- van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996; 24: 131-139
- van Engeland M, Kuijpers HJH, Ramaekers FCS, Reutelingsperger CPM, Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 235: 421-430
- van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31: 1-9
- van Engeland M, van den Eijnde SM, van Aken T, Vermeij-Keers C, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Detection of apoptosis in ovarian cells *in vitro* and *in vivo* using the Annexin V-affinity assay. In: Bartlett JMS (ed.). *Methods in Molecular Medicine, Vol. 39: Ovarian Cancer: Methods and Protocols*. Humana Press, Inc., Totowa, NJ 2000; 669-675
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51
- von Eiff C, Heilmann C, Peters G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 843-846
- von Eiff C, Kipp F, Peters G. Pathogenese, Diagnose und Prävention von fremdkörperassoziierten Infektionen. *Internist* 2000; 41: 1180-1188
- von Stein T, Gollwitzer H, Kruis C, Bühren V. Arthrodesis nach Knieendoprothetik am Beispiel der septischen Lockerung. *Orthopaede* 2006; 35: 946-955
- Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing of biofilm factors in *staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 2003; 188: 706-718
- Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, Ploetz S, Vroemen M, Kaesbauer J, Uyanik G, Klucken J, Karl C, Tebbing J, Svendsen C, Weidner N, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. *Laboratory Investigation* 2003; 83: 949-962

- Weikert C, Eppenberger-Eberhardt M, Eppenberger HM. Cellular engineering of ventricular adult rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 874-882
- Wessinghage D. Themistocles Gluck - 100 Jahre künstlicher Gelenkersatz. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1991; 129: 383-388
- Wessinghage D. Historische Aspekte des Gelenkersatzes – Eine bibliographische Studie. *Orthopäde* 2000; 29: 1067-1071
- Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis* 2001; 33: S94-106
- Williams DF. Consensus and definitions in biomaterials. In: *Advances in biomaterials*, 8. de Putter C, de Lange K, de Groot K, Lee AJC (eds.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1988
- Wintermantel E, Suk-Woo H. *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. 3. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York 2002
- Yuan J, Murrell GAC, Trickett A, Wang MX. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *BBA* 2003; 1641: 35-41
- Zachowski A, Henry JP, Devaux PF. Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature* 1989; 340: 75-76
- Zamai L, Canonico B, Luchetti F, Ferri P, Melloni E, Guidotti L, Cappellini A, Cutroneo G, Vitale M, Papa S. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells. *Cytometry* 2001; 44: 57-64
- Zhang AP, Sun YP. Photocatalytic killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2004; 10: 3191-3193
- Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 258-264
- Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D. Cellular reactions of osteoblasts to micron- und sub-micron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 13-22
- Ziller R. Zur Geschichte des künstlichen Gelenkersatzes. *Beitr Orthop Traumatol* 1984; 31: 526-532
- Zimmerli W, Ochsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection* 2003; 31: 99-108
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004; 351: 1645-1654

## **7 Abkürzungen**

AnV	Annexin-V-Fluorescein
Cam	Camptothecin
BSA	bovine serum albumin
ECM	extrazelluläre Matrix
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fa.	Firma
FACS	fluorescence assisted cell sorter
FL1-3	Fluoreszenz 1-3 (Messkanäle im FACS)
FLUOS	5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
FSC	forward light scatter
FBS	Fetal bovine serum
G	Grundfluoreszenz
LL	lower left (linker unterer Quadrant im Dotplot)
LR	lower right (rechter unterer Quadrant im Dotplot)
MW	Mediumwechsel
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumjodid
PS	Polystyren
SSC	side light scatter
TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub>	Titanaluminiumvanadium
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TUNEL	Terminal-Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP nick end labeling
UL	upper left (linker oberer Quadrant im Dotplot)
UR	upper right (rechter oberer Quadrant im Dotplot)
WST-1	4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene-disulfonat
7-AAD	7-amino-actinomycin D

## **8 Abbildungen**

<b>Abbildung 1:</b> <i>links</i> –infizierte Kniegelenksendoprothese	8
<b>Abbildung 2:</b> Radiologische Zeichen der septischen Prothesenlockerung	9
<b>Abbildung 3:</b> <i>links</i> - Biofilmbildung und Schutz der Bakterien vor Immunabwehr und Antibiotika; <i>rechts</i> – Biofilmbildender <i>Staphylococcus epidermidis</i>	11
<b>Abbildung 4:</b> Zytomorphologischer Vergleich von Apoptose und Nekrose	17
<b>Abbildung 5:</b> Translokation von Phosphatidylserin während der Apoptose	18
<b>Abbildung 6:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme apoptotischer und nekrotischer U937 Zellen nach AnV/PI Doppelfärbung	19
<b>Abbildung 7:</b> Entstehung von FSC und SSC im FACS	19
<b>Abbildung 8:</b> Bauprinzip eines FACS	20
<b>Abbildung 9:</b> unpolierte und polierte TiAl6V4-Plättchen	27
<b>Abbildung 10:</b> Zeitlicher Apoptoseablauf von Saos-2 nach Camptothecinexposition	36
<b>Abbildung 11:</b> Abhängigkeit des Apoptoseablaufs von der eingesetzten Camptothecinkonzentration nach 48h	37
<b>Abbildung 12:</b> Auswaschen von PI mit DMEM	38
<b>Abbildung 13:</b> Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA	39
<b>Abbildung 14:</b> Ablösen der Zellen mit Accutase™	40
<b>Abbildung 15:</b> Ablösen der Zellen mit AccuMax™	40
<b>Abbildung 16:</b> Ablösen der Zellen mit dem Zellschaber	41
<b>Abbildung 17:</b> Partikelmessung	42
<b>Abbildung 18:</b> AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf fehlerhaft beschichteten Plättchen (Dotplot)	43
<b>Abbildung 19:</b> AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf fehlerhaft beschichteten Plättchen (Diagramm)	44
<b>Abbildung 20:</b> AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf polierten Plättchen (Dotplot)	45
<b>Abbildung 21:</b> AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf polierten Plättchen (Diagramm)	46
<b>Abbildung 22:</b> AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf unpolierten Plättchen (Diagramm)	46
<b>Abbildung 23:</b> Trypanblau-Vitalitätstest auf fehlerhaft beschichteten Plättchen	48
<b>Abbildung 24:</b> Trypanblau-Vitalitätstest auf polierten Plättchen	49

<b>Abbildung 25:</b> Zeitliche Abhängigkeit der Zytokompatibilität auf unterschiedlichen unpolierten Oberflächenbeschichtungen mit und ohne Mediumwechsel (FACS)	50
<b>Abbildung 26:</b> Vergleich des Anteils durch Ablösen zerstörter Zellen (UL) im FACS	51
<b>Abbildung 27:</b> Zeitliche Abhängigkeit der Zytokompatibilität auf unterschiedlichen Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen (Trypanblau-Vitalitätstest)	53
<b>Abbildung 28:</b> <i>links</i> - Saos-2 nativ; <i>rechts</i> - 5 Min. nach Inkubation mit Accutase™	57
<b>Abbildung 29:</b> <i>links</i> - Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der unpolierten, biokompatiblen TiO <sub>2</sub> -Beschichtung nach Besiedelung mittels Saos-2-Zellen und Zellablösung; <i>rechts</i> - Oberfläche der fehlerhaften Beschichtung.	69
<b>Abbildung 30:</b> Vergleich des Adhäsionsverhaltens von Saos-2-Zellen in Abhängigkeit von der Oberflächentopographie	70

## 9 Anhang

### 1. FACS-Einstellung auf Zellen und Farbstoffe

Auf die Notwendigkeit, den Zweck und die Durchführung der Geräteeinstellung am FACS wurde unter 2.2.5.2 ausführlich hingewiesen. Zur Ermittlung der optimalen Geräteeinstellungen leiteten wir die Apoptose standardisiert mit Hilfe des Topoisomerase-I-Inhibitors Camptothecin (Cam) ein. Die für die Versuche ohne Accutase™ im Folgenden verwendeten Geräteeinstellungen betragen:

<u>Detectors/Amps</u>					<u>Compensation</u>		
Param	Detectors	Voltage	AmpGain	Mode	FL1	-	FL2
P1	FSC	E-1	4.30	Lin	FL2	-	43.5 %
P2	SS	325	1.00	Lin	FL2	-	0.0 %
P3	FL1	460	1.00	Log	FL3	-	32.6 %
P4	FL2	447	1.00	Log			
P5	FL3	500	1.00	Log			

Wurde Accutase™ zur Zellablösung verwendet, musste der Versuch mit leicht modifizierten Spannungseinstellungen durchgeführt werden. Mit diesen Einstellungen wurden auch die Zytokompatibilitätsmessungen an den unpolierten Beschichtungen durchgeführt.

<u>Detectors/Amps</u>					<u>Compensation</u>		
Param	Detectors	Voltage	AmpGain	Mode	FL1	-	FL2
P1	FSC	E-1	4.30	Lin	FL2	-	43.5 %
P2	SSC	325	1.00	Lin	FL2	-	0.0 %
P3	FL1	490	1.00	Log	FL3	-	32.6 %
P4	FL2	447	1.00	Log			
P5	FL3	500	1.00	Log			

Bei der Analyse der polierten Beschichtungen mussten die Einstellungen erneut korrigiert werden. Möglichweise weil Zellen verwendet wurden, die noch weniger häufig passagiert worden waren.

<u>Detectors/Amps</u>					<u>Compensation</u>		
Param	Detectors	Voltage	AmpGain	Mode	FL1	-	FL2
P1	FSC	E-1	4.30	Lin	FL2	-	43.5 %
P2	SSC	325	1.00	Lin	FL2	-	0.0 %
P3	FL1	455	1.00	Log	FL3	-	25,5 %
P4	FL2	447	1.00	Log			
P5	FL3	480	1.00	Log			

Durch diese Modifikationen ließ sich eine erhebliche Dezimierung des Einstrahlens von FL1 und FL2 in FL3 und eine optimale Abgrenzung der verschiedenen Zellpopulationen untereinander verwirklichen.

## 2. Messergebnisse und Statistik

### 2.1 FACS

Anteil avitaler Zellen im zeitlichen Verlauf nach Camptothecinexposition:

in % (n=1):

	6h	12h	24h	48h	3xCu
Cam +	12,0	15,2	24,2	47,3	71,4
Cam -	11,5	29,9	13,5	10,6	6,7

Abhängigkeit des Apoptoseablaufs von der eingesetzten CamptothecinKonzentration:

in % (n=1):

Cam./ml DMEM	0 µg	1 µg	2µg	5 µg	10 µg
avitale Zellen	9,9	43,2	56,2	63,2	75,9

AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf fehlerhaft beschichteten Plättchen:

Mittelwerte in % (n=6):

	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2
vital	89,67 ± 4,43	78,45 ± 4,35	73,73 ± 4,67	31,00 ± 2,42	17,98 ± 6,54	23,39 ± 6,25
apoptotisch	5,14 ± 2,26	11,07 ± 2,71	14,03 ± 3,06	38,60 ± 2,90	43,35 ± 6,16	36,99 ± 5,52
nekrotisch	5,15 ± 2,22	10,48 ± 1,74	12,24 ± 1,84	30,41 ± 2,38	38,68 ± 1,88	39,62 ± 1,26

p-Werte nach Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben:

vital	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2
PS	x	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004
TiAl6V4		x	0,065	0,004	0,004	0,004
TiO2			x	0,004	0,004	0,004
1xCu-TiO2				x	0,010	0,016
2xCu-TiO2					x	0,106
3xCu-TiO2						x

apoptotisch	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2
PS	x	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004
TiAl6V4		x	0,076	0,004	0,004	0,004
TiO2			x	0,004	0,004	0,004
1xCu-TiO2				x	0,064	0,809
2xCu-TiO2					x	0,036
3xCu-TiO2						x

nekrotisch	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2
PS	x	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004
TiAl6V4		x	0,141	0,004	0,004	0,004
TiO2			x	0,004	0,004	0,004
1xCu-TiO2				x	0,004	0,004
2xCu-TiO2					x	0,254
3xCu-TiO2						x

## AnV-PI-Zytokompatibilitätstest auf polierten Plättchen:

Mittelwerte in % (n=5):

	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2	4xCu-TiO2
<b>vital</b>	85,93 ± 6,04	78,41 ± 4,72	69,17 ± 8,50	55,95 ± 8,73	41,92 ± 5,91	31,86 ± 6,98	29,73 ± 5,98
<b>apoptotisch</b>	7,28 ± 3,30	11,63 ± 2,92	16,96 ± 5,30	24,25 ± 3,68	36,69 ± 5,32	50,61 ± 10,03	56,87 ± 6,84
<b>nekrotisch</b>	6,78 ± 2,85	10,04 ± 2,20	13,85 ± 3,67	19,8 ± 5,55	21,37 ± 4,83	17,52 ± 3,48	16,39 ± 2,75

p-Werte nach Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben:

<i>vital</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2	4xCu-TiO2
<b>PS</b>	X	0,094	0,012	0,009	0,009	0,009	0,009
<b>TiAl6V4</b>		x	0,094	0,009	0,009	0,009	0,009
<b>TiO2</b>			x	0,028	0,009	0,009	0,009
<b>1xCu-TiO2</b>				X	0,021	0,009	0,009
<b>2xCu-TiO2</b>					x	0,036	0,016
<b>3xCu-TiO2</b>						x	0,295
<b>4xCu-TiO2</b>							x

<i>apoptotisch</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2	4xCu-TiO2
<b>PS</b>	X	0,11	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
<b>TiAl6V4</b>		x	0,172	0,008	0,008	0,009	0,009
<b>TiO2</b>			x	0,093	0,008	0,009	0,009
<b>1xCu-TiO2</b>				x	0,008	0,009	0,009
<b>2xCu-TiO2</b>					x	0,020	0,008
<b>3xCu-TiO2</b>						x	0,251
<b>4xCu-TiO2</b>							x

<i>nekrotisch</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2	4xCu-TiO2
<b>PS</b>	X	0,074	0,044	0,009	0,009	0,009	0,009
<b>TiAl6V4</b>		x	0,172	0,009	0,009	0,009	0,009
<b>TiO2</b>			x	0,046	0,036	0,141	0,401
<b>1xCu-TiO2</b>				x	0,600	0,671	0,289
<b>2xCu-TiO2</b>					x	0,172	0,074
<b>3xCu-TiO2</b>						x	0,527
<b>4xCu-TiO2</b>							X

## 2.2 Trypanblau-Vitalitätstest

### Fehlerhaft beschichtete Oberflächen:

Mittelwerte (n=6):

	PS	TiAl4V6	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2
<b>vital</b>	197083 ± 78237	85833 ± 25917	78333 ± 18416	18750 ± 10093	8750 ± 4108	7917 ± 5572
<b>avital</b>	32083 ± 14354	30833 ± 11797	20833 ± 7528	36667 ± 6055	36250 ± 3791	33333 ± 8165

p-Werte nach Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben:

<i>vital</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2
PS	X	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
TiAl6V4		x	0,748	0,004	0,004	0,004
TiO2			x	0,004	0,004	0,004
1xCu-TiO2				x	0,043	0,043
2xCu-TiO2					x	0,870
3xCu-TiO2						x

### Polierte Oberflächen:

Mittelwerte (n=6):

	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2	4xCu-TiO2
<b>vital</b>	223333 ± 70403	105000 ± 51283	83333 ± 30767	63333 ± 17795	35833 ± 14972	24166 ± 5845	10833 ± 10684
<b>avital</b>	26666 ± 15705	35833 ± 16557	55833 ± 30564	61666 ± 30441	39166 ± 19083	62500 ± 16046	45000 ± 17606

p-Werte nach Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben:

<i>vital</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2	3xCu-TiO2	4xCu-TiO2
PS	x	0,008	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
TiAl6V4		x	0,63	0,199	0,005	0,004	0,004
TiO2			x	0,199	0,016	0,004	0,004
1xCu-TiO2				x	0,020	0,006	0,005
2xCu-TiO2					x	0,143	0,016
3xCu-TiO2						x	0,035
4xCu-TiO2							x

### Traumatisch abgelöste Zellen (FACS):

poliert n=5, unpoliert n=3

		Mittelwert ± Stabw	p-Wert (poliert/unpoliert)
<b>TiAl6V4</b>	poliert	10,65 ± 3,99	0,134
	unpoliert	16,18 ± 4,18	
<b>TiO2</b>	poliert	11,32 ± 1,77	0,024
	unpoliert	27,59 ± 2,85	
<b>1xCu-TiO2</b>	poliert	13,81 ± 2,81	0,131
	unpoliert	17,00 ± 0,63	
<b>2xCu-TiO2</b>	poliert	10,08 ± 2,18	0,035
	unpoliert	19,24 ± 6,03	

## 2.3 Zeitlicher Ablauf von Apoptose und Nekrose auf unpolierten Plättchen nach 72h ohne Mediumwechsel

### FACS:

p-Werte nach Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben (PS n=2, sonst n=3):

<i>vital</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2
PS	x	0,248	0,248	0,083	0,083
TiAl6V4		x	0,827	0,050	0,050
TiO2			x	0,050	0,050
1xCu-TiO2				x	0,376
2xCu-TiO2					x

<i>apoptotisch</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2
PS	x	0,248	0,236	0,076	0,083
TiAl6V4		x	0,825	0,046	0,050
TiO2			x	0,043	0,046
1xCu-TiO2				x	0,825
2xCu-TiO2					x

<i>nekrotisch</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2
PS	x	0,248	0,248	0,083	0,083
TiAl6V4		x	0,827	0,050	0,050
TiO2			x	0,050	0,050
1xCu-TiO2				x	0,184
2xCu-TiO2					x

### Trypanblau-Vitalitätstest:

Mittelwerte in %:

<i>vital</i>	PS	TiAl6V4	TiO2	1xCu-TiO2	2xCu-TiO2
PS	x	0,083	0,083	0,083	0,083
TiAl6V4		x	0,050	0,050	0,050
TiO2			x	0,513	0,127
1xCu-TiO2				x	0,050
2xCu-TiO2					x

## 10 Lebenslauf

### Angaben zur Person

**Name:** Maximilian Martin Gemeinhardt  
**Anschrift:** Winterstr. 8  
81543 München  
Tel: 089 / 8130 3196  
eMail: max.gemeinhardt@gmx.de  
**Geburtstag:** 1.12.1978  
**Geburtsort:** Würzburg  
**Familienstand:** ledig

### Schul- und Berufsausbildung

Juli 1998 Abitur am Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern  
1999-2001 Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg  
Herbst 2001 Ärztliche Vorprüfung  
2001-2002 Klinisches Studium an der Universität Würzburg  
Herbst 2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2002-2005 Klinisches Studium an der TU München  
Herbst 2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2004-2005 Praktisches Jahr am College of Medicine der University of Vermont, Klinikum rechts der Isar (Innere Medizin), Inselspital Bern (Urologie) und Krankenhaus Bogenhausen (Chirurgie)  
Herbst 2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
seit Dez. 2005 Assistenzarzt an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und gastroenterologische Onkologie am Krankenhaus Bogenhausen, München

### Famulaturen

2/2002 Chirurgie, Kreiskrankenhaus Naila  
9/2002 Kardiologie, Klinikum Coburg  
8/2003 Chirurgie/Onkologie, CJW Medical Center, Richmond VA, USA  
9/2003 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. H. Gemeinhardt, Ebern  
3/2004 Gastroenterologie, Krankenhaus Bogenhausen, München

Maximilian Gemeinhardt  
München, Juli 2007

## **11 Danksagung**

Danken möchte ich an erster Stelle Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Reiner Gradinger, der es mir zum einen ermöglichte, an der Klinik für Orthopädie, Sportorthopädie und Unfallchirurgie diese Arbeit durchzuführen und zum anderen nach Prof. Mittelmeiers Ruf nach Rostock die Betreuung dieser Arbeit als mein Doktorvater übernahm.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Mittelmeier, Klinik für Orthopädie der Universität Rostock danke ich für die Überlassung des Themas, zahlreiche Ratschläge und die jederzeit großzügig gewährte Hilfe.

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. med. Hans Gollwitzer, Klinik für Orthopädie, Sportorthopädie und Unfallchirurgie der TU München, für seine absolut vorbildliche, kompetente und engagierte Betreuung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit danken.

Frau Karin Mengele, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik der TU München verdient besonderes Lob für ihre unermüdliche Hilfe, konstruktive Kritik und aufopferungsvollen Einsatz bei der Durchführung vieler Versuche.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt, Leiter der klinischen Forschergruppe der TU Frauenklinik, gilt mein Dank für die Bereitstellung von Personal, Geräten und Laborräumen.

Bei Herrn PD Dr. med. Rainer Burgkart möchte ich mich für seine hilfreichen Korrekturen und Ratschläge bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Frau Jutta Tübel, Zellkulturlabor der Orthopädischen Klinik der TU München, danke ich für die Einführung in die Grundlagen der Laborarbeit, die stets gewährte Hilfe und unzählige praktische Ratschläge.

Schließlich gilt mein Dank Herrn Dr. med. Holger Seidl, Krankenhaus Bogenhausen, für seine Hilfe bei diversen Computerproblemen.

Maximilian Gemeinhardt