

Biochemischer Einfluss von Titanpartikeln auf Osteoblasten - Zellkulturen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München

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

Biochemischer Einfluss von Titanpartikeln auf Osteoblasten-Zellkulturen

Amelie Traue

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. P. B. Lippa

Die Dissertation wurde am 27.11.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 09.04.2003 angenommen.

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium
EDX	Energy Dispersive X-ray spectroscopy
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum, Fetales Kälberserum
LDH	Lactatdehydrogenase
MTT	(3-[4,5-diMethylThiazol-2-yl]-2,5-diphenyl) Tetrazolium bromid)
NK	Negativkontrolle
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatpuffer-Lösung
PK	Positivkontrolle
REM	Rasterelektronenmikroskopie

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	3
2. Problemstellung	5
3. Literaturübersicht	7
4. Untersuchungsmaterialien	11
4.1. Interfacegewebe von Patienten mit Hüftendoprothesen zur Gewinnung von Titanabrieb	11
4.2. Industriell hergestellte Modell-Titanpartikel	12
5. Methodik und Versuchsanordnungen	13
5.1. Zellkultur von osteoblastenähnlichen Osteosarkomzellen	13
5.1.1. SaOS-2 Zelllinie	13
5.1.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften und Zellkulturbedingungen	14
5.1.3. Optimierung der Zellkulturbedingungen	15
5.1.3.1. Erstellen einer Wachstumskurve	15
5.1.3.2. Ermittlung von Wachstumskurven nach Zugabe von verschiedenen Chargen FCS (fetal calf serum) zu DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium)	19
5.1.3.3. Mykoplasmen- und Bakterientestung	19
5.2. Analyse und Isolierung von Metallpartikeln aus Interfacegewebe	20
5.2.1. Inkubation des Gewebes mit proteolytischen Enzymen	20
5.2.2. Inkubation des Gewebes mit verschiedenen konzentrierten Säuren und Laugen	21
5.2.3. Inkubation des Gewebes mit Salzsäure	21
5.2.4. Untersuchung der aus dem Gewebe extrahierten Titanpartikel	23
5.2.4.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)	23
5.2.4.2. Quantitative Analyse der gewonnenen Abriebpartikel mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	23
5.3. Testung des Einflusses von verschieden behandelten Titanpartikeln auf Zellkulturen im Rahmen der Durchführung standardisierter Zellkulturtests	24
5.3.1. Kriterien zur Auswahl der Standardtests	24
5.3.2. Bestimmung des Einflusses von Titanpartikeln auf SaOS-2 Zellen mittels spezifischer Aktivitäts-/ Differenzierungstests	24
5.3.2.1. MTT – Test	25
5.3.2.2. LDH - Test	25
5.3.2.3. Trypanblau - Test	27
5.3.3. Testung von Titanpartikeln mit Salzsäure-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Titanpartikeln	27
5.3.3.1. Berechnung der benötigten Zellzahl und Vorbereitung der Zellen	28
5.3.3.2. Berechnung der benötigten Partikelmenge und Vorbereitung der Titanpartikel	29
5.3.3.3. Durchführung des MTT – Tests	30

5.3.3.4. Durchführung des LDH – Tests	33
5.3.3.5. Durchführung des Trypanblau – Tests.....	34
5.3.3.6. Quantifizierung des auftretenden Partikelverlustes durch Adhäsions- kräfte an Oberflächen	35
6.Ergebnisse.....	37
6.1. Untersuchung des Zusatzes verschiedener Chargen Kälberserum zu Zellkulturmedium als Stimulator für das Wachstum von SaOS-2 Zellen 37	
6.2. Untersuchung der Titanpartikel nach Auflösung des Patientengewebes	38
6.2.1. Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Partikel.....	38
6.2.2. Quantifizierung der gewonnenen Titanabriebpartikel mittels Atomabsorptionsspektroskopie	40
6.3. Erfassung des Partikelverlustes bei definierten Arbeitsvorgängen	41
6.4. Biochemischer Einfluss von industriell gewonnenen Titanpartikeln mit und ohne Salzsäure-Behandlung auf Zellkulturen.....	42
6.4.1. Untersuchung der Zellproliferation von SaOS-2 Zellkulturen nach Zusatz von Titanpartikeln mittels MTT-Test	42
6.4.2. Untersuchung der Zytotoxizität von Titanpartikeln an SaOS-2 Zellen mittels LDH-Test	45
6.4.3. Bestimmung der Überlebensrate von SaOS-2 Zellen nach Behandlung mit Titanpartikeln mittels Trypanblau-Test.....	48
7.Diskussion.....	51
7.1. Diskussion zur eingesetzten SaOS-2 Zelllinie	51
7.2. Zur Entwicklung der Gewebeauflösungsmethode mit Salzsäure	51
7.3. Zur Auswahl von Titanpartikeln für die Untersuchungen mit Zell- kulturen	52
7.4. Beurteilung der Ergebnisse der Zellkulturtests.....	52
7.5. Auswertung der Partikelanalyse mittels REM und AAS	53
8.Zusammenfassung.....	55
9.Verzeichnisse.....	57
9.1. Literaturverzeichnis	57
9.2. Abbildungsverzeichnis	65
9.3. Tabellenverzeichnis	68
9.4. Chemikalienverzeichnis.....	69
10.Anhang.....	73
10.1. Messergebnisse	73
10.1.1. MTT-Test.....	73
10.1.2. LDH-Test.....	74
10.1.3. Trypanblau-Test	75
10.2. Danksagung	77
10.3. Lebenslauf	78

1. EINLEITUNG

Die Zahl von implantierten Endoprothesen, insbesondere Hüft- und Knieendoprothesen, nimmt stetig zu. Momentan werden weltweit schätzungsweise eine Million Endoprothesen pro Jahr implantiert. Der Hüfttotalendoprothesenersatz muss einer biomechanischen, biochemischen und biophysikalischen korrosiven Umgebung sowie Millionen von Last- und Bewegungszyklen während der Standzeit widerstehen. Dabei spielen für die *in situ* Lebensdauer der Endoprothesen die Materialien unter verschiedenen Gesichtspunkten eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren wurden bezüglich der tribologischen Anforderungen immer haltbarere Implantate entwickelt, wobei folgende Gleitpaarungskombinationen von Materialien für Pfanne und Kopf eingesetzt wurden:

Metall/Metall, Keramik/Keramik, Metall/Polyethylen und Keramik/Polyethylen. Dabei gibt es verschiedene Verankerungsmöglichkeiten der Endoprothesen im Knochen basierend auf Metalllegierungen von Titan oder Cobalt-Chrom-Molybdän:

- zementiert in Kombination mit Polymethyl-Metacrylat oder
- zementlos mit verschiedenen Oberflächenvariationen: makro-, medi- oder mikroporische Tripoden.

Als eine Hauptursache für Endoprothesenlockerungen werden Abriebpartikel angesehen, die zur sogenannten „Wear Disease“ führen und damit Revisionsoperationen mit einem erhöhten ökonomischen Aufwand und einer zusätzlichen Belastung für den Patienten erforderlich machen.

Im Rahmen des Forschungsprojekts „Schadensanalyse in der Endoprothetik“ der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München, Klinikum Rechts der Isar, sollen die Mechanismen und Ursachen der aseptischen Lockerung von Endoprothesen wissenschaftlich untersucht werden, um Schlussfolgerungen für die Weiterentwicklung der Endoprothetik ziehen zu können. Vorgesehen sind verschiedene Untersuchungen mit intraoperativ gewonnenem Patientengewebe bezüglich Histologie bzw. Histochemie sowie Abriebanalysen.

Abriebpartikel von Materialien, die häufig in der Produktion von Endoprothesen verwendet werden, spielen eine wichtige Rolle in dem Prozess der aseptischen Lockerung. Makrophagen und Osteoblasten können diese feingranulären entstandenen Partikel phagozytieren und zahlreiche Mediatoren freisetzen, die unter Umständen eine Knochenresorption verursachen. Dadurch kommt es zu einer langsam fortschreitenden Instabilität der Verankerung des Implantats im Knochen mit der Folge eines verstärkten Abriebs, was schließlich zu einem Circulus vitiosus führt.

In dieser Arbeit sollen Titanpartikel, die ebenfalls im Abrieb von Endoprothesen-

Kapitel 1. Einleitung

materialien aus Titanlegierungen beobachtet wurden, auf ihre zellschädigende Wirkung näher untersucht werden. Es galt, Titanabrieb aus Patientengewebe zu isolieren und parallel dazu industriell hergestellte Titanpartikel *in vitro* zur Testung des Einflusses der Partikel auf Osteoblasten ähnliche Zellen einzusetzen.

2. PROBLEMSTELLUNG

Im Interfacegewebe um aseptisch gelockerte Endoprothesen sind verschiedene Abriebpartikel des Endoprothesenmaterials enthalten, deren Rolle hinsichtlich möglicher Zellschädigungen zur Untersuchung ansteht.

In bisherigen Arbeiten werden ausschließlich industriell hergestellte Partikel eingesetzt, was den realen Bedingungen nicht voll entspricht. Es wäre wünschenswert, aus Patientengewebe gewonnene Partikel einzusetzen, da dies bisher noch nicht gelang.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren deshalb:

- Aufbau einer Methode zur Testung der Einflüsse von Titanabriebpartikeln auf Osteoblasten ähnliche Zellen (SaOS-2 Zellen)
- Durchführung von Versuchen zur Gewinnung von Titanabriebpartikeln aus Patienteninterfacegewebe
- Bestimmung der Mengen und der Zusammensetzung von aus Patientengewebe gewonnenen Partikeln (REM, AAS)
- Untersuchung des Einflusses der Titanabriebpartikel auf SaOS-2 Zellen hinsichtlich Proliferation (MTT-Test), Zytotoxizität (LDH-Test) und schließlich Nachweis der Anzahl abgetöteter Zellen (Trypanblau-Test).

3. LITERATURÜBERSICHT

Knochenresorption und aseptische Lockerung um Endoprothesen sind ernste und verbreitete Komplikationen in der Orthopädie. Abriebpartikel von Materialien, die häufig in der Produktion von Endoprothesen verwendet werden, scheinen eine Hauptrolle in diesem Prozess zu spielen. Zur Problematik der Abriebpartikel in der Endoprothetik und deren Untersuchungsmethoden *in vitro* und *in vivo* liegen eine Reihe von Übersichtsarbeiten vor ([4] S. 7, [5] S. 75, [7] S. 66, [11] S. 25, [13] S. 1235, [15] S. 337, [40] S. 51).

Abriebpartikel bestehend aus Metallen, Polyethylen, Keramik und Knochenzement haben alle für sich gezeigt, dass sie biologische Reaktionen in die Endoprothese umgebenden Gewebe hervorrufen. Wie in verschiedenen Untersuchungen bisher nachgewiesen wurde, führen die Abriebpartikel auch zur Induktion der Freisetzung von Zytokinen, Interleukinen und osteolytisch wirksamen Enzymen aus Makrophagen, Fibroblasten, Fremdkörperriesenzellen, sowie Osteoklasten und Osteoblasten ([9] S. 456, [14] S. 393, [20] S. 95, [27] S. 467, [29] S. 356, [36] S. 8, [47] S. 32, [49] S. 203). Es wurden zahlreiche Versuche an verschiedenen Zelllinien unter Zusatz von Abriebpartikeln durchgeführt, um bestimmte Zellreaktionen *in vitro* zu stimulieren und genauer zu erforschen.

Während die Knochenresorption sicherlich zum Netto-Knochenverlust beiträgt, der mit einer aseptischen Lockerung von Implantaten als Antwort auf Abrieb assoziiert ist ([18] S. 1436), scheint auch eine verminderte Knochenbildung eine Rolle zu spielen. Das Knochen-Implantat-Interface gewährt Abriebpartikeln Zutritt zum periprothetischen Gewebe ([10] S. 836, [44] S. 849) und führt damit zum direkten Kontakt der Partikel mit Osteoblasten.

Osteoblasten sind einer der Hauptzelltypen, die im Knochengewebe die Endoprothese direkt umgeben. Sie halten zusammen mit Osteoklasten den physiologischen Knochenumbau durch eine balancierte Koordination von Knochenaufbau und Knochenabbau aufrecht. In neueren Untersuchungen wurde deutlich, dass Osteoblasten Titanpartikel phagozytieren können, wenn diese Partikel einen mittleren Durchmesser im Bereich um 5µm haben ([21] S. 169, [23] S. 554, [37] S. 401, [49] S. 203, [53] S. 107). Die Phagozytose initiiert eine Reihe von intrazellulären Signalprozessen. Dadurch ändern sich in den Osteoblasten verschiedene Zellfunktionen, die das Wachstum beeinflussen bzw. zum Absterben der Zellen und damit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Osteoklasten führen können.

Um Abriebpartikel aus intraoperativ gewonnenem Patienteninterfacegewebe untersuchen zu können, muss dieses zunächst durch eine geeignete Methode aufgeschlossen werden.

Am häufigsten wurden folgende Methoden bisher angewandt:

- Auflösung des Gewebes mit konzentrierten Basen, wie z.B. mit 5 N Natronlauge ([30] S. 354, [35] S. 246, [52] S. 58)
- Erschließung des Gewebes mit konzentrierten Säuren, wie z.B. mit Salpetersäure ([28] S. 1665, [42] S. 857), NaOCl ([6] S. 191) oder mit Salzsäure ([28] S. 1665, [35] S. 246)
- Enzymatische Spaltung des Gewebes durch Papain ([9] S. 453, [26] S. 1303) bzw. durch sequentielle enzymatische Verdauung ([22] S. 381, [25] S. 269, [35] S. 246)

In den meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen wurden die Partikel (Kobalt-Chrom, Titan, Polyethylen, Knochenzement) nach Größe, Form, Vorkommen und Zusammensetzung untersucht ([22] S. 380, [26] S. 1303, [28] S. 1664, [42] S. 856). Dabei wurden die Partikel mittels REM oder histologischen Methoden sichtbar gemacht oder mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt.

Die Exposition der aus *in vivo* Gewebe gewonnenen Metallpartikel auf Knochenzellen *in vitro* wurde bisher noch nicht durchgeführt, wäre aber wünschenswert.

Bei den Versuchen zur Testung des Einflusses von Metallpartikeln auf verschiedene Zellkulturen wurden häufig industriell hergestellte Partikel verwendet, deren mittlerer Durchmesser meist $< 5\mu\text{m}$ war, wobei die Partikel von den Zellen phagozytiert werden konnten ([12] S. 826, [14] S. 393, [53] S. 107).

Kritischerweise ist anzumerken, dass die industriell hergestellten Partikel nicht genau der Situation bei den Patienten entsprechen und somit nur als Modell gelten.

Exemplarisch für die durchgeführten Untersuchungen mit Titanpartikeln sollen hier einige Arbeiten vorgestellt werden.

Kwon et al. (2001) inkubierten aus Knochenspongiosa neugeborener Ratten gewonnene Osteoblasten mit industriell hergestellten Titanpartikeln ($d_{50} = 18,66\mu\text{m}$) in Konzentrationen von 0,02, 0,03, 0,06, 0,13, 0,25, 0,5mg/100 μl für 24h, 48h und 72h. Es wurden konzentrationsabhängige Veränderungen in der Zellproliferation und -funktion gemessen. Zum Teil wurden extrem hohe Konzentrationen in den Modellversuchen eingesetzt, um deutliche Effekte zu erreichen. So konnte die Phagozytose auch großer Partikel festgestellt werden, als auch die Abnahme der Kollagen I-Synthese, sowie eine erhöhte Apoptoserate der Osteoblasten nach Zugabe von Titanpartikeln ([21] S. 161).

Lohmann et al. (2000) inkubierten Osteoblasten ähnliche MG-63 Zellen und primäre humane Osteoblasten mit industriell hergestellten Titanpartikeln ($< 1,5\mu\text{m}$) für 24h. Auch sie wiesen die Phagozytose der Partikel und Effekte auf Zellwachstum und

Differenzierung nach ([23], S. 551).

Vermes et al. (2001) behandelten ebenfalls MG-63 Osteoblasten mit industriell hergestellten Titanpartikeln $< 3\mu\text{m}$ in Konzentrationen von 0,0125% bis 0,2% für 48h bis 96h. In den Konzentrationen bis 0,05% Titanpartikel konnten sie keinen Einfluss auf die Zellvitalität feststellen. Es wurde aber die Zellproliferation eingeschränkt, ProKollagen I vermindert exprimiert und ein Interleukin 6 Anstieg beobachtet. Diese Zellveränderungen können bereits zu einer Osteoklastentransformation und damit zur vermehrten Osteolyse führen ([49] S. 201).

Pioletti et al. (1999) inkubierten aus neugeborenen Ratten gewonnene Osteoblasten mit industriell hergestellten Titanpartikeln in den hohen Konzentrationen 0,5, 1,5, 5, 7,5 und 10mg/ml für 72h. Dabei ließ sich nachweisen, dass die Zellen die Partikel phagozytierten. Die Vitalität nahm mit steigender Partikelkonzentration und verlängerten Inkubationszeiten ab. Es wurde eine signifikante Zunahme der Apoptose im Gegensatz zur Kontrolle gemessen. Dabei waren die Effekte erst ab einer Schwellenkonzentration von 0,75 - 1% sicher nachweisbar ([37] S. 399).

Yao et al. (1997) verwendeten MG-63 Osteoblasten und humane Osteosarkomzellen, sowie industriell hergestellte Titanpartikel mit einem mittleren Durchmesser $< 3\mu\text{m}$. In der Konzentration von 1mg/ml (= 0,1%) wurden die Partikel zusammen mit den Zellen für 48h und 72h inkubiert. Obwohl nachweislich eine Phagozytose der Partikel zu beobachten war, konnte kein Effekt auf die Vitalität der genannten Zellkulturen festgestellt, jedoch eine Abnahme der mRNA Level für ProKollagen I und III gemessen werden ([53] S. 107).

Wang et al. (1997) inkubierten humane Osteosarkomzellen mit Titanpartikeln in den extrem niedrigen Konzentrationen von 1,10 und 100ng/ml für 72h. Trotz dieser sehr niedrig gewählten Konzentrationen, die keinen Effekt auf die Zellvitalität hatten, zeigte sich ein Anstieg von Interleukin 1 β und TNF α , sowie eine Abnahme von Kollagen Typ I. Daraus kann man auf eine beginnende Dysregulation der Zellen schließen ([51] S. 216).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass an verschiedenen Zellkultursystemen mittels Titanpartikeln ein Einfluss auf die Aktivität der Zellen nachweisbar war. Damit ergaben sich Ausgangspunkte für unsere Versuche hinsichtlich Partikelgröße, Konzentration, Auswahl der Zelllinie und Methodik. Der Nachweis der Phagozytose von Titanpartikeln in Osteoblasten ähnlichen Zellen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Aussagefähigkeit entsprechender *in vitro* Untersuchungen dar.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIALIEN

4.1. Interfacegewebe von Patienten mit Hüftendoprothesen zur Gewinnung von Titanabrieb

Untersucht wurden Gewebeproben von 5 Patienten mit ehemals zementlos implantierten, aseptisch gelockerten Hüftendo-prothesen, die in der Klinik für

Orthopädie und Sportorthopädie, Rechts der Isar München, intraoperativ bei Revisionen gewonnen wurden.

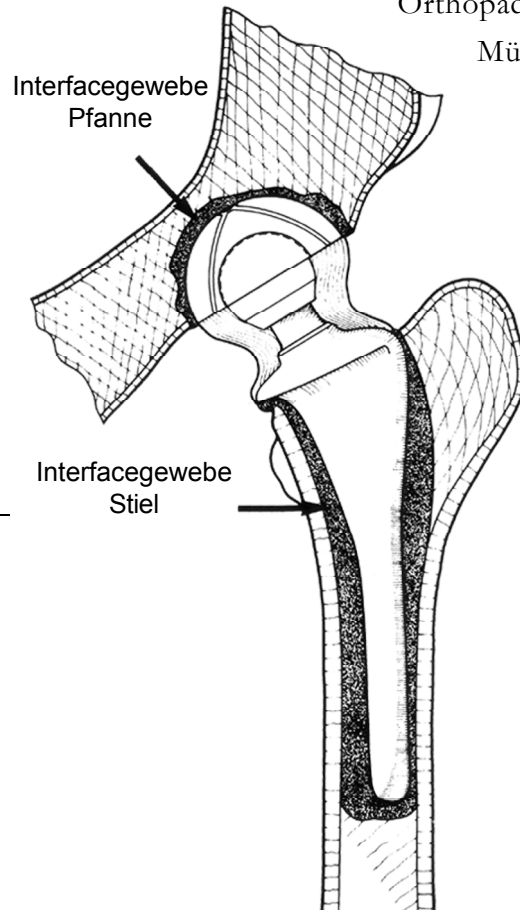


Abb. 1
Skizze einer Hüftgelenksendo-prothese mit dem umgebenden sekundär gebildeten Interfacegewebe, aus dem die Gewebeproben für die nachfolgenden Versuche gewonnen wurden.

Die Gewebeproben bestanden aus Fragmenten der Sekundärkapseln und Weichgewebsmembranen, die sich zwischen der Prothese und dem knöchernen Anteil ausgebildet hatten, und mit genauer Dokumentation der Lokalisation entnommen wurden.

Verschiedene Informationen über die Patienten, deren Gewebeproben für unsere Untersuchungen verwendet wurden, bezüglich Alter, Geschlecht, Indikation und näheren Angaben die Endoprothese betreffend, können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tab. 1
Patientendaten

Nr.	Alter	Geschlecht	Standzeit	Ursprüngliche Diagnose	Prothesentyp	gelockerter Teil
1	71	w	15a	Coxarthrose	Pfanne: Endler-PE Stiel: Zweymüller Titan	Pfanne
2	71	m	11a 8m	Coxarthrose	Pfanne: Weill-Schraubring Stiel: Spotorno	Stiel u. Pfanne
3	69	m	9a 3m	Coxarthrose	Pfanne: Synthes-Spreiz Stiel: Spotorno	Pfanne
4	70	m	10a 3m	Coxarthrose	Pfanne: Weill-Schraubring Stiel: CS-Titanschaf	Stiel u. Pfanne
5	62	m	5a 4m	Coxarthrose	Zweymüller Titan Prothese	Stiel u. Pfanne

Die Indikation zur Erstimplantation war in allen Fällen eine degenerativ bedingte Coxarthrose. Die Erstimplantationen waren auch in anderen auswärtigen Kliniken durchgeführt worden. Von der Auswahl ausgeschlossen wurden mit Endoprothesen

versorgte Tumorpatienten, septische Patienten und Patienten, bei denen es zu einem Prothesenbruch gekommen war. Wir verwendeten nur Patientenmaterial aseptisch gelockerter Titan-Endoprothesen mit radiologisch gesicherten Lockerungszeichen, wie Osteolysen, Positionsänderungen und Saumbildung um die Prothese.

Die intraoperativ gewonnenen bis mehrere Kubikzentimeter großen Fragmente des Interfacegewebes aus dem Femur und dem Beckenknochen wurden entsprechend den Angaben des Operateurs nach definierten Lokalisationen getrennt asserviert. Das Untersuchungsmaterial wurde sofort nach der Entnahme bei -80°C tiefgefroren. Zur Gewebeanalyse wurden nur makroskopisch auffällige Anteile der Proben verwendet (Schwarzfärbung).

4.2. Industriell hergestellte Modell-Titanpartikel

Um den Einfluss von Titanpartikeln auf die biochemischen Prozesse von Osteoblastenzellen untersuchen zu können, wurde Titanpulver der Firma TLS Technik GmbH & Co, Spezialpulver KG, Bitterfeld (D), verwendet. Es handelte sich dabei um 99,99% reines feinstes Titanpulver (Titan Grade 1) mit einem O_2 -Gehalt von 0,15g/100g Partikel ($d_{10} = 6,11\mu\text{m}$, $d_{50} = 18,66\mu\text{m}$ und $d_{90} = 45,57\mu\text{m}$). Die Partikel wurden mit dem EIGA-Verfahren (Electrode Induction-melting Gas Atomization) durch Schutzgasverdüsen mit Argon gewonnen. Durch das tiegellose Aufschmelzen von stangenförmigen Elektroden unter Inertgas-Atmosphäre können sehr reine, sphärische Pulver hergestellt werden (Prospekt der Firma TLS Technik GmbH & Co, Spezialpulver KG Bitterfeld).

Die Partikel wurden entsprechend der Arbeitsvorschriften unter Punkt 5.2.3. entweder mit Salzsäure behandelt und fünfmal gewaschen, analog der Partikel, die aus dem Inter-facegewebe mit Salzsäure extrahiert werden konnten, oder nach alleinigem 5-maligem Waschen eingesetzt. Damit sollte untersucht werden, ob eine Salzsäure-Behandlung die Partikel verändert und dadurch einen zusätzlichen biochemischen Effekt hervorruft.

5. METHODIK UND VERSUCHSANORDNUNGEN

5.1. Zellkultur von osteoblastenähnlichen Osteosarkomzellen

5.1.1. SaOS-2 Zelllinie

In *in vitro* Versuchen sollten möglichst die gleichen oder ähnliche Zellen verwendet werden, die *in vivo*, also im Patienten, Kontakt zum Implantat haben, um spezifische biochemische Reaktionen zu simulieren, die am Implantationsort stattfinden können. Die SaOS-2 Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Neumeier, Max Planck-Institut München-Martinsried, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Osteosarkomzellen, die aus dem intraoperativ gewonnenen Tumor einer 15-jährigen Patientin gezüchtet werden konnten. Nach wiederholter Passagierung der primären Tumorzellen wurde eine phänotypisch charakteristische Zellklonserie isoliert ([1] S. 121, [2] S. 475, [50] S. 923).

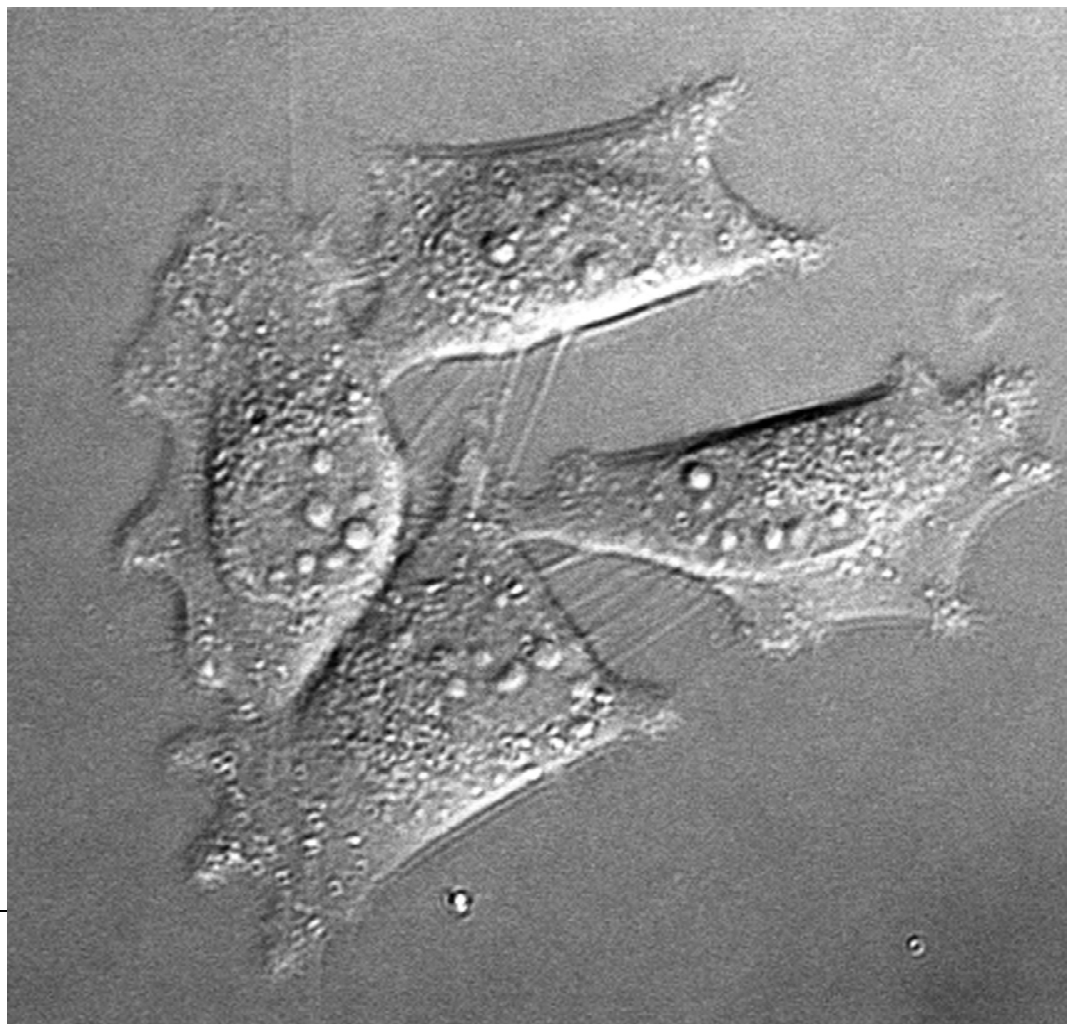


Abb. 2
Zellkultur von
SaOS-2 Zellen

Es wurde eine Zellkultur mit Osteoblasten ähnlichen Tumorzellen verwendet, da solche bereits in der Vergangenheit gute Modelle zum Studium der Osteoblasten und ihrer Molekularbiologie darstellten. SaOS-2 Zellen produzieren viele osteoblastenspezifische Enzyme und Proteine, wie die Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Vitamin D3 induziertes Kollagen, so dass eine hohe Übereinstimmung mit der Biochemie von Osteoblasten vorliegt.

Die Vorteile dieser Zelllinien liegen im Vergleich zu primären Osteoblastenkulturen in ihrer phänotypischen Homogenität und dem hochdifferenzierten Stadium der Zellen, so dass auch langandauernde Versuchsreihen ohne eine biochemische Veränderung der Zellen durchgeführt werden können.

5.1.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften und Zellkulturbedingungen

Um die strikte Einhaltung steriler Arbeitsbedingungen gewährleisten zu können und zum Schutz der Kulturen vor einer Kontamination mit Bakterien oder Mykoplasmen, wurde immer unter der sterilen Laminar flow Herasafe der Firma Heraeus gearbeitet. Alle Arbeitsutensilien und Arbeitsflächen wurden vor und nach der Benutzung mit 70%igem Ethanol gereinigt.

Um Zellen *in vitro* zu kultivieren, muss man die entscheidenden Kulturparameter den *in vivo* vorherrschenden Bedingungen so weit wie möglich angleichen. Entscheidende Faktoren sind dabei die Oberfläche, auf der die Zellen wachsen, das Medium, in dem sie kultiviert werden, und die Temperatur. Die meisten Medien enthalten nur wenige Grundkomponenten, wie ein isotonisch gepuffertes Grundnährmedium mit anorganischen Salzen, Energie liefernden Nährstoffen, Aminosäuren und verschiedenen Zusatzstoffen. In den vorliegenden Versuchen wurde Dulbeccos Modifiziertes Eagles Medium (DMEM) verwendet, weil es sich besonders für Zelllinien eignet, die als festsitzende Monolayer-Kulturen wachsen. Hinzugegeben wurde noch fetales Kälberserum (FCS), welches vor allem wachstumsfördernde Substanzen, wie Polypeptide, Hormone, Lipide und Spurenelemente enthält. Weiterhin ist es Standard, dem Medium eine Kombination aus Penicillin und Streptomycin zuzugeben, um Kontaminationen frühzeitig vorzubeugen, die eine Verfälschung aller Ergebnisse verursachen könnten, sowie 1% DMEM-Vitamine beizufügen, die eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Zellen haben. Der pH-Wert des Mediums wird vom Hersteller zwischen 7,0 und 7,2 eingestellt. Die Zellkulturen benötigen zum optimalen Wachstum eine Temperatur von $37^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$, eine hohe Luftfeuchtigkeit und einen CO_2 -Anteil an der Luft von 5%. Es wurde mit dem Inkubator Heracell der Firma Heraeus gearbeitet. Diese Bedingungen bleiben während aller Versuchsreihen unverändert.

Die in den folgenden Versuchen verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind mit ihrer Zusammensetzung im Anhang unter Punkt 9.4. aufgelistet.

Arbeitsvorschrift Nr. 1

Herstellung des Mediums:

Es werden mit der Pipette zu 450,0ml DMEM-Medium hinzugegeben: 50,00ml FCS, 5,00ml der Penicillin/Streptomycin-Kombination und 5,00ml der DMEM-Vitamine. Danach wird die Flasche vorsichtig zur Durchmischung geschwenkt und auf $37^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$ in einem Wasserbad der Firma Grant, USA, erwärmt.

Bei Nichtgebrauch sollte das hergestellte Medium maximal vier Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden, da sich bei Überschreitung dieser Zeitspanne die Inhaltsstoffe verändern können.

Arbeitsvorschrift Nr. 2

Aussäen der Zellen in Zellkulturflaschen:

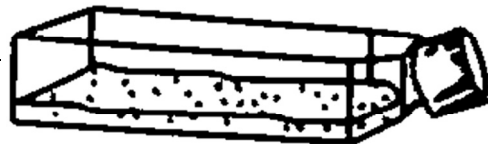


Abb. 3
Zellkulturflasche

Verwendet werden Zellkulturflaschen der Firma Falcon, USA, mit einer Wachstumsfläche von 75cm^2 . Aus einer bereits vorhandenen Flasche werden die Zellen nach Arbeitsvorschrift

Nr. 4 und Nr. 5 (Punkt 5.1.3.1.) gewonnen und danach 1,00ml der entstandenen Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche pipettiert. Man fügt nun noch 9,00ml des hergestellten Mediums (nach Arbeitsvorschrift Nr. 1) hinzu. Anschließend werden die Zellkulturflaschen in den Inkubator gestellt, bei täglicher Kontrolle des Wachstums unter dem Durchlichtmikroskop, Axiovert 25 der Firma Zeiss Jena. Das Medium muss jeden dritten Tag gewechselt werden, da sonst die optimale Nährstoffversorgung der Zellen nicht ausreichend gewährleistet ist. Außerdem sollten die Zellen einmal pro Woche zur Verringerung der Zelldichte neu ausgesät werden.

5.1.3. Optimierung der Zellkulturbedingungen

Um das Wachstum der kultivierten Zellen überprüfen zu können, ist es sehr wichtig, eine Wachstumskurve anzufertigen. Dadurch nutzen wir eine einfache Methode zur Abschätzung des Zeitpunkts, an dem genügend Zellen für eine Versuchsreihe zur Verfügung stehen.

Arbeitsvorschrift Nr. 3

Aussäen der Zellen zur Erstellung einer Wachstumskurve:

Es werden 4×10^4 Zellen in 5,00ml Medium pro Zellkulturflasche der Firma Falcon, USA, mit einer Wachstumsfläche von 25cm^2 nach Arbeitsvorschrift Nr. 2 ausgesät. Für jeden der 7 Tage, an denen man die Zellzahl bestimmen will, sollte man eine Kultur

bereitstellen, d.h. am Tag 0 werden insgesamt sieben einzelne Kulturflaschen vorbereitet.

Diese Anzahl an Zellkulturflaschen ist nötig, da man adhärente Zellen zur Zellzahlbestimmung von der Plastikoberfläche ablösen muss und somit jede Flasche nur einmal verwenden kann. Die Gewinnung einer Zellsuspension lässt sich am einfachsten mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung erreichen. Das Trypsin hat dabei die Aufgabe, die Adhäsionsproteine zu spalten, während EDTA alle zweiwertigen Kationen bindet.

Arbeitsvorschrift Nr. 4

Herstellen einer Zellsuspension:

Man entfernt das Kulturmedium vorsichtig mit einer Pipette aus der Zellkulturflasche und gibt 5,00ml PBS-Puffer hinein, um alle Reste des im Medium enthaltenen FCS heraus zu waschen. Man schwenkt die Flüssigkeit dabei vorsichtig über die von Zellen besiedelte Kulturoberfläche. Nachdem man den Puffer mit der Pipette wieder entfernt hat, gibt man 5,00ml der Trypsin-EDTA-Lösung zu und verteilt sie wie beschrieben. Man stellt nun die Zellkulturflasche für 3min zurück in den Inkubator. Danach versucht man mit leichten seitlichen Schlägen auf die Flasche, alle Zellen von der Oberfläche zu lösen. Anschließend fügt man mit der Pipette 5,00ml Medium hinzu, um zu verhindern, dass die Zellen durch Mangel an Nährstoffsubstraten während der Weiterverarbeitung geschädigt werden, und mischt die Suspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Man füllt nun die gewonnene Zellsuspension in ein 15ml Blue Cap-Röhrchen der Firma Falcon, USA, um.

Die Trypsinaktivität wird dabei durch Serumproteine gehemmt, die dem Enzym einerseits als Substrat dienen können, andererseits aber auch als direkte Inhibitoren wirken.

Im Verlauf der Erstellung einer Wachstumskurve vermehren sich die ausgesäten Zellen in den Zellkulturflaschen ständig, wodurch es zum Verbrauch von Nährstoffen des Mediums und zu Platzmangel kommt, und somit die Zellen mit zunehmender Versuchsdauer im ihrem Wachstum stagnieren bzw. vermehrt absterben.

Um die noch vitalen Zellen einfacher zählen zu können, färbt man die avitalen Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau an. Die Zellzählung erfolgt anschließend unter dem Durchlichtmikroskop Axiovert 25 der Firma Zeiss Jena standardisiert mit einem Hämozytometer nach Neubauer. Im Fall der Wachstumskurve werden nur die vitalen, ungefärbten Zellen berücksichtigt.

Die Zellkonzentration pro Milliliter lässt sich dann wie folgt bestimmen:

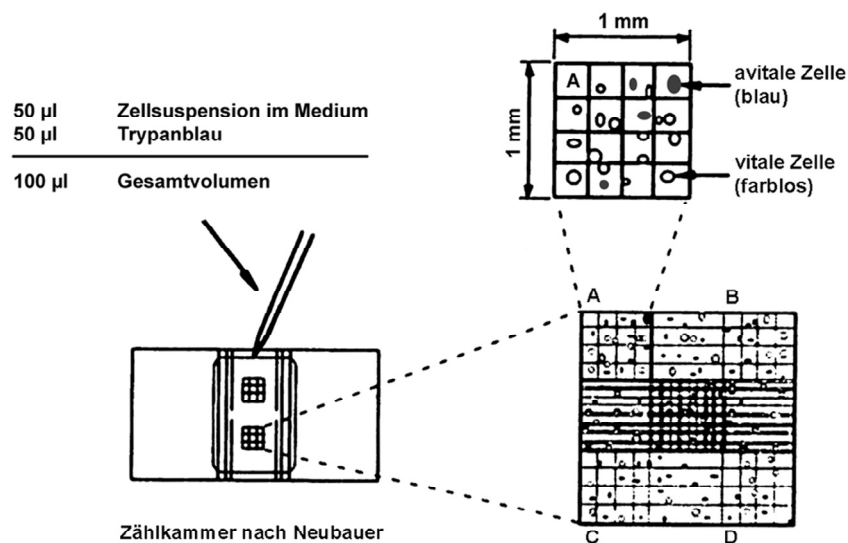
$$= \frac{\text{Mittelwert der Anzahl Zellen aller Felder (A+B+C+D)}}{4} \times \text{Faktor aus der Verdünnung der Zellsuspension} \times 10^4$$

Arbeitsvorschrift Nr. 5

Zellzählung:

0,50µl der nach Arbeitsvorschrift Nr. 4 gewonnenen Zellsuspension werden in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dann das gleiche Volumen an 0,5%iger Trypanblau-Lösung hinzugegeben und mit einem Minischüttler der Firma Vortex, USA, für 30 Sekunden bei 1000U/min ausreichend vermischt. Die Inkubationszeit beträgt 10min, da nach Überschreitung dieser Zeit auch vitale Zellen blau gefärbt werden und das Ergebnis verfälscht würde.

25µl der gefärbten Zellsuspension werden nun vorsichtig zwischen Deckglas und gerasterte Flächen der Zählkammer nach Neubauer pipettiert bis diese komplett gefüllt ist. Unter dem Durchlichtmikroskop zählt man nun alle farblosen und blauen (nur für



Berechnung der Zellkonzentration:

Abb. 4
Zählkammer für die Bestimmung der Zellzahl ([31] S. 109)

$$\left. \begin{array}{l} \text{Anzahl Zellen pro Feld A, B, C oder D} \\ \text{Mittelwert der Anzahl Zellen aller Felder} \\ \text{1/4 x (A+B+C+D)} \end{array} \right\} \times \text{Faktor aus Verdünnung der Zellsuspension} \times \text{Faktor aus definiertem Volumen der Zählkammer} \times 10^4 = \text{Zellen pro ml Suspension}$$

Trypanblau-Test) Zellen, die sich in den vier markierten äußeren Quadranten befinden. Dabei lässt man die Zellen, welche die äußeren Rasterlinien auf der unteren und der rechten Seite berühren, außer Acht, berücksichtigt aber jene Zellen, welche die gleiche Linie auf der linken oder oberen Seite des Quadrats berühren.

Zur Erstellung einer Wachstumskurve trägt man die Anzahl der gezählten Zellen entlang der y-Achse und die Zeit, die seit dem Ansetzen der Kulturen verstrichen ist, auf der x-Achse auf. Die resultierende Kurve zeigt oft eine anfängliche lag-Phase, während der sich die Zellen kaum vermehren. Dann sollte die Zellzahl exponentiell ansteigen (log-Phase), bis die Kurve schließlich in eine Gerade übergeht. Nach einigen Tagen sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur ab und die Zellzahl nimmt nicht weiter zu (Plateauphase), wobei in einigen Fällen sogar ein Absinken der Zellzahl zu beobachten ist.

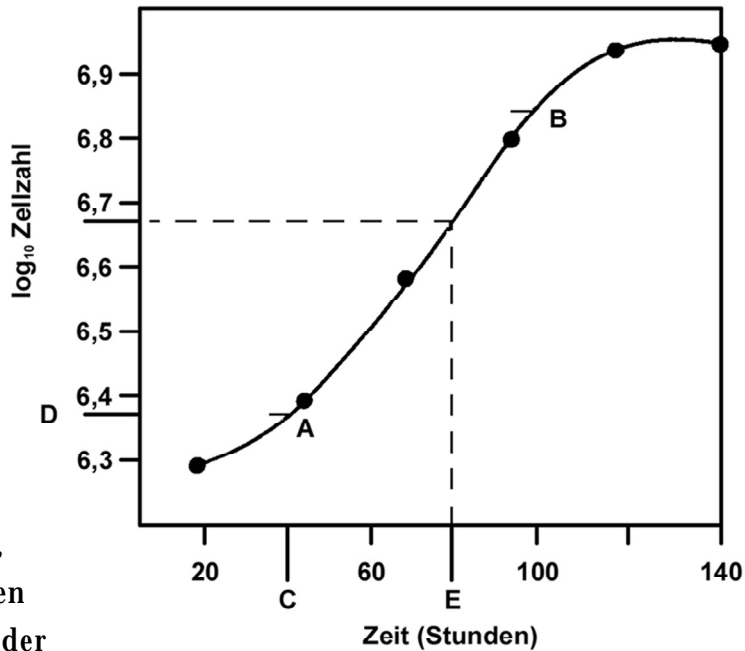


Abb. 5
Typische
Wachstumskurve
([31] S. 77)

„Die Kultur erreicht die logarithmische Phase am Punkt A und weicht ab Punkt B wieder vom logarithmischen Wachstum ab. Der dem Punkt A entsprechende Zeitpunkt ist C (gemessen in Stunden), zu welchem sich die dem Punkt D entsprechende Zellzahl in der Kultur befindet. Zum Zeitpunkt E hat die Zellzahl einen Wert von 2 x D erreicht. Die Verdoppelungszeit beträgt demnach E-C.

Ist die Kulturverdoppelungszeit für eine bestimmte Zelllinie einmal ermittelt, so lässt sich die voraussichtliche Zellkonzentration für jeden beliebigen Zeitpunkt in der Zukunft voraussagen. Der Punkt, an dem die Wachstumskurve die exponentielle Phase verlässt, ist das Stadium, in dem die Geschwindigkeit des Zellwachstums bis zur Plateauphase abnimmt. Das kann zum einen daran liegen, dass das Kulturmedium verbraucht ist, zum anderen daran, dass die Kultur konfluent gewachsen ist, so dass sich eine Wachstumshemmung bemerkbar macht. Die Zellen sollten deshalb immer subkultiviert werden, bevor sie eine Zellkonzentration erreichen, bei der sie ihr Wachstum einschränken. Die Verdoppelungszeit einer Zellkultur ist ein Charakteristikum des jeweiligen Zelltyps unter den jeweiligen Kulturbedingungen und sollte sich nicht wesentlich verändern“ ([31] S. 76).

Um die Wachstumsbedingungen der vorliegenden SaOS-2 Zelllinie zu optimieren, wurden mit drei verschiedenen Chargen des verwendeten FCS drei Wachstumskurven erstellt. Da FCS ein Naturprodukt ohne festgeschriebene Zusammensetzung der Bestandteile ist, war es unser Ziel, die Charge zu bestimmen, bei der die Zellen am optimalsten wachsen und sich vermehren würden. Dafür mussten zunächst drei verschiedene Medien nach Arbeitsvorschrift Nr. 1 hergestellt.

- Medium 1 mit FCS der Charge 258x
- Medium 2 mit FCS der Charge 440x
- Medium 3 mit FCS der Charge 135x

Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie unter Punkt 5.1.3.1. beschrieben.

Wir entschieden uns nach der Auswertung der Ergebnisse aus diesen Wachstumskurven (Punkt 6.1.) nur noch FCS der Charge 258x einzusetzen. Deshalb wird in der weiteren Arbeit DMEM mit Zusatz von 10% FCS der Charge 258x als Medium 1 bezeichnet.

Zellkulturen sind häufig mit Mykoplasmen kontaminiert. Durch den Befall der Zellkulturen können Mykoplasmen den Stoffwechsel, die Lebensfähigkeit und die Morphologie der Zellen verändern, d.h. dass sie die Aussagefähigkeit eines Tests unzuverlässig machen. Diese Kontaminationen werden aber oft nicht festgestellt, da die Zellkulturen meist ein normales Wachstum zeigen. Der Enzym-Immunoassay Mycoplasma Detection Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, gestattet die routinemäßige Kontrolle von Zellkulturen, Seren, Medien etc. auf Mykoplasmen. Das Testprinzip basiert auf der ELISA-Technik und beinhaltet polyklonale Antikörper zum Nachweis der verbreitetsten Mykoplasmen/Acholeplasmen-Spezies in Zellkulturen (*M. arginini*, *M. hyorhina*, *A. laidlawii*, *M. orale*). Laut Angaben der Firma Roche können durch diesen Test mit bis zu 94%iger Genauigkeit infizierte Kulturen identifiziert werden.

Sind die Zellen mit Bakterien kontaminiert, so zeigen die Zellkulturen meist sichtbare Veränderungen. In Anwesenheit von antibakteriellen Agenzien kann es jedoch zu einer persistierenden Kontamination ohne sichtbare Veränderungen kommen. Mit einiger Übung lassen sich diese im Durchlichtmikroskop erkennen. Darüber hinaus können Bakterien durch eine entsprechende Färbung (z.B. Gramfärbung) von Mykoplasmen unterschieden werden.

Da es in unserem Labor bei der Durchführung von Vorversuchen einmal zu einer Kontamination der SaOS-2 Zellkulturen mit Mykoplasmen und Bakterien gekommen ist, wurden bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen vor jeder neuen Testreihe Kontrollen mit oben genannten Tests durchgeführt, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Verunreinigungen ausschließen zu können.

5.2. Analyse und Isolierung von Metallpartikeln aus Interfacegewebe

Es erfolgte die Austestung verschiedener Möglichkeiten zur Auflösung des Interfacegewebes. Dazu sind prinzipiell drei verschiedene in der Literatur beschriebene Isolationsmethoden für Partikel aus Gewebe anwendbar: die enzymatische Methode, die Basen-Auflösungsmethode und die Säuren-Auflösungsmethode.

5.2.1. Inkubation des Gewebes mit proteolytischen Enzymen

Wir setzten in Vorversuchen folgende Enzyme zur Gewebeauflösung einzeln oder in einer Mischung ein:

- Pronase
- DNase 1
- Collagenase A,B,D
- Trypsin
- Papain
- Hyaluronidase

Da bei diesen Vorversuchen entgegen der Literatur ([9] S. 452, [12] S. 825, [22] S. 380, [25] S. 268, [26] S. 1301, [27] S. 457) keine vollständige Gewebeauflösung erfolgte, wie u.a. in REM-Aufnahmen (Abb. 12) sichtbar wurde, werden diese Versuche hier nicht im Detail aufgeführt. Protokolle zu diesen Versuchen können bei Frau Tübel im Zellkulturlabor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München, Klinikum Rechts der Isar, eingesehen werden.

5.2.2. Inkubation des Gewebes mit verschiedenen konzentrierten Säuren und Laugen

Da die Enzymauflösungsmethode nicht zum gewünschten Ergebnis führte, wurde nach neuen Möglichkeiten gesucht, die Partikel aus Patientengewebe zu extrahieren.

Arbeitsvorschrift Nr. 6

Gewebeauflösung mit verschiedenen Säuren und Laugen:

Ca. 0,5cm³ große Gewebeproben aus Patientengewebe werden in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und jeweils 1,00ml einer der nachfolgenden Säuren bzw. Laugen mit der Pipette hinzugefügt.

- 1 N Natronlauge (NaOH)
- 5 N Natronlauge (NaOH)
- 1 N Salzsäure (HCl) 3,65%
- Salzsäure (HCl) 5%
- Salzsäure (HCl) 10%
- Ameisensäure (HCOOH) 10%

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 36h in einen Thermomixer der Firma Eppendorf gestellt und bei 37°C ± 1K und permanentem Schütteln inkubiert.

Auch diese Versuche führten nicht zur vollständigen Auflösung des Gewebes.

Nach DIN 17869 für Werkstoffeigenschaften von Titan und Titanlegierungen vom Juni 1992 wurden bezüglich Korrosionsbeständigkeit von Titan Tests über den Zeitraum eines Jahres durchgeführt, bei denen Titanblöcke in verschiedenen hochprozentigen Salzsäurelösungen inkubiert und auf 20°C bis zum Kochen erhitzt wurden. In diesen Untersuchungen führte 5-10%ige Salzsäure kochend zu einem Abtrag von weniger als 0,1mm/Jahr. Dies erscheint bei einer Inkubationszeit von wenigen Stunden vernachlässigbar, weshalb wir die Gewebeauflösung mit Salzsäure bei höheren Temperaturen testeten.

5.2.3. Inkubation des Gewebes mit Salzsäure

Patientengewebe wurde mit 5%iger bzw. 10%iger Salzsäure bei 150°C bzw. 200°C über einen Zeitraum von ein oder zwei Stunden erhitzt. Herkunft und Lagerung des Gewebes können Punkt 4.1. entnommen werden.

Arbeitsvorschrift Nr. 7

Gewebeauflösung mit Salzsäure:

Jeweils drei bis vier 0,5cm³ große Gewebestücke (ca. 4g) des vorher aufgetauten

Patientenmaterials werden in ein 10ml Schraubglasgefäß gegeben. Es wird soviel Salzsäure (5%ig bzw. 10%ig) dazugegeben, bis die Gewebeprobe vollständig eintauchen. Anschließend werden die Gefäße vorsichtig unter dem Abzug mit einem Heizrührer der Firma Ikamag erhitzt.

- Gewebe mit 5%iger HCl für 1 h bei $150^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$
- Gewebe mit 10%iger HCl für 1 h bei $150^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$
- Gewebe mit 10%iger HCl für 1 h bei $200^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$
- Gewebe mit 10%iger HCl für 2 h bei $200^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$

Bei Bedarf muss Salzsäure nachgefüllt werden, da diese mit der Zeit verdunstet. Nach Ablauf der Versuchszeit wartet man auf die Abkühlung der Glasgefäße und füllt anschließend die resultierende Lösung zur Weiterverarbeitung mit der Pipette in mehrere 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße um. Die Reaktionsgefäße werden vorher mit der Analysenwaage gewogen, um deren Tara zu bestimmen.

Zur Trennung der Restbestände der Salzsäure von den Partikeln, müssen mehrere Waschstufen durchgeführt werden. Es hat sich in verschiedenen Vorversuchen gezeigt, dass sich erst mit fünf Waschstufen eine klare Lösung erreichen lässt. Dabei werden die Partikel mit destilliertem Wasser, Aceton und PBS gewaschen.

Hierbei gilt es zu beachten, dass man im Interfacegewebe neben Titanpartikeln fast immer Polyethylenabrieb finden kann, da es üblich ist, Inlays aus Polyethylen für die Pfanne als Gleitpaarung zu verwenden.

Laut Hirakawa et al. ([13] S. 1236) sorgt Aceton dafür, dass sich die ebenfalls in den Gewebeprobe enthaltenen Polyethylenpartikel nach dem Zentrifugieren durch ihre im Vergleich mit den Metallpartikeln geringere Masse an der Oberfläche der Lösung ansammeln und mit der Pipette beim Entfernen des Überstands ebenfalls beseitigt werden können. Es ist wichtig, diese Partikel zu entfernen, da in Versuchen mit Zellkulturen gezeigt wurde, dass Polyethylenpartikel die Zellen in ihrer Aktivität beeinflussen können ([8] S. 9, [9] S. 452).

Arbeitsvorschrift Nr. 8

Waschen der Metallpartikel:

Die 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße werden für 30min bei 16060g und $20^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$ in der Biofuge Fresco der Firma Heraeus zentrifugiert. Danach wird der Überstand vorsichtig mit der Pipette entfernt und die Reaktionsgefäße mit 1,00ml destilliertem Wasser wieder aufgefüllt. Um einen ausreichenden Reinigungseffekt für die Partikel zu erreichen, werden nun alle Gefäße im Eppendorf-Thermomixer bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$ und 1250 U/min für 10min geschüttelt. Danach zentrifugiert man die Reaktionsgefäße

wieder in der Biofuge unter o.g. Bedingungen und wiederholt das Ganze einmal. Beim dritten Waschgang fügt man 1,00ml Aceton mit der Pipette hinzu. Es folgt ein erneutes Schütteln, nochmals ein Waschschrift mit destilliertem Wasser und dann ein letzter Waschschrift mit 1,00ml PBS, pH-Wert 7,4, um alle für die Zellkultur schädigenden Einflüsse der verwendeten Reagenzien zu beseitigen. Anschließend werden die einzelnen klaren Lösungen aus den Reaktionsgefäßen wieder in einem 45ml Blue Cap-Röhrchen der Firma Falcon, USA, vereinigt (ca. 20ml).

Diese Versuche zeigten, dass sich nur mit 10%iger Salzsäure und Erhitzen der Lösung für 2h eine vollständige Gewebeauflösung erreichen ließ, weshalb die dabei gewonnenen Partikel für weitere Untersuchungen, z.B. in der AAS und im REM, eingesetzt wurden. Kontrollgewebe wurde von einer Gelenkkapsel entnommen, die intraoperativ während der Erstimplantation einer Hüfttotalendoprothese eines Patienten mit degenerativer Coxarthrose gewonnen wurde (siehe auch [13] S. 1237, [28] S. 1627). Das Gewebe wurde ebenfalls mit 10%iger Salzsäure für 2h bei $200^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$ inkubiert und von dieser vollständig aufgelöst. Es war anschließend kein Sediment in den Schraubglasgefäßen sichtbar, wodurch sich die Waschschrift erübrigten.

5.2.4. Untersuchung der aus dem Gewebe extrahierten Titanpartikel

Von der Partikelsuspension nach Arbeitsvorschrift Nr. 8 (Punkt 5.2.3.) wurden mit der Pipette 100,00 μl auf ein mit Ethanol gereinigtes Deckgläschen gegeben und luftgetrocknet.

Die Proben wurden dann im Rasterelektronenmikroskop (REM) der Firma Cam Scan Electron Optics Ltd., UK, am Lehrstuhl für Metallurgie und Metallkunde der TU München, Garching, unter Leitung der Direktorin, Frau Prof. Gregory, untersucht. Das Auflösungsvermögen lag unter 1nm. Zusätzlich erfolgte zu jeder Aufnahme eine EDX-Analyse (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) mit dem Röntgendetektor PV 9100 der Firma EDAX International, USA, um die Zusammensetzung der gefundenen Partikel verifizieren zu können.

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Zeemann-Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie Spectra A 30 der Firma Varion, Australien, an der FH München im Fachbereich 06 unter Leitung von Herrn Düttmann.

Das Verfahren eignet sich zur Bestimmung von Substanzmengen im Nanogrammbereich und wurde ausgewählt, da bei den hier durchgeführten Versuchen nur geringe Mengen an Titan zu erwarten waren. Vorteile der AAS sind die kurze Messzeit sowie kein Auftreten

nennenswerter Beeinträchtigungen bzw. Verfälschungen der Ergebnisse.

Für die Messung wurde jeweils 1,00ml Partikelsuspension aus der erhaltenen Gesamtlösung von ca. 20ml (Punkt 5.2.3.) eingesetzt.

5.3. Testung des Einflusses von verschiedenen behandelten Titanpartikeln auf Zellkulturen im Rahmen der Durchführung standardisierter Zellkulturtests

In den nächsten Punkten werden die Testprinzipien zur Messung des Einflusses von Titanpartikeln auf das Wachstum und die Letalität von Zellen prinzipiell erläutert.

5.3.1. Kriterien zur Auswahl der Standardtests

Zellkulturen sollten in unserer Arbeit eingesetzt werden, um die Effekte von Titanpartikeln auf deren Entwicklung zu messen. Je genauer die physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper im Zellkulturtest nachgeahmt werden, desto besser sind die beobachteten Reaktionen auf die Situation *in vivo* übertragbar, weshalb diese Tests in simulierten physiologischen Lösungen durchgeführt werden. Bei *in vitro* Untersuchungen werden biochemische Effekte auf die basalen Zellfunktionen und -bestandteile, z.B. Störungen der Membranintegrität und des Stoffwechselapparats, mittels quantitativer und qualitativer Tests bestimmt.

Die unter Punkt 5.3.2. beschriebenen Zellkulturtests wurden aufgrund ihrer bisherigen Relevanz in der Literatur ausgewählt ([2] S. 476, [8] S. 11, [19] S. 83, [29] S. 355, [36] S. 7, [43] S. 382, [53] S. 109), auch weil sie eine eindeutige Aussage darüber ermöglichen, ob die Zellvitalität und Zellproliferation der in diesen Versuchen eingesetzten Osteosarkomzellen beeinflusst wird oder nicht. Die verschiedenen Titanpartikelkonzentrationen haben wir entsprechend Literaturangaben ([21] S. 166, [23] S. 554, [37] S. 400, [49] S. 203, [51] S. 217, [53] S. 107) und eigenen Vorversuchen ausgewählt.

5.3.2. Bestimmung des Einflusses von Titanpartikeln auf SaOS-2 Zellen mittels spezifischer Aktivitäts-/ Differenzierungstests

In dieser Testreihe wurden mit Salzsäure behandelte industriell hergestellte Titanpartikel und nur gewaschene Titanpartikel eingesetzt.

Nach Inkubation der Zellkulturen mit Titanpartikeln wurden folgende Tests durchgeführt:

- MTT - Test
- LDH - Test
- Trypanblau - Test

Zunächst wurde dieses nicht radioaktive, colorimetrische, MTT (3-[4,5-diMethylThiazol-2-yl]-2,5-diphenyl) Tetrazolium bromid) verwendende Versuchssystem 1983 von Mosmann ([32] S. 55) beschrieben. Im vorliegenden Fall wurde der Cell Proliferation Kit 1 (MTT) der Firma Boehringer, Mannheim, verwendet.

MTT-Farbstoff, eine Tetrazoliumverbindung (gelb), wird durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (Enzym des Zitratzyklus, das durch Dehydrierung die Umwandlung von Succinat zu Fumarat katalysiert) in Formazan (blau) umgewandelt, wodurch sich die Wellenlänge der maximalen Absorption im sichtbaren Spektrum ändert. Die Konzentration des gebildeten Formazans kann spektroskopisch bestimmt werden und ist direkt proportional zur zellulären Aktivität und der Anzahl vitaler Zellen.

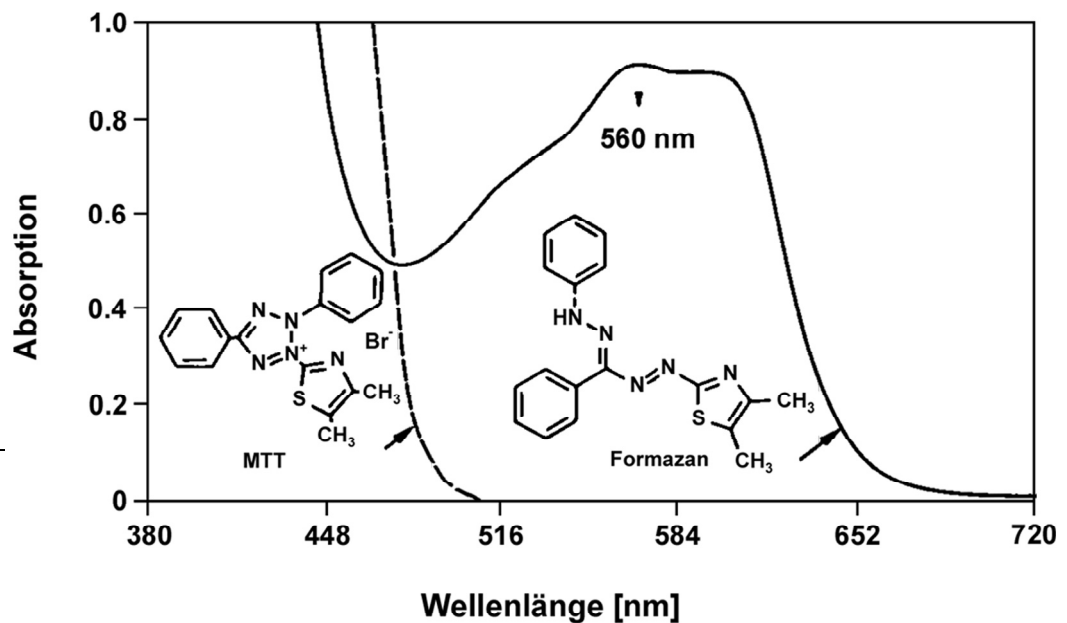


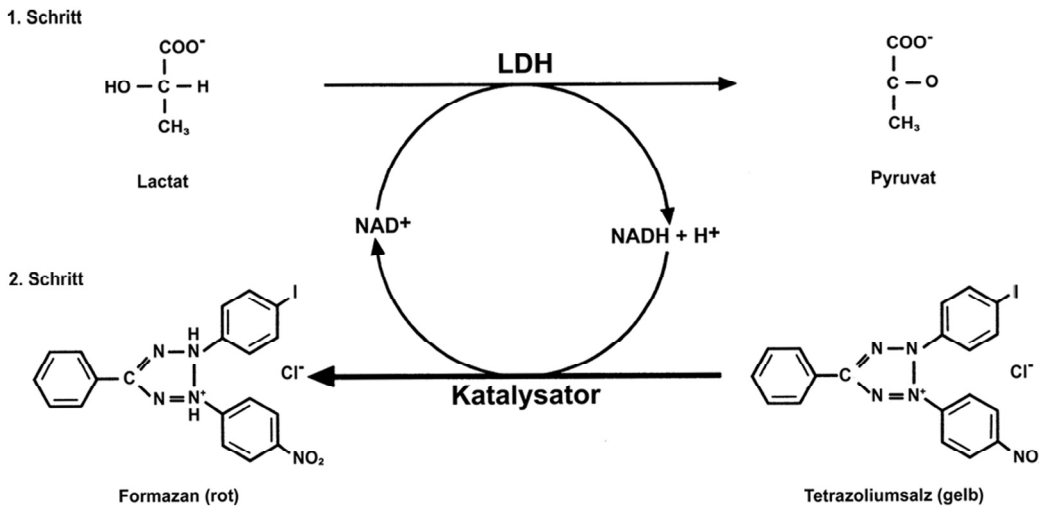
Abb. 6
Verstoffwechslung
von MTT zu
Formazansalz in
vitalen Zellen

Der MTT-Test eignet sich v.a. für die Messung kleiner Zellzahlen. Die Absorption korreliert streng mit der Zellzahl. Durch die Verwendung von Multiwell-ELISA-Readern können große Versuchsreihen zügig durchgeführt werden. Des weiteren werden keine Waschschrte bzw. zusätzlichen Reagenzien benötigt.

Zelltod wird klassischerweise beurteilt nach der Schädigung der Plasmamembran einer Zelle. Dabei kann man die Aktivität der freigesetzten, sich normalerweise im Zytoplasma befindlichen Enzyme messen. Die Menge der Enzymaktivität, welche im Kulturüberstand festgestellt wurde, korreliert proportional zur Menge der lysierten Zellen. Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles Enzym, das im Zytoplasma aller Zellen vorkommt und für die Dehydrierung von L-2-Hydroxymonocarbonsäuren und die Katalyse der Reaktion - Pyruvat zu Lactat - zuständig ist. Kommt es zu einer Schädigung

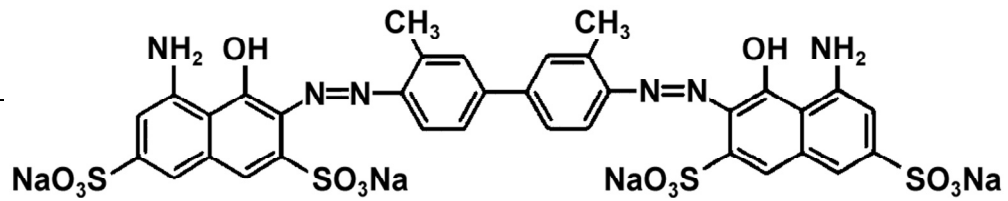
Kapitel 5. Methodik und Versuchsanordnung

der Plasmamembran, wird es zügig in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Durch Verwendung des Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim kann die LDH-Aktivität einfach mit einer einzigen Messung im Kulturüberstand bestimmt werden.



Der Kulturüberstand wird zellfrei gesammelt und mit einer Reaktionsmischung des Kits inkubiert. Die LDH-Aktivität lässt sich anschließend mit einem enzymatischen Test bestimmen. Im ersten Schritt wird NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert, aufgrund der LDH-katalysierten Umwandlung von Lactat zu Pyruvat. Im zweiten Schritt überträgt dann der Katalysator H/H⁺ von NADH/H⁺ auf das gelbe Tetrazoliumsals INT, welches dabei zu Formazan reduziert wird. Eine erhöhte Anzahl von toten oder geschädigten Zellen resultiert in einer gesteigerten LDH-Enzymaktivität im Überstand. Dieser Anstieg der Enzymaktivität korreliert direkt mit der Menge des während eines bestimmten Zeitraums gebildeten Formazans. Deshalb ist die Stärke der gebildeten Färbung proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. Der entstehende Formazanfarbstoff ist wasserlöslich und hat ein breites Absorptionsspektrum bei 500nm, wohingegen das Tetrazoliumsals INT keine signifikante Absorption in diesem Wellenlängenbereich zeigt.

Abb. 8
Chemische Formel
von Trypanblau



Trypanblau ist ein nicht toxischer Farbstoff, der bei intakter Zellmembran nicht in die Zelle eindringen kann. Damit sind nur avitale Zellen färbbar und erscheinen blau. Vitale Zellen weisen eine intakte Zellmembran auf und schließen damit den Farbstoff aus. Die Zelle erscheint farblos und transparent.

Die quantitative Bestimmung der vitalen und avitalen Zellen kann durch Zählung in einer Zählkammer, im vorliegenden Fall mit dem Hämozytometer nach Neubauer, unter einem Durchlichtmikroskop erfolgen. Dieser Test ist eines der am häufigsten durchgeführten Verfahren, um die Gesamtzellzahl und den prozentualen Anteil an vitalen und avitalen Zellen zu bestimmen. In Gegenwart des Probenmaterials kann man durch die direkte Bestimmung der abgestorbenen Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Rückschlüsse auf die toxischen Einflüsse ziehen.

Das gewählte Verfahren ist relativ anfällig für Fehler, vor allem beim Pipettieren und beim Zählen der Zellen unter dem Durchlichtmikroskop. Der Vorteil liegt jedoch in einer sehr einfachen und schnellen Durchführung.

5.3.3. Testung von Titanpartikeln mit Salzsäure-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Titanpartikeln

Da zur Extraktion von Titanpartikeln aus dem Interfacegewebe 10%ige Salzsäure verwendet werden sollte, musste untersucht werden, ob solchermaßen behandelte Partikel auf Zellkulturen die gleichen Effekte haben wie nicht behandelte industriell hergestellte Titanpartikel. Dazu wurden Zellkulturen von SaOS-2 Zellen einmal mit HCl-exponiertem Titanstaub und einmal mit nicht HCl-exponiertem Titanstaub inkubiert. Nach 72h und 96h wurden dann mit Hilfe der oben vorgestellten Zellkulturtests Vitalität und Zellzytotoxizität überprüft und verglichen.

Als Material wurde 99,9% reines Titanpulver (< 45µm) der Firma TLS-Technik Bitterfeld verwendet (siehe Punkt 4.2.).

Um eine standardisierte Testdurchführung zu gewährleisten, wurden alle Tests nach einem vorher festgelegten Plan durchgeführt und die Parameter der einzelnen Tests jeweils dreifach bestimmt. Die Versuchsdurchführung erfolgte unter sterilen und immer gleich bleibenden Bedingungen.

Zunächst muss man die erforderliche Menge an Zellen für die Versuchsdurchführung berechnen. Aus den Schemen 1 und 2 (Abb. 9 Punkt 5.3.3.3. und Abb. 10 Punkt 5.3.3.5.) kann man die Anzahl der Wells pro Testplatte berechnen. Man benötigt für MTT-Test und LDH-Test zusammen vier Mikrottestplatten mit jeweils 96 Wells, wobei pro Platte je 54 Wells belegt werden. Pro Well sollen 5.000 Zellen ausgesät werden. Des Weiteren werden vier Testplatten mit je 12 Wells verwendet. Da bei der 12-Well Testplatte die Wachstumsfläche 3,8cm² beträgt, was 12x der Wachstumsfläche der 96-Well Testplatte (0,32cm²) entspricht, werden hier pro Well 50.000 Zellen ausgesät.

Berechnung der Zellzahl für MTT- und LDH-Test:

$$\begin{aligned} & 5.000 \text{ Zellen}/100,00\mu\text{l Medium} \times 54 \text{ Wells} \times 4 \text{ Testplatten} \\ & = 1.080.000 \text{ Zellen}/21,60\text{ml Medium 1} \end{aligned}$$

Um eventuelle Fehler beim Pipettieren ausgleichen zu können, sollte man die benötigte Anzahl an Zellen auf 1,5Mio. Zellen/30,00ml Medium 1 aufrunden.

Berechnung der Zellzahl für den Trypanblau-Test:

$$\begin{aligned} & 50.000 \text{ Zellen}/1,00\text{ml Medium} \times 10 \text{ Wells} \times 4 \text{ Testplatten} \\ & = 2.000.000 \text{ Zellen}/40\text{ml Medium 1} \end{aligned}$$

Aufgerundet benötigt man ca. 2,5Mio. Zellen in 42,50ml Medium 1.

Damit sich die Zellen während der Versuchsreihe in der aufsteigenden Phase ihrer Wachstumskurve befinden, müssen sie 48h vor Versuchsbeginn nach Arbeitsvorschrift Nr. 2 (Punkt 5.1.2.) in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium 1 dünn ausgesät und bei den üblichen Bedingungen inkubiert werden.

Danach erfolgt die Zellablösung von der Kulturflaschenoberfläche nach Arbeitsvorschrift Nr. 4 (Punkt 5.1.3.1.) und eine Zellzählung nach Arbeitsvorschrift Nr. 5 (Punkt 5.1.3.1.).

Die Gesamtzahl wird wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{Anzahl der gezählten Zellen}/4 \times 10000 \\ & = \text{Konzentration}/\text{ml} \times \text{Anzahl der ml im Blue-Cap-Röhrchen} \\ & = \text{Gesamtzahl der Zellen} \end{aligned}$$

Die Zellen in dem 15ml Blue Cap-Röhrchen der Firma Falcon, USA, werden nun für 10min bei 1000U/min in der Zentrifuge 5804 R mit Ausschwingrotor für Zellkulturen der Firma Eppendorf, Hamburg, zentrifugiert. Dann wird der Überstand mit der Pipette vorsichtig entfernt und die entsprechende Menge an Medium 1 hinzugegeben, um

5.000 Zellen/100,00 μ l bzw. 50.000 Zellen/ml zu erhalten.

Nach den Schemen 1 und 2 (Abb. 9 Punkt 5.3.3.3. und Abb. 10 Punkt 5.3.3.5.) lässt sich die erforderliche Titanstaubmenge für jeden Test exakt berechnen.

Berechnung für die 96-Well Mikrottestplatte:

*Ca. 186 μ g Titanstaub je mit bzw. ohne HCl-Behandlung x 4 Testplatten
= je 742 μ g.*

Aufgerundet benötigt man je 1mg pro Titanpartikelart für MTT- und LDH-Test zusammen.

Da beim Trypanblau-Test im Vergleich zum LDH- und MTT-Test die Wells der Testplatten um den Faktor 12 größer sind und deshalb auch deutlich mehr Zellen benötigt werden, ist es einleuchtend, die Titanpartikelkonzentrationen ebenfalls angepasst zu erhöhen. Dabei entsteht jedoch das Problem eines massiven Materialverbrauchs an Zellen sowie Partikeln, weshalb die Ergebnisse von nur vier Titanpartikelkonzentrationen in zweifacher Bestimmung ermittelt wurden.

Berechnung für die 12-Well Testplatte:

*Ca. 1,1mg Titanstaub pro Platte x je 2 Testplatten mit HCl- und ohne HCl-Behandlung
= je 2,2mg.*

Aufgerundet sind das 2,5mg je Titanpartikelart.

Damit ein Vergleich zu den aus dem Interfacegewebe von Patienten gewonnenen Titanpartikeln gezogen werden kann, müssen vor Versuchsbeginn auch die industriell hergestellten Partikel mit Salzsäure inkubiert und den entsprechenden Waschschritten der Versuchsanordnung unterzogen werden.

Arbeitsvorschrift Nr. 9

Inkubation der industriell hergestellten Titanpartikel mit Salzsäure:

Man wiegt zunächst 1,00g Titanstaub in ein 10ml Schraubglasgefäß mit der Analysenwaage der Firma Scaltec ab. Anschließend werden die Partikel mit der 10%igen Salzsäure inkubiert und vorsichtig unter dem Abzug auf 200°C \pm 1K für 2h erhitzt. Bei Bedarf muss Salzsäure-Lösung nachgefüllt werden, da diese mit der Zeit verdampft. Nach Ablauf der Versuchszeit wartet man auf die Abkühlung des Glasgefäßes und füllt

anschließend den Inhalt zur Weiterverarbeitung mit der Pipette in mehrere 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße um. Die Reaktionsgefäße werden zuvor mit der Analysenwaage gewogen, um deren Tara zu bestimmen. Im Anschluss erfolgen die Waschschriffe wie in Arbeitsvorschrift Nr. 8 (Punkt 5.2.3.) beschrieben. Nun werden die Partikel getrocknet. Dazu werden die geöffneten Reaktionsgefäße mit ihrem Inhalt für 24h im Eppendorf-Thermomixer bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$ alle 5min für 1min geschüttelt. Anschließend erfolgt ein erneutes Wiegen der Reaktionsgefäße, um einen eventuell aufgetretenen Partikelverlust messen zu können. Dann müssen die Partikel in den Reaktionsgefäßen für 20min bei 215kPa autoklaviert werden, um die Sterilitätsbedingungen für die Versuche mit der Zellkultur herzustellen.

Für die Untersuchungen mit unbehandelten Titanpartikeln, werden entsprechende Mengen Titanstaub direkt in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen, in 5 Waschschriffen gewaschen und anschließend getrocknet.

Schlussfolgerungen aus mehreren Vorversuchen mit Metallpartikeln und Zellkulturen für die weitere Durchführung:

- Bei Konzentrationen kleiner $0,01\mu\text{g}$ Titanpartikeln pro Well werden die Messungen ungenau.
- Nach dem Anwachsen der Zellen nach 24h müssen alle Wells mit frischem Medium 1 versorgt werden, um eine optimale Nährstoffversorgung der Zellen während der Versuchsdurchführung gewährleisten zu können.
- Metallpartikel dürfen nur in Medium 1 verdünnt werden, da es sonst zu einer Änderung der Medienzusammensetzung bei den durchgeführten Tests und damit zur Schädigung der Zellkulturen kommt.
- Man sollte nicht mehr als 10mg Titanpartikel in die 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße einwiegen, da sonst Ungenauigkeiten beim Pipettieren und Herstellen der Verdünnungsreihe auftreten können.
- Metallpartikel haften an allen Plastikoberflächen (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) und lassen sich nur schwer wieder lösen.
- Metallpartikel können aufgrund ihrer Schwerkraft und Adhäsionskräfte untereinander nur pipettiert werden, wenn die Reaktionsgefäße während des Entnehmens der Partikellösung permanent geschüttelt werden.

Nachdem die Zellen, wie unter Punkt 5.3.3.1. beschrieben, für die Versuchsreihe vorbereitet wurden, erfolgt nun die Durchführung des MTT-Test.

Arbeitsvorschrift Nr. 10

Vorbereitung der Testplatten für den MTT-Test:

Für diesen Test werden zwei 96-Well Mikrotestplatten (für 72h und 96h) der Firma Falcon, USA, mit flachem Boden für adhärenente Zellen und einer Wachstumsfläche von 0,36cm² verwendet. Es werden jeweils 5 x 10³ Zellen/Well in 100,00µl Medium 1 nach Schema 1 (Abb. 9) ausgesät. Anschließend erfolgt für 24h die Inkubation der Testplatten bei 37°C ± 1K und 5% CO₂-Anteil an der Raumluft. Nach dieser Zeit sind die Zellen angewachsen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	1 µg	10 µg	50µg			
B		10 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	1 µg	10 µg	50µg			
C		10 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	1 µg	10 µg	50µg			
D												
E												
F		10 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	1 µg	10 µg	50µg		PK*	NK
G		10 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	1 µg	10 µg	50µg		PK*	NK
H		10 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	1 µg	10 µg	50µg		PK*	NK

Abb. 9
 Schema 1 - 96-Well
 Mikrotestplatte mit
 den vorgesehenen
 Titanpartikel-
 konzentrationen
 (Masse/100µl)

* nur bei LDH-Test

Arbeitsvorschrift Nr. 11

Beschicken der Testplatten mit Titanpartikeln (MTT- und LDH-Test):

Man entfernt den Überstand an Medium 1 je Well vorsichtig mit einer Pipette. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Zellen nur kurzzeitig ohne Medium überleben können, und bei Überschreitung dieser Zeit bereits Zellen absterben. Nun fügt man die entsprechenden, vorher in der Verdünnungsreihe 1 (Arbeitsvorschrift Nr. 12) hergestellten Partikelkonzentrationen nach Schema 1 in je 100,00µl Medium 1 hinzu. In die Reihen A, B und C werden die mit Salzsäure behandelten Partikel pipettiert, in die Reihen F, G und H die Partikel ohne Salzsäure-Behandlung. Außerdem benötigt man zusätzlich immer eine Negativkontrolle, bei der die Zellen ohne jede Beeinträchtigung wachsen können. Die Testplatten werden bei den üblichen Bedingungen (Punkt 5.1.2.) für 72h und 96h inkubiert und täglich unter dem

Durchlichtmikroskop auf Wachstum und eine eventuelle Kontamination mit Bakterien überprüft.

Arbeitsvorschrift Nr.12

Herstellung der Verdünnungsreihe 1 für den MTT-Test:

Es wird steril unter der Laminar Flow Herasafe der Firma Heraeus gearbeitet. Man stellt zunächst aus einer Stammlösung die höchste Konzentration von 50µg Titanpartikeln/100µl Medium her und verdünnt diese dann entsprechend den benötigten niedrigeren Konzentrationen mit Medium 1.

Beispiel:

Gegeben ist ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2,5mg Titanpartikeln. Dazu gibt man mit der Pipette 1,00ml Medium 1 und erhält damit eine Stammlösung mit 2500µg Titanpartikeln in 1000,00µl Medium 1. Nun entnimmt man von dieser Lösung 100,00µl (=250µg/100,00µl) und gibt 400,00µl Medium 1 dazu. Dadurch erhält man die gewünschte Konzentration von 250µg Titanpartikeln in 500,00µl Medium = 50µg/100,00µl. Die in unseren Versuchen ebenfalls eingesetzten Konzentrationen von 10µg/100µl, 1µg/100µl, 500ng/100µl, 200ng/100µl, 100ng/µl, 50ng/µl und 10ng/µl lassen sich entsprechend herstellen.

Die 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße werden aufgrund der in Punkt 5.3.3.6. beschriebenen Problematik in Bezug auf die eigene Schwerkraft und Adhäsionskräfte der Partikel während der gesamten Herstellung der Verdünnungsreihe und während der Beschickung der Testplatten mit den Metallpartikeln bei 37°C ± 1K im Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf, Berlin, permanent geschüttelt.

Arbeitsvorschrift Nr. 13

Durchführung des MTT-Tests:

Nach der Inkubationsperiode der Zellen mit den Titanpartikeln gibt man in jedes Well 10,00µl der MTT-Markerreagenz und inkubiert die Mikrottestplatte wiederum für 4h. Dabei entstehen purpurfarbene Formazansalzkrystalle, die in wässriger Lösung ausfallen, sich aber in dem Lösungsreagenz des Kits wieder auflösen. Es werden also nach 4h 100,00µl des Lösungsreagenz in jedes Well pipettiert und die Testplatten erneut für 24h inkubiert. Wenn die Kristalle gänzlich aufgelöst sind, wird die Absorption im ELISA-Reader der Firma Lab Systems, Heidelberg, bei 550-600nm gemessen.

Zur Auswertung des MTT-Test errechnet man die Mittelwerte aus der Dreifachbestimmung der einzelnen Partikelkonzentrationen, sowie den Mittelwert der Negativkontrolle, der 100% entspricht. Damit kann die Zellvitalität im Vergleich zu

den verschiedenen Partikelkonzentrationen ermittelt werden.

Die Vorbereitung der Testplatten, die Herstellung der Verdünnungsreihe und die Beschickung der Testplatten mit den Titanpartikeln erfolgen analog den Arbeitsvorschriften Nr. 10, 11 und 12 (Punkt 5.3.3.3.).

Im Gegensatz zum MTT-Test gibt es hier eine Negativ- sowie Positivkontrolle.

- Die Positivkontrolle ist dabei der maximalen LDH-Freisetzung aus den voll lysierten Zellen gleichzusetzen (=Zelltod).
- In der Negativkontrolle misst man die Freisetzung von LDH aus den intakten lebenden Zellen.

Arbeitsvorschrift Nr. 14

Durchführung des LDH-Tests:

Bevor man den Überstand nach der Inkubationsperiode gewinnt, müssen die Mikrottestplatten bei 250g für 10min in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor für Zellkulturen der Firma Eppendorf, Hamburg, zentrifugiert werden, damit keine Zellen oder Partikel im Überstand zurückbleiben, die das Messergebnis beeinflussen könnten. Man pipettiert nun alle Überstände je ca. 100,00µl/Well nach Schema 1 in eine neue 96-Well Mikrottestplatte.

Dann wird zunächst das Reaktionsgemisch hergestellt. Für 100 Wells mischt man 250,00µl aus Flasche 1 (Katalysator) mit 11,25ml aus Flasche 2 (Farblösung). Davon werden 100,00µl in jedes Well pipettiert und die Mikrottestplatten für 30min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Verfälschung des Ergebnisses bis zur Messung zu verhindern, wird die Reaktion mit 50,00µl 1 N HCL pro Well abgestoppt. Die Positivkontrolle erhält man durch Zugabe von 100µl 2%iger Triton X-100 Lösung/Well, wodurch eine Lyse aller Zellen hervorgerufen wird (=Zelltod).

Die Messung der Extinktion erfolgt bei 490nm im ELISA-Reader der Firma Lab Systems, Heidelberg.

Zur Auswertung des Tests errechnet man nun aus den Extinktionswerten die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen der einzelnen Titanpartikelkonzentrationen, sowie die der Negativ- und Positivkontrolle.

Die Zellzytotoxizität berechnet sich wie folgt:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Mittelwert je Ti - Partikelkonz.} - \text{NK}}{\text{PK} - \text{NK}} \times 100$$

Nachdem die Zellen, wie unter Punkt 5.3.3.1. beschrieben, für die Versuchsreihe vorbereitet wurden, erfolgt nun die Durchführung des Trypanblau-Test.

Arbeitsvorschrift Nr. 15

Vorbereitung des Trypanblau-Tests:

Verwendet werden für diesen Versuch vier Testplatten der Firma Falcon, USA, à 12-Well mit einer Wachstumsfläche von 3,8cm²/Well

(zwei für Versuche mit HCl-behandelten Titanpartikeln und zwei für Titanpartikel ohne HCl-Behandlung je Inkubationszeiten 72h/96h). Es werden nach Schema 2 (Abb. 10) pro Well 5 x 10⁴ Zellen in 1,00ml Medium 1 ausgesät werden. Die Platten werden dann für 24h bei 37°C ± 1K und einem 5%igen CO₂-Anteil an der Raumluft inkubiert.

	1	2	3	4
A	100 ng	1 µg	10 µg	500 µg
B	100 ng	1 µg	10 µg	500 µg
C	NK	NK		

Abb. 10
Schema 2 - 12-Well
Testplatte mit den
vorgesehenen
Titanpartikel-
konzentrationen
(Masse/ml)

Arbeitsvorschrift Nr. 16

Beschicken der Testplatten mit Titanpartikeln (Trypanblau-Test):

Das verbrauchte Nährmedium 1 wird mit der Pipette vorsichtig aus den Wells entfernt und die gewünschte, vorher in der Verdünnungsreihe 2 (Arbeitsvorschrift Nr. 17) hergestellte Konzentration an Titanpartikeln in jeweils 1,00ml frischem Medium 1 nach Schema 2 hinzugegeben. Anschließend werden die Testplatten für 72h und 96h inkubiert.

Arbeitsvorschrift Nr. 17

Berechnung der Verdünnungsreihe 2 zur Herstellung der gewünschten Partikelkonzentration für den Trypanblau-Test:

Siehe auch Arbeitsvorschrift Nr. 12 (Punkt 5.3.3.3.) für die allgemeinen Hinweise zur Durchführung.

Beispiel:

Gegeben ist ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 5,0mg Titanpartikeln in das 1,00ml Medium mit der Pipette hinzugefügt wird. Es resultiert eine Stammlösung von 5000µg Titanpartikeln in 1000,00µl Medium 1 = 500µg Titanpartikel/100,00µl. Daraus werden 100,00µl entnommen und 900,00µl Medium 1 hinzugegeben = 50µg Titanpartikel/100,00µl. Um die ebenfalls gewünschten Konzentrationen von 10µg/100µl, 1µg/100µl und 100ng/100µl zu erhalten, werden analoge Verdünnungsschritte durchgeführt.

Da pro Well 1,00ml der Suspension eingesetzt werden sollte, wurden schließlich zu jeder Konzentration noch 900,00µl Medium 1 zugesetzt. Damit resultieren Partikelsuspensionen von 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml und 100µg/ml.

Arbeitsvorschrift Nr. 18

Durchführung des Trypanblau-Tests:

Nach 72h und 96h wird zunächst der Überstand an Medium 1 aus allen Wells mit der Pipette entfernt, das enthaltene FCS mit PBS inaktiviert und danach die Zellen nach Arbeitsvorschrift Nr. 4 (Punkt 5.1.3.1.) abtrypsiniert, wobei jedoch aufgrund unterschiedlicher Größenverhältnisse der Testplatte im Vergleich zur Zellkulturflasche nur je 0,50ml Puffer und Trypsin pro Well verwendet werden. Je 1,00ml pro Well wird anschließend in ein 2ml Reaktionsgefäß umgefüllt und mit dem Mixer der Firma Vortex, 30sec bei 1000U/min gemischt. Man färbt nun nach Arbeitsvorschrift Nr. 5 (Punkt 5.1.3.1.) die avitalen Zellen an. Mit der Methode nach Neubauer und seiner Zählkammer werden schließlich unter dem Durchlichtmikroskop Axiovert 25 der Firma Zeiss Jena alle 4 Kästchen sorgfältig ausgezählt, zunächst alle weißen und dann alle dunkelblau gefärbten Zellen.

Die Zellzahl pro ml errechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl /ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 10000$$

Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Anzahl der lebenden und toten Zellen und beträgt immer 100%. Von dieser Gesamtzahl errechnet man den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen, der ein Maß für die Toxizität der im Versuch anwesenden Partikel darstellt, im Vergleich zur Negativkontrolle.

Wie in den Vorversuchen festgestellt werden konnte, zeigten sich deutliche Probleme beim Arbeiten mit den Titanpartikeln. Die Partikel haften besonders stark an allen Plastikoberflächen, wie z.B. an Pipettenspitzen und 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen, wodurch eine optimale Herstellung der Verdünnungsreihe nicht erreicht werden konnte. In der Literatur ([21] S.164, [42] S. 862) wird eine Behandlung der Partikel mit Ultraschall empfohlen, um die Agglomerationsbereitschaft der Metallpartikel zu senken. In unseren Versuchen zeigte sich jedoch keine eindeutige Reduktion der Adhäsionskräfte zwischen den Partikeln sowie immer eine Schwarzfärbung der Titanpartikellösung nach Ultraschallbehandlung. Daraus schliessen wir, dass es offensichtlich zu einer chemischen

Reaktion mit einer Veränderung des vorbestehenden Medienmilieus gekommen ist, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse der Zellkulturtests führen könnte. Aus diesem Grund haben wir uns gegen diese Methode entschieden. Wir konnten jedoch durch permanentes Schütteln der in Lösung vorliegenden Partikel Verluste während des Pipettierens verringern.

Eine Quantifizierung des auftretenden Verlustes durch Adhärenz der Partikel an allen Oberflächenmaterialien erfolgte durch Wiegen der Eppendorf-Reaktionsgefäße vor dem Einfüllen der Titanpartikel und nach den Waschgängen (Ergebnis siehe Punkt 6.3.).

6. ERGEBNISSE

6.1. Untersuchung des Zusatzes verschiedener Chargen Kälberserum zu Zellkulturmedium als Stimulator für das Wachstum von SaOS-2 Zellen

Fetales Kälberserum (FCS) sollte in unseren Versuchen als Wachstumsstimulator zu Zellkulturmedium (DMEM) hinzugegeben werden, um die SaOS-2 Zellen spezifisch mit Nährstoffen zu versorgen. Es wurden zuerst drei verschiedene Chargen FCS getestet und jeweils eine Wachstumskurve je Charge erstellt (Punkt 5.1.3.2.). Da FCS ein Naturprodukt ist und es somit keine feste Zusammensetzung der Bestandteile gibt, sollte die optimale Charge für die Wachstumsstimulation ermittelt werden.

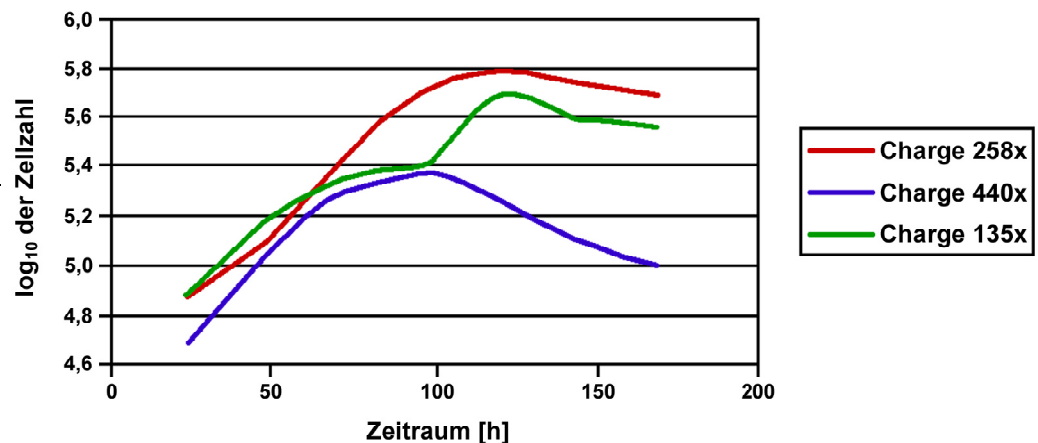


Abb. 11
Wachstumskurven nach Zugabe von verschiedenen Chargen FCS (258x, 440x und 135x) zum DMEM, SaOS-2 Zellen

Bei der verwendeten SaOS-2 Zelllinie bewirkte die Charge 258x von FCS den stärksten Wachstumsimpuls. Die Zellen befanden sich nach Zugabe des FCS der Charge 258x zwischen 48h und 96h in der exponentiellen Wachstumsphase. Deshalb wurden die weiteren Versuche immer im Zeitraum 48h bis 96h durchgeführt. Die Verringerung des Zellwachstums nach 144h wird vor allem durch das Alter der Zellen und die erreichte hohe Zelldichte bedingt. Die Charge 440x von FCS ergab den geringsten und kürzesten Wachstumsimpuls in unseren Versuchen. Diese Voruntersuchungen zeigten, dass ein Screening verschiedener Chargen FCS unbedingt notwendig war, um eine geeignete Charge für die Wachstumsversuche mit SaOS-2 Zellen auswählen zu können.

6.2. Untersuchung der Titanpartikel nach Auflösung des Patientengewebes

6.2.1. Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Partikel

In Vorversuchen wurde Titanpartikel enthaltendes Patientengewebe nach verschiedenen Methoden aufgelöst (Punkt 5.2.). Die Effektivität des Aufschlußverfahrens wurde mittels REM gekoppelt mit einer EDX-Analyse überprüft.

Der Versuch der Auflösung des Interfacegewebes mit Enzymen ergab dabei keine klaren gewebefreien Lösungen.

Die REM-Aufnahme Abb. 12 zeigt dementsprechend neben einzelnen Titanpartikeln, mit einem mittleren Durchmesser von 1µm, größere Gewebereste.

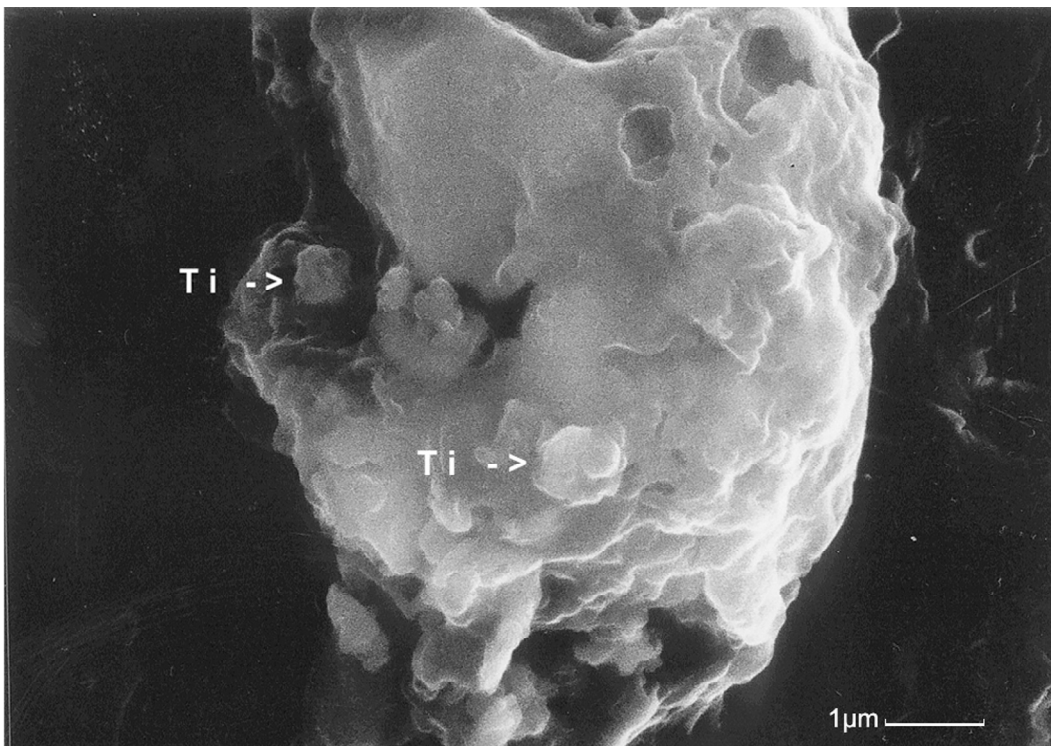
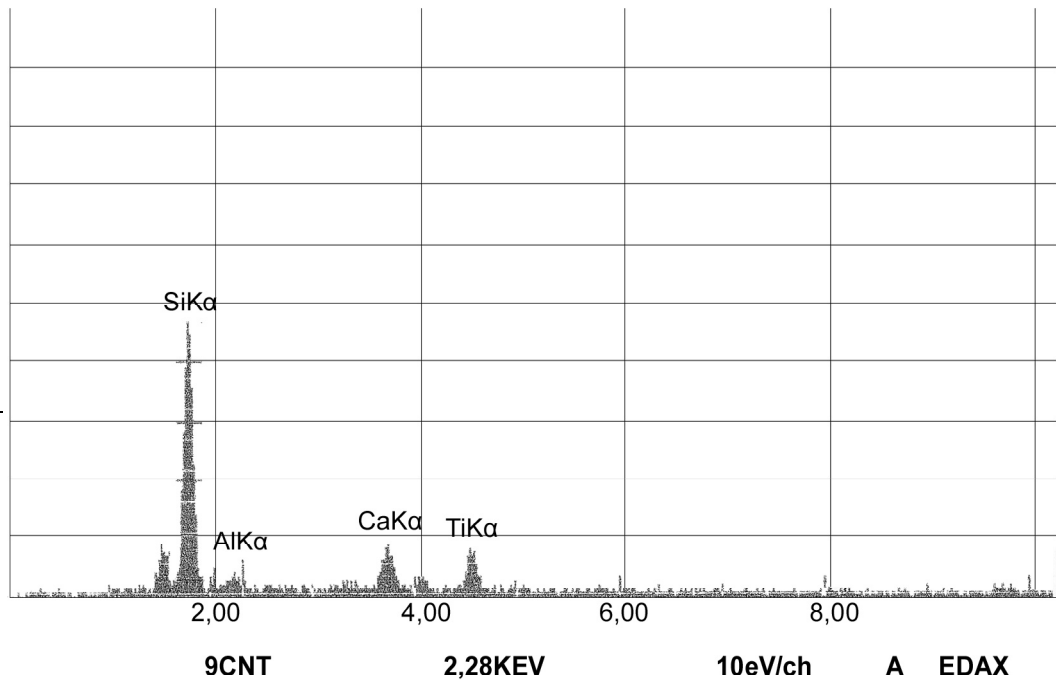


Abb. 12
REM – Aufnahme von Partikeln, gewonnen aus Patientengewebe, Patient Nr. 5, nach der Enzymauflösungsmethode

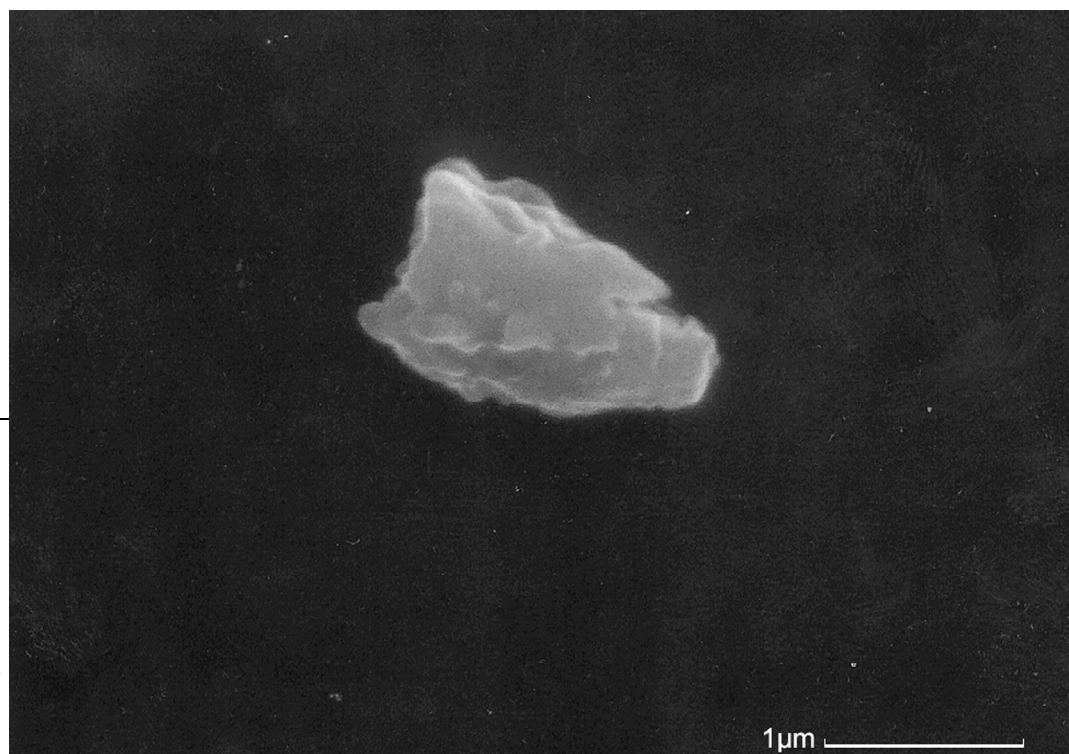
In Abb. 13 ist zusätzlich die entsprechende EDX-Analyse dargestellt. Neben dem Titannachweis, sind weitere Peaks von Calcium (aus der Knochensubstanz) und Aluminiumspuren sichtbar. Der Silicium-Peak ergab sich bei allen Aufnahmen aufgrund der als Unterlage verwendeten Glasobjektträger. Bei der EDX-Analyse wurde deutlich, dass nur einzelne Titanpartikel in der aufgearbeiteten Gewebeprobe eingeschlossen waren.

Abb. 13
EDX – Analyse von
Partikeln, gewonnen
aus
Patientengewebe,
Patient Nr. 5, nach
der Enzym-
auflösmethode



Der Einsatz von 10%iger Salzsäure (siehe Punkt 5.2.3.) führte zu einer vollständigen Auflösung des Patientengewebes, so dass ca. 1µm große Titanabriebpartikel isoliert werden konnten. In Abb. 14 ist ein von jeglichen Geweberesten freier Titanpartikel abgebildet.

Abb. 14
REM – Aufnahme
von Partikeln,
gewonnen aus
Patientengewebe,
Patient Nr. 5, nach
der
Gewebeauflösungs-
methode mit
10%iger Salzsäure



Die entsprechende EDX-Analyse in Abb. 15 zeigt einen deutlichen Titangehalt des Partikels an. Zusätzlich sind ebenfalls Spuren von Calcium und Aluminium sichtbar.

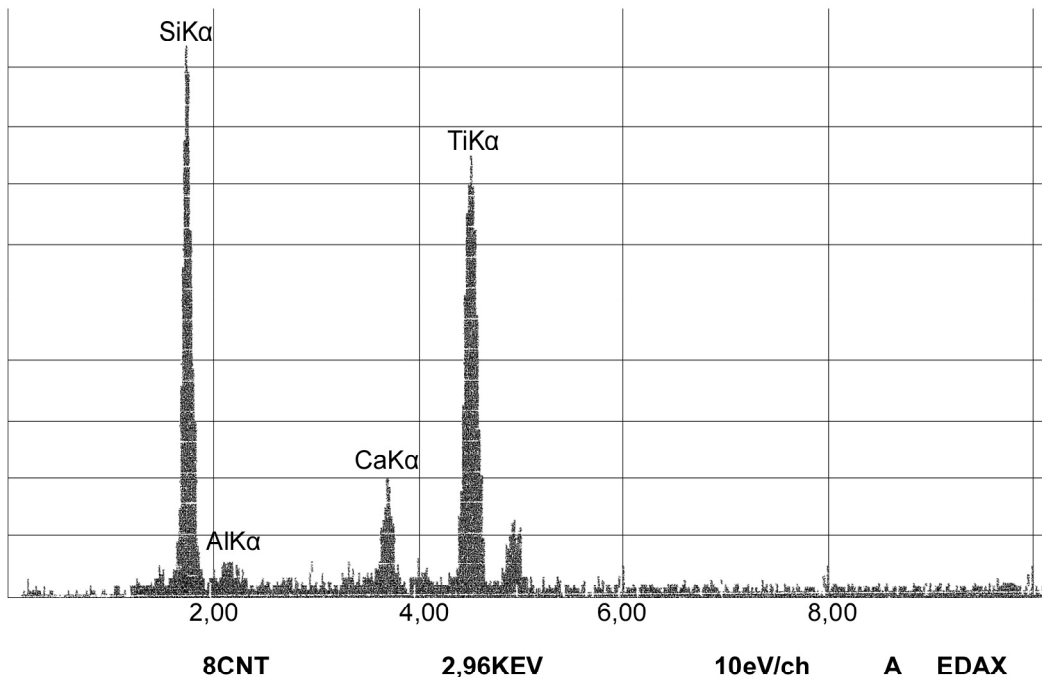


Abb. 15
EDX – Analyse von Partikeln, gewonnen aus Patientengewebe, Patient Nr. 5, nach der Gewebeauflösungsmethode mit 10%iger Salzsäure

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluss ziehen, dass derartig isolierte Originalpartikel aus Patientengewebe für weitere Experimente mit Zellkulturen geeignet sind. Allerdings muss kritischerweise angemerkt werden, dass die REM-Darstellung von Metallpartikeln stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist.

6.2.2. Quantifizierung der gewonnenen Titanabriebpartikel mittels Atomabsorptionsspektroskopie

Bei Revisionsoperationen gewonnenes Interfacegewebe von 5 verschiedenen Patienten (Punkt 4.1.) mit Hüfttotalendoprothesen aus Titan wurde mit 10%iger Salzsäure bei $200^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$ für 2h inkubiert, um die darin enthaltenen Titanpartikel aus dem Gewebe zu isolieren (Punkt 5.2.3.). Für die Extraktion wurden jeweils drei bis vier $0,5\text{cm}^3$ große Interfacegewebestücke (ca. 4g) pro Patient eingesetzt. Nach den Waschschritten resultierten jeweils ca. 20ml klare Lösung, von der 1,00ml in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und anschließend mittels Atomabsorptionsspektroskopie analysiert wurde. Dadurch konnte die erhaltene Titanpartikelmenge quantifiziert werden. In Tab. 2 werden die Ergebnisse dieser Untersuchung für Gewebe aus dem Interface der Pfanne und des Stiels zusammengefasst.

Die Mengen an gefundenen Titanpartikeln in den 20ml der Proben aus dem Interface des Stiels betragen zwischen $27,86\mu\text{g}$ und $45,94\mu\text{g}$ pro eingesetzten 4g Gewebe. Die Werte aus dem Interface der Pfanne waren noch niedriger, $8,68\mu\text{g}$ bis $43,74\mu\text{g}$ pro 4g Gewebe.

Bei Patient Nr. 1 und Nr. 3 konnte kein Wert für die Partikelkonzentration im Interfacegewebe des Stiels angegeben werden, da es sich bei der Operation nur um einen Pfannenwechsel handelte.

Aus diesen Ergebnissen lässt

sich für Patient Nr. 5 (Interfacegewebe Stiel) ein Titanpartikelanteil von 0,001% pro 4g Gewebe errechnen. Das bedeutet, dass man ca. 100g des Gewebes aufarbeiten müsste, um 1mg Titanabrieb isolieren zu können. Da diese Gewebemenge pro Patient nicht zur Verfügung stand, ließen sich Abriebpartikel aus Patientengewebe nicht für unsere Versuche mit Zellkulturen einsetzen. Die erhaltenen Mengen an Titanpartikeln sind ausgesprochen gering und wurden von uns nach der makroskopisch sichtbaren Schwarzfärbung des intraoperativ gewonnenen Gewebes wesentlich höher eingeschätzt.

6.3. Erfassung des Partikelverlustes bei definierten Arbeitsvorgängen

Für die weiteren Versuche wurden industriell hergestellte Titanpartikel, zuvor mit Salzsäure und den entsprechenden Waschschrritten behandelt, eingesetzt. Dabei traten auffällige Mengenverluste an Partikeln auf.

Die feinen Titanpartikel agglomerieren leicht und haften besonders an Plastikoberflächen, wie z.B. an Pipettenspitzen oder Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Zur Bestimmung der Verluste, wurde die Titanmenge vor der Behandlung mit Salzsäure bzw. vor der Durchführung der fünf Waschschrritte und danach bestimmt (Tab. 3).

Titanpartikel ohne HCl - Behandlung

Masse	1. Wiegen [mg]	2. Wiegen [mg]	Verlust [mg]	Verlust [%]
1	10,00	7,50	2,50	25,00
2	10,00	7,60	2,40	24,00
3	10,00	8,70	1,30	13,00
4	10,00	7,70	2,30	23,00
5	10,00	8,20	1,80	18,00
Mittelwert [%]				20,60

Titanpartikel mit HCl - Behandlung

Masse	1. Wiegen [mg]	2. Wiegen [mg]	Verlust [mg]	Verlust [%]
1	1000,00	759,70	240,30	24,03
2	1000,00	671,80	328,20	32,82
3	1000,00	689,40	310,60	31,06
4	1000,00	771,00	229,00	22,90
5	1000,00	654,30	345,70	34,57
Mittelwert [%]				29,08

Tab. 2
Titanmenge gewonnen aus Gewebe von 5 Patienten - Mittelwert aus 3 Messungen je Probe (% Abweichung)

Nr.	Interface Pfanne [n=3]		Interface Stiel [n=3]	
	Titankonz. [µg/20ml]	Abweichung [%]	Titankonz. [µg/20ml]	Abweichung [%]
1	26,36	10,4	---	---
2	13,04	4,4	27,86	10,3
3	8,68	4,4	---	---
4	11,28	4,4	28,82	8,3
5	43,74	7,6	45,94	6,5

Tab. 3
Quantifizierung des Titanpartikelverlusts mit und ohne Salzsäure-Behandlung

Es ergab sich ein Materialverlust von ca. 20% bei der Durchführung der fünf Waschschriffe. Werden die Partikel zusätzlich vorher noch mit Salzsäure inkubiert, kommt es nach fünf Waschschriffen zu Materialverlusten von insgesamt 30%. Dabei ist der vermehrte Verlust wahrscheinlich nicht durch chemische Korrosion der Salzsäure (siehe auch DIN 17869), sondern durch zusätzliche Pipettierschriffe beim Umfüllen der Lösung aus den Schraubglasbehältern in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Plastik) bedingt.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Anteil von Titanabrieb im Gewebe realistisch noch ca. 30% höher liegt (vgl. Punkt 6.2.).

6.4. Biochemischer Einfluss von industriell gewonnenen Titanpartikeln mit und ohne Salzsäure-Behandlung auf Zellkulturen

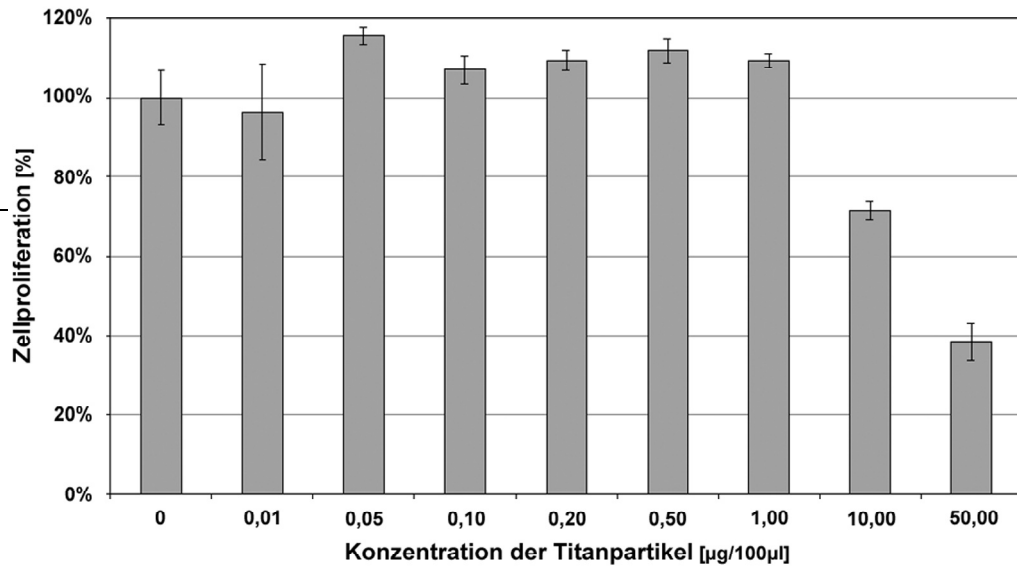
Da die Titanabriebpartikel aus dem Interfacegewebe durch Salzsäure-Behandlung isoliert werden sollten, war die Frage zu beantworten, ob sich unbehandelte Titanpartikel bzw. die mit Salzsäure behandelten Titanpartikel in ihrer Wirksamkeit auf Zellkulturen unterscheiden.

Die einzelnen Messergebnisse für die Werte in den Diagrammen (Abb. 16 - 27) können in den zugehörigen Tabellen im Anhang unter Punkt 10.1. nachgeschlagen werden.

6.4.1. Untersuchung der Zellproliferation von SaOS-2 Zellkulturen nach Zusatz von Titanpartikeln mittels MTT-Test

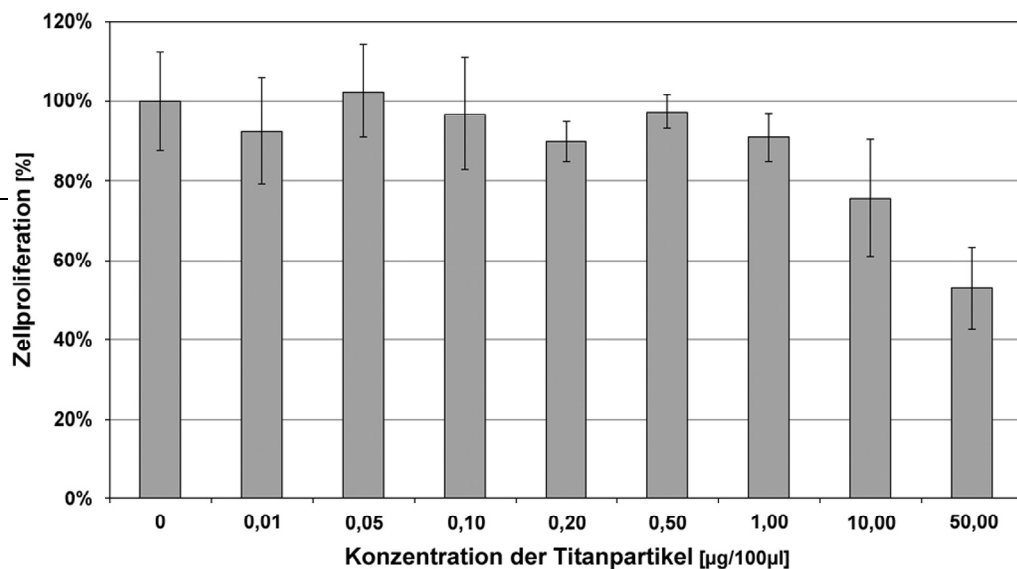
Es sollte der Einfluss von ansteigenden Titanpartikelkonzentrationen auf die Zellproliferation von SaOS-2 Zellen untersucht werden. Der MTT-Test wurde nach den Arbeitsvorschriften unter Punkt 5.3.3.3. durchgeführt. Die Inkubationszeiten lagen bei 72h und 96h. Die Versuche mit den verschiedenen Titanpartikelkonzentrationen wurden jeweils zweifach durchgeführt und die MTT-Werte je Versuch dreifach bestimmt. Beim MTT-Test wurde zusätzlich ein Versuch ohne Zusatz von Metallpartikeln durchgeführt (= Negativkontrolle). Bei der Auswertung des MTT-Tests wurden die Mittelwerte der Dreifachbestimmung je Partikelkonzentration in Bezug zum Mittelwert der Negativkontrolle (= 100%) in den Abb. 16-19 dargestellt.

Abb. 16
Zellproliferation in
Abhängigkeit von
der Konzentration
der Titanpartikel
(n = 3),
SaOS-2 Zellen,
MTT-Test nach 72h
mit Salzsäure be-
handelten Titan-
partikeln



Wie in Abb. 16 dargestellt, waren nach 72h Inkubation bei Partikelkonzentrationen zwischen 0,01µg/100µl und 1,0µg/100µl keine signifikanten Effekte auf die SaOS-2 Zellen zu beobachten. Die geringen Unterschiede bei diesen niedrigen Titanpartikelkonzentrationen sind nicht signifikant. Erst ab einer Konzentration von 10µg/100µl zeigt sich ein deutlicher Effekt der Titanpartikel auf die Proliferation (71%) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (100%). Bei der höchsten Konzentration von 50µg/100µl lag das Wachstum dann nur noch bei 38%. Damit wurde nachgewiesen, dass in unseren Modellversuchen Titanpartikelkonzentrationen > 1,0µg/100µl eine zunehmende Wachstumshemmung bei SaOS-2 Zellen hervorrufen. Im Vergleich des Einflusses von Titanpartikeln mit und ohne Salzsäure-Behandlung (Abb. 16 und 17) auf SaOS-2 Zellen zeigten sich nur diskrete Unterschiede. Die unbehandelten Titanpartikel beeinflussten die Zellproliferation etwas geringer, z.B. nach 72h Inkubationszeit 53% Zellproliferation im Vergleich zu 38% Zellproliferation bei Verwendung von Titanpartikel mit Salzsäure-Behandlung.

Abb. 17
Zellproliferation in
Abhängigkeit von
der Konzentration
der Titanpartikel
(n = 3),
SaOS-2 Zellen,
MTT-Test nach 72h
mit Titanpartikeln
ohne Salzsäure-
Behandlung



In Abb. 18 wird die Zellproliferationsrate beim MTT-Test nach 96h unter Zugabe von mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln dargestellt. Es kann wiederum ab 10 μ g Titanpartikeln/100 μ l eine deutliche Abnahme des Wachstums der SaOS-2 Zellen nachgewiesen werden. Bei einer Titanpartikelkonzentration von 10 μ g/100 μ l kommt es zu einer Abnahme der Proliferationsrate auf 64%, bei 50 μ g/100 μ l lag die Wachstumsrate nur bei 25% im Vergleich zu nicht behandelten SaOS-2 Zellen.

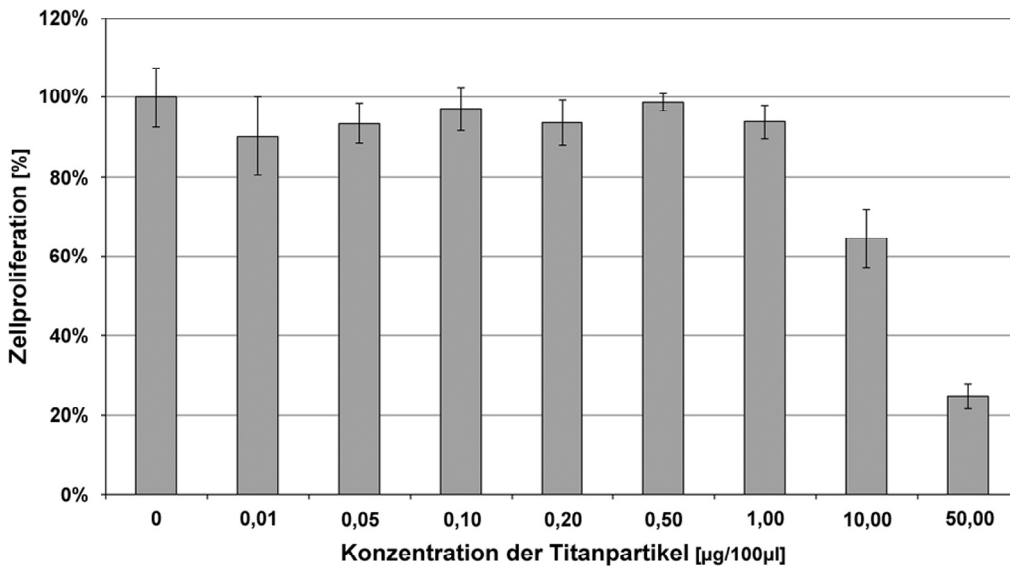


Abb. 18
Zellproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel ($n = 3$),
SaOS-2 Zellen, MTT-Test nach 96h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln

Bei der Messung der Zellproliferation mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung (Abb. 19) wurde bei 10 μ g Titanpartikeln/100 μ l eine Abnahme auf 67% gemessen. Bei der erhöhten Titanpartikelkonzentration von 50 μ g/100 μ l nahm das Wachstum weiter ab (51%), d.h. die mit Salzsäure behandelten Partikel bewirkten insbesondere nach 96h eine etwas stärkere Wachstumshemmung.

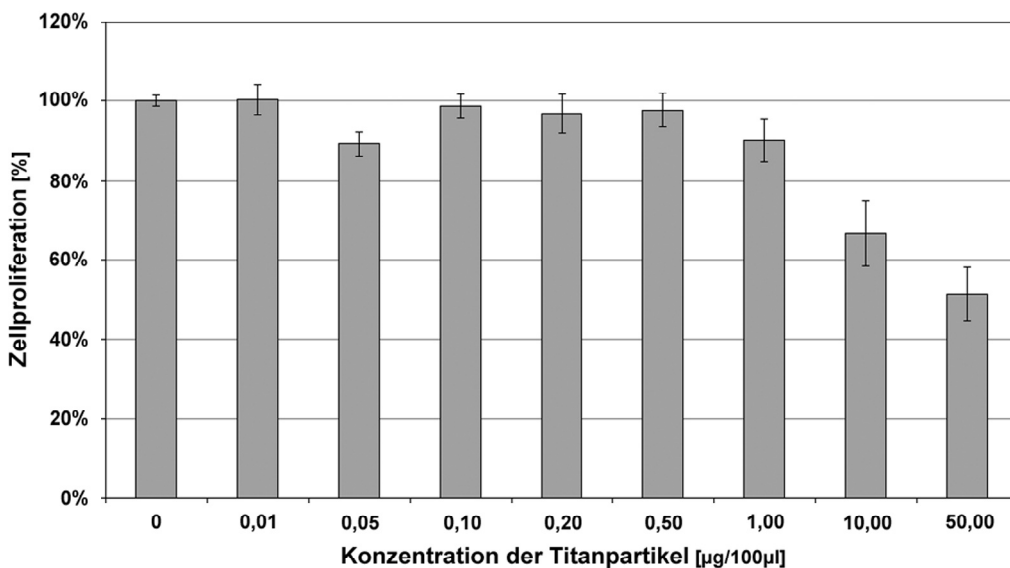


Abb. 19
Zellproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel ($n = 3$),
SaOS-2 Zellen, MTT-Test nach 96h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung

Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit von 72h auf 96h zeigte sich beim MTT-Test eine stärkere Wachstumshemmung durch die Titanpartikel, d.h. der Test wird nach 96h noch empfindlicher. Es ließ sich damit nur ein geringer Unterschied beim Einsatz von Partikeln mit und ohne Salzsäure-Behandlung feststellen. Daraus schlussfolgern wir, dass die Salzsäure bei den Waschschritten weitgehend komplett entfernt wurde und keine für die Zellkultur signifikanten Veränderungen an den Titanpartikeln bewirkt.

6.4.2. Untersuchung der Zytotoxizität von Titanpartikeln an SaOS-2 Zellen mittels LDH-Test

Durch Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an Titanpartikeln zu SaOS-2 Zellen, sollte deren Einfluss auf die Zytotoxizität mittels LDH-Freisetzung gemessen werden. Der LDH-Test wurde nach den Arbeitsvorschriften unter Punkt 5.3.3.4. durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 72h und 96h. Die einzelnen Werte für die verschiedenen Titanpartikelkonzentrationen wurden dabei in Dreifachbestimmung ermittelt. Beim LDH-Test bestimmt man zusätzlich eine Negativkontrolle (NK) und eine Positivkontrolle (PK). Die Positivkontrolle ist dabei gleich der maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen. In der Negativkontrolle misst man die Freisetzung von LDH aus den intakten unbehandelten Zellen.

Zur Auswertung des Tests errechnet man nun die Mittelwerte der Messungen aus den Dreifachbestimmungen der einzelnen Partikelkonzentrationen, sowie die der Negativ- und Positivkontrolle.

Die Zytotoxizität berechnet sich wie folgt:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Mittelwert je Ti - Partikelkonz.} - \text{NK}}{\text{PK} - \text{NK}} \times 100$$

In den folgenden vier Abbildungen (Abb. 20-23) sind die Ergebnisse der Messungen der Zytotoxizität (= LDH-Freisetzung) in Abhängigkeit von der Konzentration an Titanpartikeln mit und ohne Salzsäure-Behandlung im Bereich von 0,01µg/100µl bis 50µg/100µl dargestellt. Es wird deutlich, dass nach einer Inkubationszeit von 72h (Abb. 20 und 21) erst ab 10µg/100µl eine signifikante Zahl von Zellen geschädigt wurde (ca. 30%). Mit steigender Konzentration an Titanpartikeln auf 50µg/100µl kam es sogar zu einer Zytotoxizität von bis zu 60%.

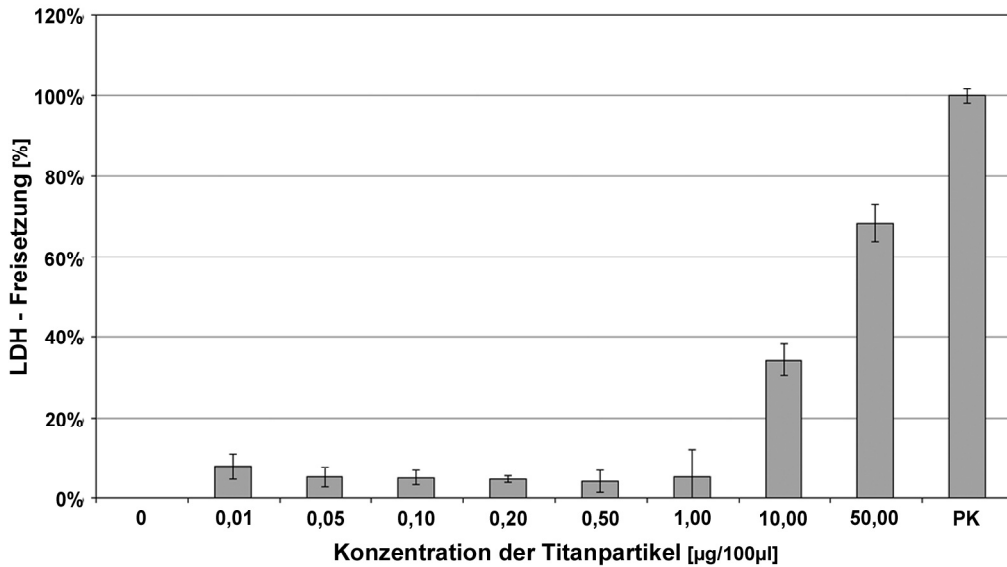


Abb. 20
Zytotoxizität in
Abhängigkeit von
der Konzentration
der Titanpartikel
(n = 3),
SaOS-2 Zellen,
LDH-Test nach 72h
mit Salzsäure
behandelten Titan-
partikeln

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit und ohne Salzsäure behandelten Partikeln zeigten geringfügig höhere Zellschädigungen bei Einsatz der mit Salzsäure behandelten Titanpartikel.

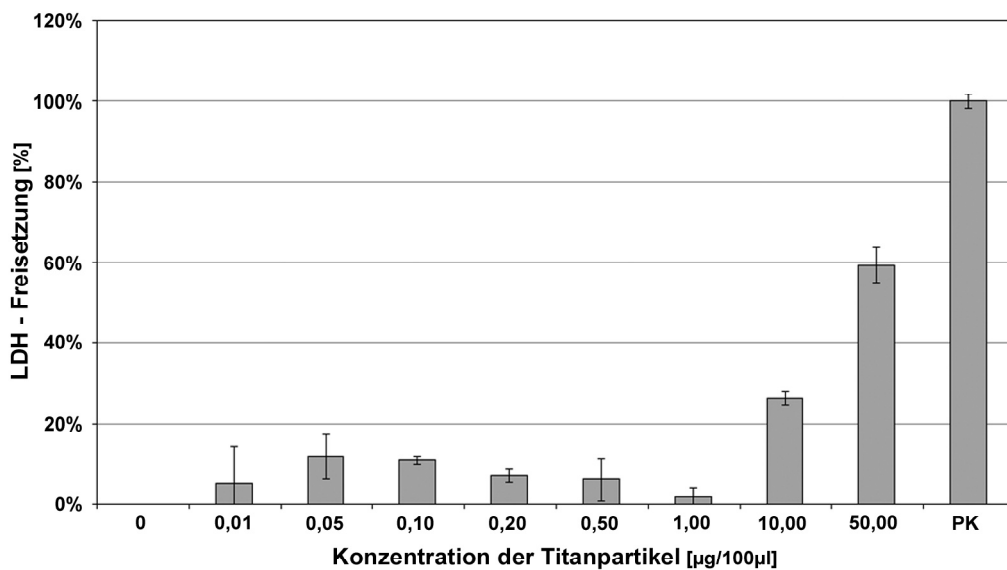


Abb. 21
Zytotoxizität in
Abhängigkeit von
der Konzentration
der Titanpartikel
(n = 3),
SaOS-2 Zellen,
LDH-Test nach 72h
mit Titanpartikeln
ohne Salzsäure-
Behandlung

Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 96h (Abb. 22 und 23) sollte zu einem weiteren verstärkten Absterben von SaOS-2 Zellen führen. Diese Annahme wurde mit den durchgeführten Versuchen bestätigt. Dabei bildete ein Ergebnis eine Ausnahme: die geringfügig höhere Zytotoxizität von mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln mit einer Konzentration von $50\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ bei einer Inkubationszeit von 72h (68%) im Vergleich zu 96h (65%).

Abb. 22
Zytotoxizität in
Abhängigkeit von
der Konzentration
der Titanpartikel
(n = 3),
SaOS-2 Zellen,
LDH-Test nach 96h
mit Salzsäure
behandelten Titan-
partikeln

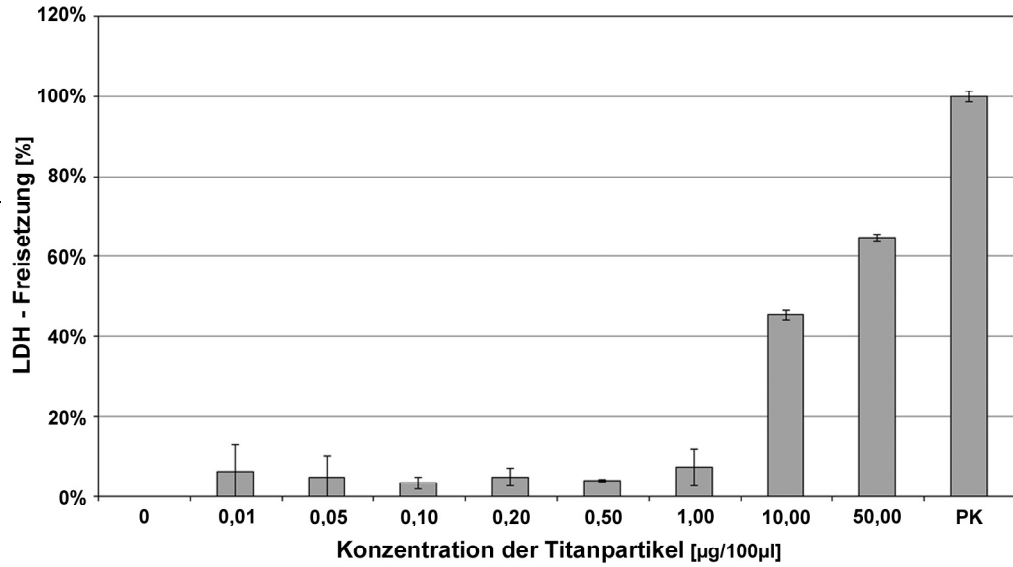
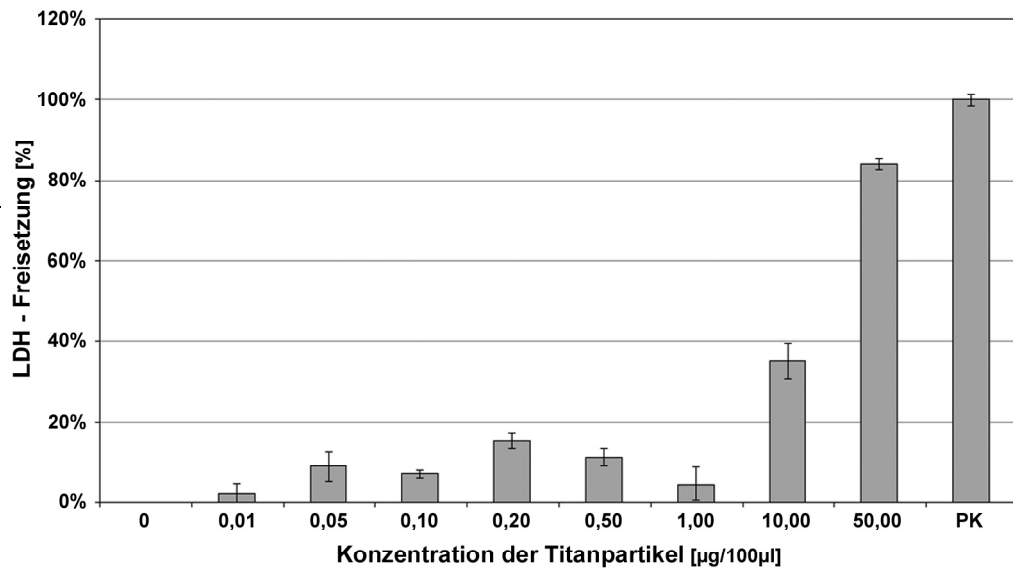


Abb. 23
Zytotoxizität in
Abhängigkeit von
der Konzentration
der Titanpartikel
(n = 3),
SaOS-2 Zellen,
LDH-Test nach 96h
mit Titanpartikeln
ohne Salzsäure-
Behandlung



6.4.3. Bestimmung der Überlebensrate von SaOS-2 Zellen nach Behandlung mit Titanpartikeln mittels Trypanblau-Test

Dieser Test wurde entsprechend den Versuchsanordnungen unter Punkt 5.3.3.5. durchgeführt. Dabei wurde die Zellzahl bei den einzelnen Titanpartikelkonzentrationen jeweils zweifach bestimmt und der Test jeweils zweimal durchgeführt.

Nach der Zellzählung unter dem Durchlichtmikroskop mit der Neubauer-Zählkammer lässt sich die Zellzahl pro ml wie folgt berechnen:

$$\text{Zellzahl /ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 10000$$

Die Gesamtzellzahl pro Titanpartikelkonzentration ergibt sich aus der Anzahl der lebenden und toten Zellen und beträgt immer 100%. Von dieser Gesamtzahl errechnet man den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen, der ein Maß für die Toxizität der im Versuch anwesenden Titanpartikel darstellt. Die Negativkontrolle spiegelt die Überlebensrate von Zellen wieder, die nicht mit Titanpartikeln inkubiert wurden.

Aus den Abb. 24-27 ist ersichtlich, dass die Überlebensrate der SaOS-2 Zellen ohne Titanpartikelzusatz nach 72h bei 84% und nach 96h bei 80% lag. Dies ist sicherlich auf die hohe Zellzahl/Well und den zunehmenden Verbrauch des Nährmediums zurückzuführen. Nach einer Inkubationszeit von 72h fiel die Überlebensrate bei der höchsten Titanpartikelkonzentration von 500µg/ml auf 65% mit Salzsäure- bzw. 61% ohne Salzsäurebehandlung (siehe Abb. 24 und 25).

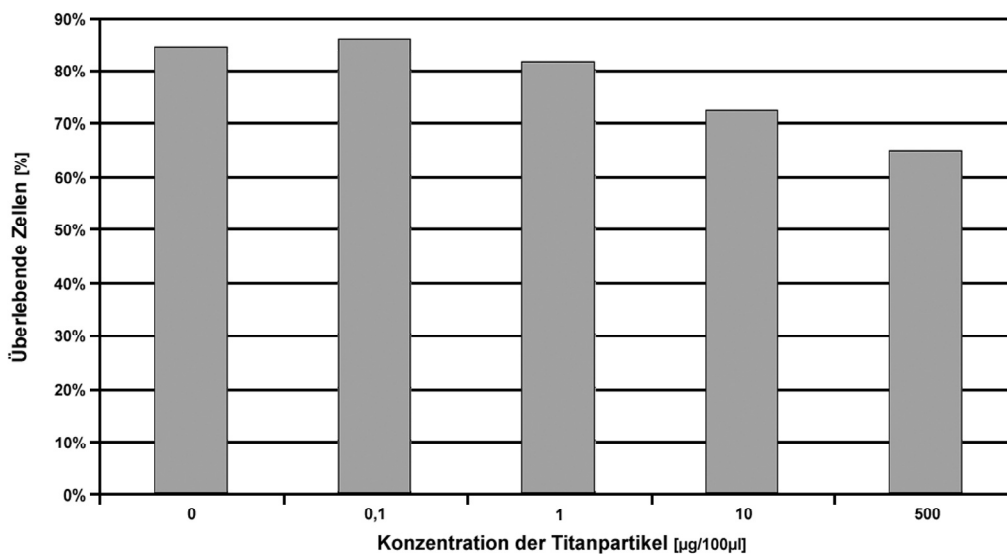
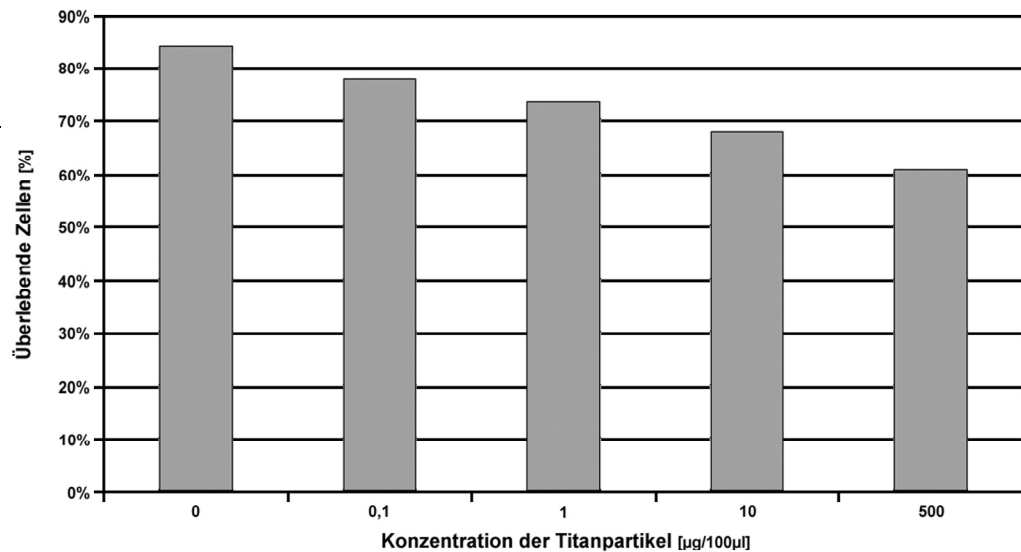


Abb. 24
Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 72h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln

Bereits bei Anwesenheit von 10µg Titanpartikeln/ml SaOS-2 Zellkultur ist ein toxischer Effekt zu erkennen. Dabei beträgt die Überlebensrate nach 72h 72% mit HCl und

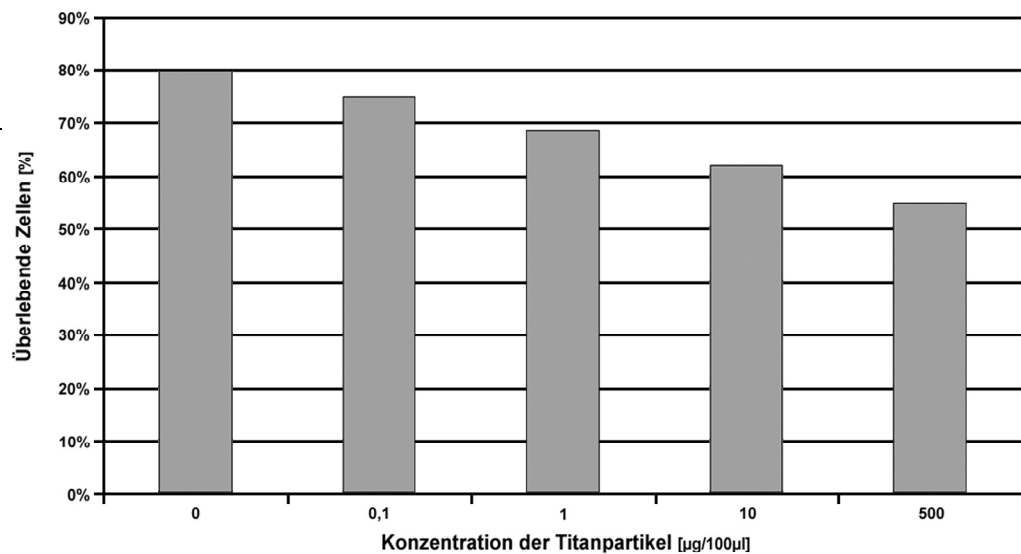
67% ohne HCl. Somit konnten keine relevanten Unterschiede beim Einsatz von Partikeln mit und ohne HCl-Behandlung festgestellt werden.

Abb. 25
Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 72h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung



Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 96h (Abb. 26 und 27) war der schädigende Einfluss von Titanpartikeln auf die SaOS-2 Zellen noch deutlicher messbar. Mit steigenden Konzentrationen von Titanpartikeln erfolgte eine stetige Abnahme der Zahl lebender SaOS-2 Zellen von 74% Überlebensrate bei 0,1µg/ml und 61% bei 10µg/ml bis zu ca. 53% bei 500µg/ml. Der einfache Zelltod bestätigte mit hoher Empfindlichkeit die Ergebnisse der biochemischen Tests. Die Versuche mit und ohne Salzsäure-Behandlung von Titanpartikeln zeigten vergleichbare Resultate.

Abb. 26
Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 96h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln



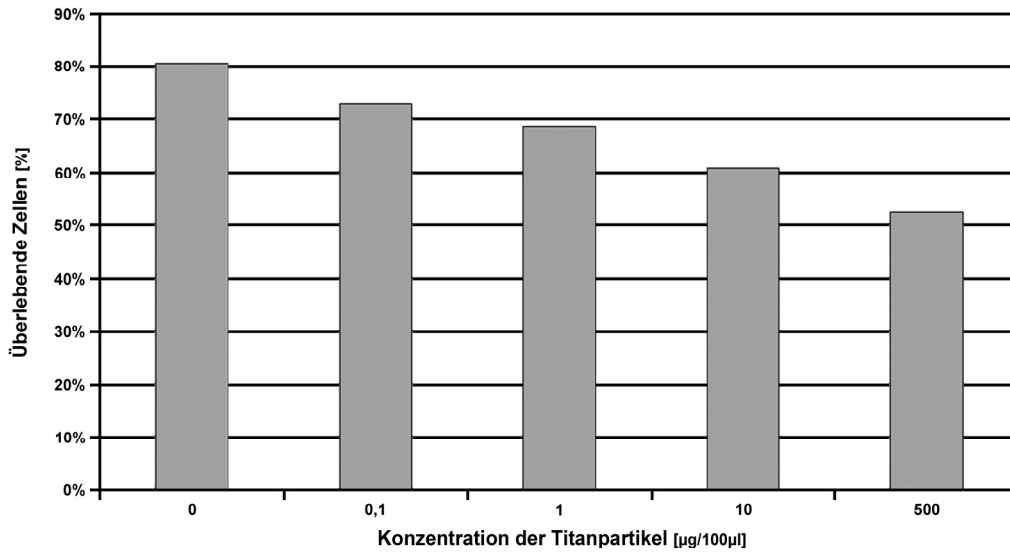


Abb. 27
Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 96h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung

7. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Titanpartikeln auf ihre zellschädigende Wirkung am Modell von SaOS-2 Zellen näher untersucht. Wenn, wie nachgewiesen, Funktionen von Osteoblasten, wie Lebensfähigkeit, Proliferation und Differenzierung, durch Abriebpartikel unterdrückt bzw. Entzündungsreaktionen in Gang gesetzt werden, kann dies zu einer verminderten Knochenbildung und damit zu einer Lockerung der Endoprothese führen.

7.1. Diskussion zur eingesetzten SaOS-2 Zelllinie

Die Osteoblasten ähnliche Zelllinie SaOS-2 wurde einer primären Osteoblastenkultur aus verschiedenen Gründen vorgezogen. Die Zelllinie wurde bisher ausreichend charakterisiert und ist dafür bekannt, phänotypische Eigenschaften von Osteoblasten zu zeigen ([34] S. 231, [41] S. 4961). Außerdem wurde sie auch schon in anderen Studien ([12] S. 825, [50] S. 923) als gutes Modell zum Studium von Osteoblastenfunktionen eingestuft. Da unsere Experimente über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt wurden, war eine solche stets homogene Population von Osteoblasten erforderlich. Dies kann bisher ausschliesslich mit immortalisierten Zelllinien erreicht werden.

Primärzellen behalten ihren Phänotyp nur für eine relativ kurze Zeit bei, so dass über einen längeren Zeitraum keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden.

7.2. Zur Entwicklung der Gewebeauflösungsmethode mit Salzsäure

Da aus Patientengewebe gewonnene Titanabriebpartikel auf Zellkulturen getestet werden sollten, benötigten wir zunächst eine geeignete Isolationsmethode für die Partikel. Nach einer Literaturrecherche führten wir eine Reihe von Versuchen zur Isolierung des Abriebmaterials von intraoperativ bei Hüftendoprothesenrevisionen gewonnenem Interfacegewebe durch, die jedoch für uns zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führten. Nach der Auflösung von Gewebe durch verschiedene proteolytisch wirkende Enzyme waren noch reichlich Gewebereste auf den REM-Aufnahmen (siehe Abb. 12) zu erkennen. Auch der Einsatz von diversen Säuren und Basen erbrachte nicht den in der Literatur beschriebenen Erfolg, da die Angaben zur Durchführung teilweise sehr ungenau waren. Somit gelang uns nach vielen Vorversuchen durch Inkubation von Patientengewebe mit Salzsäure für 2h bei 200°C die Entwicklung einer neuen Methode zur vollständigen Gewebeauflösung. Nur bei dieser Methode waren im REM keine Gewebereste mehr nachweisbar (siehe Abb. 14). Desweiteren verwendeten einige Autoren

Salpetersäure, die jedoch laut DIN 17689 eine starke korrosive Wirkung auf Titan hat, weshalb wir von dieser Methode Abstand nahmen.

7.3. Zur Auswahl von Titanpartikeln für die Untersuchungen mit Zellkulturen

Es war wünschenswert, Partikelabrieb aus Patientengewebe zu isolieren und in Zellkulturen zu testen. Da uns aber nur begrenzte Gewebemengen der fünf Probanden zur Verfügung standen und die Partikelkonzentrationen extrem niedrig waren (Punkt 6.2.2.), arbeiteten wir im Weiteren mit industriell hergestellten Titanpartikeln. Wir konnten die relativ geringen Titanpartikelkonzentrationen von 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 10,0, und 50,0µg/100µl einsetzen, da wir Testplatten mit kleineren Wachstumsflächen pro Well (0,32cm²) wählten. In anderen Arbeiten kamen zum Teil wesentlich höhere Partikelkonzentrationen ([21] S. 164, [37] S. 400) zum Einsatz, aufgrund deutlich größerer Wachstumsflächen pro Well (10-fach bis 20-fach).

Die von uns herangezogenen industriell hergestellten Titanpartikel waren mit mittleren Durchmessern von $d_{10} = 6,11\mu\text{m}$ und $d_{50} = 18,66\mu\text{m}$ sehr fein, dennoch etwas größer als die gefundenen Partikel aus Patientengewebe (Punkt 6.2.1.).

Einige Autoren zeigten bereits mit vergleichbaren Partikeln, dass eine Phagozytose erfolgte ([21] S. 169). Deshalb sollten die von uns verwendeten Modellpartikel eine den *in vivo* Bedingungen entsprechende Reaktion in den Zellkulturen hervorrufen.

Die Titanpartikel wurden von uns, entweder nach fünf Waschsritten oder nach Inkubation mit Salzsäure und den gleichen Waschsritten, im Rahmen der Zellkulturtests eingesetzt (Punkt 5.3.3.2.). Diese Aufarbeitung erfolgte, wie ursprünglich vorgesehen war, auch um aus Patientengewebe mit Salzsäure extrahierte Abriebpartikel zu gewinnen, zu waschen und an Zellkulturen neben industriell hergestellten Partikeln zu testen.

7.4. Beurteilung der Ergebnisse der Zellkulturtests

In den Zellkulturtests konnte nur ein geringer oder teilweise auch kein Einfluss der Salzsäure-Behandlung von Titanpartikeln auf die Zellen gemessen werden. Damit lässt sich feststellen, dass die Gewinnung von Partikeln aus Patientengewebe mit der Salzsäure-Auflösungsmethode (Punkt 5.2.3.) geeignet wäre, um Partikelabrieb von Endoprothesen in unseren Testsystemen zu untersuchen.

Die Titanpartikel zeigten eine deutliche Zytotoxizität (LDH-Test) bei den Konzentrationen von 10µg/100µl und 50µg/100µl Medium nach Inkubationszeiten von 72h und 96h. Auch die Untersuchung der Zellproliferation mittels MTT-Test zeigte nach 72h einen deutlichen Effekt der Titanpartikel auf die Zellen ab einer Konzentration von 10µg/100µl und erreicht bei 50µg/100µl Minimalwerte von 40% bis 50%. Nach

einer Inkubationszeit von 96h konnten diese Effekte noch verstärkt beobachtet werden. Aus den Testergebnissen kann man ablesen, dass, wie erwartet, eine deutliche konzentrationsabhängige Aktivitätsänderung und Modulierung biochemischer Vorgänge in den Osteoblastenzellkulturen erreicht wurde. Dabei lag die Grenze für die Versuche mittels MTT-Test und LDH-Test bei 10 μ g Titanpartikeln pro 100 μ l Zellkulturmedium. Bei den Konzentrationen zwischen 10ng und 500ng konnten keine signifikanten Effekte festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten sind auf Schwierigkeiten beim Pipettieren bzw. Herstellen der Verdünnungsreihe zurückzuführen, da die Partikel leicht agglomerieren.

Die mikroskopische Bestimmung der Überlebensrate von SaOS-2 Zellen mit Hilfe des Trypanblau-Test zeigte nach 72h, dass unbehandelt ca. 80% bis 85% der Zellen überleben und eine Abnahme der Überlebensrate bereits ab einer Titanpartikelkonzentration von 1 μ g/ml beginnt. Unter unseren Testbedingungen zeigte sich eine deutlichere Abnahme der Zahl überlebender Zellen bei 10 μ g/ml und 500 μ g/ml. Einen noch stärkeren toxischen Einfluss der Titanpartikel bereits ab 0,1 μ g/ml zeigte der Trypanblau-Test nach einer Inkubationszeit von 96h, wobei der toxische Effekt der Titanpartikel mit steigender Konzentration stetig zunimmt.

Unsere Ergebnisse mittels biochemischer Tests und mikroskopischer Bestimmung der abgestorbenen Zellen verdeutlichen direkte Effekte der Titanpartikel auf die SaOS-2 Zellen und korrelieren mit vorhergehenden Studien, in denen beobachtet wurde, dass extrem geringe Konzentrationen von Titanpartikeln keinen Einfluss auf die Osteoblastenvitalität haben ([49] S. 201, [51] S. 216, [53] S. 107). Erst ab bestimmten Partikelkonzentrationen lassen sich Wirkungen in Zellkulturen nachweisen.

Offensichtlich können wirksame Mengen von Partikeln erst bei höheren Partikelkonzentrationen von den Osteoblasten phagozytiert werden. Offen bleibt auch die Frage, ob eine Abhängigkeit zwischen Toxizität der Partikel und Form bzw. Grösse besteht. Dazu wäre eine vergleichende Versuchsreihe notwendig. Vielleicht wirken auch die in vivo gefundenen sehr kleinen Partikel weniger toxisch auf Osteoblasten als die etwas grösseren industriell hergestellten Partikel.

7.5. Auswertung der Partikelanalyse mittels REM und AAS

Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen konnten Titanpartikel, die aus Patientengewebe extrahiert wurden, sichtbar gemacht werden. Die Partikel waren extrem fein und zeigten einen mittleren Durchmesser von 1 μ m. Bei Einsatz von 10%iger Salzsäure konnten die Partikel gewebefrei gewonnen werden, weshalb diese Methode zu empfehlen ist.

Die durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmten Titanpartikelkonzentrationen in den 5 Gewebeprobe­nen waren sehr gering. Wie unter Punkt 6.2.2. berechnet, benötigte man deutlich größere Mengen Interfacegewebe, um ausreichend Abriebpartikel für die etablierten Zellkulturtests zu gewinnen. Trotz einer deutlichen Schwarzfärbung des Gewebes waren nur ca. 0,001% Titanpartikel im Gewebe nachweisbar. Eventuell könnte der aufgetretene Materialverlust auch auf eine stattgefunde­ne Korrosion zwischen Salzsäure und Partikeln zurückzuführen sein. Beachtet man jedoch die Ergebnisse nach DIN 17689 sowie die extreme Agglomerations- und Anhaftungs­bereitschaft von Titanpartikeln, so erscheint diese Vermutung eher unwahrscheinlich.

In zukünftigen Versuchsreihen sollten eventuell neue Oberflächenmaterialien entwickelt werden, die diese Anhaftung herabsetzen, und somit zu weniger Partikelverlust führen. Deutliche Unterschiede in der Verwendung von Glas und Plastik haben auch schon andere Autoren beschrieben. Als Lösung des Problems der Agglomeration zwischen den Partikeln wurde in der Literatur meist eine Ultraschallbehandlung der Partikellösung vor der Verarbeitung angegeben. Nach unseren Erfahrungen färbte sich jedoch die komplette Lösung anschliessend schwarz, was wir auf eine stark chemische Reaktion zurückführten und deshalb diese Methode ablehnten.

Die ermittelten Schwellenkonzentrationen für den Einfluss von Titanpartikeln auf Zellkulturen lagen in unseren Versuchen bei 10µg/100µl (MTT- und LDH-Test) bzw. 10µg/ml (Trypanblau-Test). Deshalb konnte bei unseren Zellkulturtests nur mit industriell hergestellten Titanpartikeln gearbeitet werden. Erst mit der Auflösung von größeren Mengen Gewebe oder mit biochemischen Tests, bei denen Zellwirkungen schon bei deutlich niedrigeren Partikelkonzentrationen im Nanogramm-Bereich auftreten, könnten diese Versuche realistisch sein. Vielleicht liesse sich auch ein geeigneter Prüfstand entwickeln, der entsprechende *in vivo* ähnliche Partikel in grösseren Mengen produziert, so dass genügend Material für die Testung des biochemischen Einflusses von Titanpartikeln auf Osteoblasten-Zellkulturen zur Verfügung stände.

Unsere Ergebnisse belegen weiterhin, dass die Partikelkonzentrationen in den Interfacegewebeprobe­nen des proximalen Anteils der femoralen Komponente deutlich höher waren als im Interfacegewebe des Acetabulums, was auch von Hirakawa et al. ([13] S. 1240) festgestellt wurde. Die Konzentrationen bei den einzelnen Patienten waren jedoch zum Teil stark unterschiedlich.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Titanpartikeln auf Zellkulturen von Osteoblasten ähnlichen SaOS-2 Zellen zu studieren. Dabei sollten sowohl aus Patientengewebe isolierte Abriebpartikel als auch industriell hergestellte Modell-Titanpartikel getestet werden.

Auswertungsparameter für Zellveränderungen waren biochemische Methoden: für die Zellproliferation der MTT-Test, für die Zytotoxizität der LDH-Test und die mikroskopische Auszählung abgestorbener Zellen mittels Trypanblau-Test.

Mit den industriell hergestellten Partikeln konnten deutliche konzentrationsabhängige Effekte auf SaOS-2 Zellen in allen Tests gemessen werden. Die Beeinträchtigung des Wachstums und der Zellfunktionen von Osteoblasten durch Titanpartikel konnte damit sicher nachgewiesen werden.

Es wurde nachgewiesen, dass eine Behandlung der Titanpartikel mit Salzsäure, wie sie bei der Extraktion der Partikel aus dem Patientengewebe erforderlich war, nach Auswaschen der Salzsäure zu keinen oder nur geringen Veränderungen des Einflusses der Titanpartikel auf Zellkulturen führt. Das bedeutet, solchermaßen aus Interfacegewebe gewonnene Partikel könnten in Zukunft an unseren Zellkulturen getestet werden.

Die Untersuchungen zur Gewinnung von Abriebpartikeln aus Gewebe von 5 Probanden führten durch Einastz von Salzsäure zur Neuentwicklung einer geeigneten Isolationsmethode für Titanabriebpartikel.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die aus Patientengewebe extrahierten feinen Titanpartikel mit Durchmesser von ca. $1\mu\text{m}$. Die quantitative Bestimmung mittels Atomabsorptionsspektroskopie ergab, dass in den schwarz gefärbten Gewebestücken nur maximal 0,001% Titanpartikel nachweisbar waren. Aufgrund des begrenzt zur Verfügung gestandenen intraoperativ gewonnenen Interfacematerials pro Patient konnten nur Spuren von Titanabriebpartikeln gewonnen werden. Die Mengen reichten nicht aus, um die Partikel direkt auf Zellkulturen zu testen. Da in den durchgeführten Versuchen wirksame Konzentrationen von Titanpartikeln im Bereich von $10\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (LDH- und MTT-Test) bzw. $0,1\text{-}1\mu\text{g}/\text{ml}$ (Trypanblau-Test) erforderlich waren, führten wir die genannten Zellkulturtests nur mit industriell hergestellten Titanpartikeln durch ($d_{10} = 6,11\mu\text{m}$, $d_{50} = 18,66\mu\text{m}$).

Weitergehende Versuche mit Titanpartikeln, gewonnen aus Interfacegewebe, sind nur möglich, wenn empfindlichere biochemische Tests eingesetzt oder das Gewebe mehrerer Patienten gepoolt würde.

Solche Tests könnten bei der Entwicklung von neuen Endoprothesenmaterialien eingesetzt werden, um in der Zukunft noch erfolgreicher haltbare Endoprothesen herzustellen.

9. VERZEICHNISSE

9.1. Literaturverzeichnis

- [1] **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 46 (1999) 121-131
- [2] **Allen, M.J., Myer, B.J., Millett, P.J., Rushton, N.**
The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro
J Bone Joint Surg 79-B (1997) 475-482
- [3] **Al-Saffar, N.**
The osteogenetic properties of the interface membrane at the site of orthopedic implants: The impact of underlying joint disease
J Long Term Effects Med Implants 9 (1999) 23-45
- [4] **Amstutz, H.C., Campbell, P., Kossovsky, N., Clark, I.C.**
Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis
Clin Orthop 276 (1992) 7-18
- [5] **Aspenberg, P., Van derVis, H.**
Migration, Particles, and fluid pressure
Clin. Orthop. 352 (1998) 75-80
- [6] **Blumenthal, N.C., Cosma, V., Jaffe, W., Stuchin, S.**
A new technique for quantitation of metal particulates and metal reaction products in tissues near implants
J Applied Biomaterials 5 (1994) 191-193
- [7] **Brien, N.W., Salvati, E.A., Betts, E., Bullough, P.G., Wright, T., Rimmac, C., Bully, R., Garvin, K.**
Metal levels in cemented total hip arthroplasty. A comparison of well-fixed and loose implants
Clin Orthop 276 (1992) 66-74

- [8] **Dean, D.D., Schwartz, Z., Blanchard, C.R., Liu, Y., Agrawal, C.M., Lohmann, C.H., Sylvia, V.L., Boyan, B.D.**

Ultrahigh molecular weight polyethylene particles have direct effects on proliferation, differentiation, and local factor production of MG63 osteoblast-like cells

J Orthop Res. 17 (1999) 9-17

- [9] **Dean, D.D., Schwartz, Z., Liu, Y., Blanchard, C.R., Agrawal, C.M., Mabrey, J.D., Sylvia, V.L., Lohmann, C.H., Boyan, B.D.**

The effect of ultra-high molecular weight polyethylene wear debris on MG-63 osteosarcoma cells in vitro

J Bone Joint Surg 81-A (1999) 452-461

- [10] **Goldring, S.R., Jasty, M., Roelke, M.S., Rourke, C.M., Bringham, F.R., Harris, W.H.**

Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface

Arthritis Rheum 29 (1986) 836-842

- [11] **Goodman, S.B., Lind, M., Song Y., Smith, R.L.**

In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris

Clin Orthop 352 (1998) 25-34

- [12] **Haynes, D.R., Rogers, S.D., Hay, S., Percy, M.J., Howie, D.W.**

The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles

J Bone Joint Surg 75-A (1993) 825-834

- [13] **Hirakawa, K., Bauer, T.W., Stulberg, B.N., Wilde, A.H., Secic, M.**

Characterization and comparison of wear debris from failed total hip implants of different types

J Bone Joint Surg 78-A (1996) 1235-1243

- [14] **Horowitz, S.M., Gonzales, J.B.**

Inflammatory response to implant particulates in a macrophage/ osteoblast coculture model

Calcif Tissue Int 59 (1996) 392-396

- [15] Howie, D.W.**
 Tissue response in relation to type of wear particles around failed hip arthroplasties
 J Arthroplasty 5 (1990) 337-348
- [16] Jacobs, J.J., Skipor, A.K., Black, J., Urban, R.M., Galante, J.O.**
 Release and excretion of metal in patients who have a total hip-replacement
 component made of titanium-base alloy
 J Bone Joint Surg 73-A (1991) 1475-1486
- [17] Kadoya, Y., Revell, P.A., Al-Saffar, N., Kobayashi, A., Scott, G., Freeman, M.A.R.**
 Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties:
 histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical
 technique
 J Orthop Res 14 (1996) 473-482
- [18] Klein, D.C., Raisz, L.G.**
 Prostaglandins: Stimulation of bone resorption in tissue culture.
 Endocrinology 86 (1970) 1436-1440
- [19] Koh, J.Y., Choi, D.W.**
 Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in
 cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay
 J Neuroscience Meth 20 (1987) 83-90
- [20] Kohilas, K., Lyons, M., Lofthouse, R., Frondoza, G., Jinnah, R.,
 Hungerford, D.S.**
 Effect of prosthetic titanium wear debris on mitogen-induced monocyte and
 lymphoid activation
 J Biomed Mater Res 47 (1999) 95-103
- [21] Kwon, S.Y., Lin, T., Takei, H., Ma, Q., Wood, D.J., O'Connor, D.,
 Sung K.-L.-P.**
 Alterations in the adhesion behavior of osteoblasts by titanium particle loading:
 inhibition of cell function and gene expression
 Biorheology 38 (2001) 161-183

- [22] **Lee, J.-M., Salvati, E.A., Betts, E., DiCarlo, E.E., Doty, S.B., Bullough, P.G.**
Size of metallic and polyethylene debris particles in failed cemented total hip replacements
J Bone Joint Surg 74-B (1992) 380-384
- [23] **Lohmann, C.H., Schwartz, Z., Köster, G., Jahn, U., Buchhorn, G.H., MacDougall, M.J., Casasola, D., Liu, Y., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Boyan, B.D.**
Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition
J Biomater 21 (2000) 551-561
- [24] **Lombardi, A.V., Mallory, T.H., Vaughan, B.K., Drouillard, P.**
Aseptic loosening in total hip arthroplasty secondary to osteolysis induced by wear debris from titanium-alloy modular femoral heads
J Bone Joint Surg 71-A (1989) 1337-1342
- [25] **Maloney, W.J., James, R.E., Smith, R.L.**
Human macrophage response to retrieved titanium alloy particles in vitro
Clin Orthop 322 (1996) 268-278
- [26] **Maloney, W.J., Smith, R.L., Schmalzried, T.P., Chiba, J., Huene, D., Rubash, H.**
Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement
J Bone Joint Surg 77-A (1995) 1301-1310
- [27] **Manlapaz, M., Maloney, W.J., Smith, R.L.**
In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris
J Orthop Res 14 (1996) 465-471
- [28] **Margevicius, K.J., Bauer, T.W., McMahon, J.T., Brown, S.A., Merritt, K.**
Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses
J Bone Joint Surg 76-A (1994) 1664-1675
- [29] **Merklein, E., Hendrich, C., Nöth, U., Kochinski, G., Rader, C.P., Schütze, N., Thull, R., Eulert, J.**
Standardisiertes Testen von Skelett-Implantatoberflächen mit einem Osteoblasten-Zellkultursystem. I. Orthopädische Standardmaterialien
Biomed Technik 43 (1998) 354-359

- [30] Milosev, L., Antolic, V., Minovic, A., Cör, A., Herman, S., Pavlovic, V., Campbell, P.**
 Extensive metallosis and necrosis in failed prostheses with cemented titanium-alloy stems and ceramic heads
 J Bone Joint Surg 82-B (2000) 352-357
- [31] Morgan, S.J., Darling D.C.**
 Die Kultur permanenter Zelllinien. In: „Kultur tierischer Zellen“
 Loos, U., Kühn, R. (Hrsg.), Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994,
 1. Auflage, 77-78
- [32] Mosmann, T.**
 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays
 J Immunol Methods (1983) 55-63
- [33] Mostardi, R.A., Meerbaum, S.O., Kovacik, M.W., Gradisar, Jr., I.A.**
 In vitro response of human fibroblasts to commercially pure titanium
 J Biomed Mater Res 47 (1999) 60-64
- [34] Murray, E., Provedini, D., Curran, D., Catherwood, B., Sussman, H., Manolagas, S.**
 Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity
 J Bone Miner Res 2 (1987) 231-238
- [35] Niedzwiecki, S., Klapperich, C., Short, J., Jani, S., Ries, M., Pruitt, L.**
 Comparison of three joint simulator wear debris isolation techniques: acid digestion, base digestion and enzyme cleavage
 J Biomed Mater Res 56 (2001) 245-249
- [36] Nöth, U., Hendrich, C., Merklein, E., Altvater, T., Rader, C.P., Schütze, N., Eulert, J., Tull, R.**
 Standardisiertes Testen von Skelett-Implantatoberflächen mit einem Osteoblasten-Zellkultursystem. II. Titanoberflächen unterschiedlicher Rauigkeit
 Biomed Technik 44 (1999) 6-11

- [37] **Pioletti, D.P., Takei, H., Kwon, S.Y., Wood, D., Sung K.-L.P.**
The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts
J Biomed Mater Res 46 (1999) 399-407
- [38] **Rader, C.P., Sterner, T., Jakob, E., Schütze, N., Eulert, J.**
Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene
and pure titanium particles
J Arthroplasty 14 (1999) 840-848
- [39] **Rae, T.**
A study on the effects of particulate metals of orthopedic interest on murine
macrophages in vitro
J Bone Joint Surg 57-B (1975) 444-450
- [40] **Ramaniraka, N.A., Leyvraz, P.F., Rakotomanana, L.R., Rubin, P.J., Zysset, P.K.**
Micromotion at the bone-stem interface during the gait cycle after cementless
total hip replacement : influence of stem design and loading level
Hip International 6 (1996) 51-58
- [41] **Rodan, S.B., Imai, Y., Thiede, M.A., Wesolowski, G., Thompson, D.,
Bar-Shavit, Z., Shull, S., Mann, K., Rodan, G.A.**
Characterization of a human osteosarcoma cell line (SAOS-2) with osteoblastic
properties
Cancer Res 47 (1987) 4961-4966
- [42] **Rogers, S.D., Percy, M.J., Hay, S.J., Haynes, D.R., Branley, A., Howie, D.W.**
A method for production and characterization of metal prosthesis wear particles
J Orthop Res 11 (1993) 856-864
- [43] **Säuberlich, S., Klee, D., Richter, E.J., Höcker, H., Spiekermann, H.**
Cell culture tests for assessing the tolerance of soft tissue to variously modified
titanium surfaces
Clin Oral Impl Res 10 (1999) 379-393
- [44] **Schmalzried T.P., Jasty, M., Harris, W.H.**
Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty: polyethylene wear debris and
the concept of the effective joint space
J Bone Joint Surg 74-A (1992) 849-863

- [45] **Shanbag, A.S., Jacobs, J.J., Glant, T.T., Gilbert, J.L., Black, J., Galante, J.O.**
Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement
J Bone Joint Surg 76-B (1994) 60-67
- [46] **Sun, Z.L., Wataha, J.C., Hanks, C.T.**
Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation
J Biomed Mater Res 34 (1997) 29-37
- [47] **Tsutsui, T., Kawaguchi, H., Fujino, A., Sakai, A., Kaji, H., Nakamura, T.**
Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation
J Orthop Sci 4 (1999) 32-38
- [48] **Urban, R.M., Jacobs, J.J., Tomlinson, M.J., Gavrilovic, J., Black, J., Peoch, M.**
Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement
J Bone Joint Surg 82-A (2000) 457-477
- [49] **Vermes, C., Chandrasekaran, R., Jacobs, J.J., Galante, J.O., Roebuck, K.A., Glant, T.T.**
The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts
J Bone Joint Surg 63-A (2001) 201-211
- [50] **Vidal, O., Kindblom, L.-G., Ohlsson, C.**
Expression and localization of estrogen receptor- β in murine and human bone
J Bone Miner Res 14 (1999) 923-929
- [51] **Wang, J.Y., Wicklund, B.H., Gustilo, R.B., Tsukayama, D.T.**
Prosthetic metals interfere with the functions of human osteoblast cells in vitro
Clin Orthop 339 (1997) 216-226
- [52] **Wolfarth, D.L., Han, D.W., Bushar, G., Parks, N.L.**
Separation and characterization of polyethylene wear debris from synovial fluid and tissue samples of revised knee replacements
J Biomed Mater Res 34 (1997) 57-61

- [53] Yao, J., CS-Szabo, G., Jacobs, J.J., Kuettner, K.E., Glant, T.T.**
Suppression of osteoblast function by titanium particles
J Bone Joint Surg 79-A (1997) 107-112

9.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.** Skizze einer Hüftgelenkendoprothese mit dem umgebenden sekundär gebildeten Interfacegewebe, aus dem die Gewebeproben für die nachfolgenden Versuche gewonnen wurden.
- Abb. 2.** Zellkultur von SaOS-2 Zellen
- Abb. 3.** Zellkulturflasche
- Abb. 4.** Zählkammer für die Bestimmung der Zellzahl ([31] S. 109)
- Abb. 5.** Typische Wachstumskurve ([31] S.77)
- Abb. 6.** Verstoffwechslung von MTT zu Formazansalz in vitalen Zellen
- Abb. 7.** Testprinzip des LDH - Tests
- Abb. 8.** Chemische Formel von Trypanblau
- Abb. 9.** Schema 1 - 96-Well Mikrottestplatte mit den vorgesehenen Titanpartikelkonzentrationen (Masse/100 μ l)
- Abb. 10.** Schema 2 - 12-Well Testplatte mit den vorgesehenen Titanpartikelkonzentrationen (Masse/ml)
- Abb. 11.** Wachstumskurven nach Zugabe von verschiedenen Chargen FCS (258x, 440x und 135x) zum DMEM, SaOS-2 Zellen
- Abb. 12.** REM – Aufnahme von Partikeln, gewonnen aus Patientengewebe, Patient Nr. 5, nach der Enzymauflösungsmethode
- Abb. 13.** EDX – Analyse von Partikeln, gewonnen aus Patientengewebe, Patient Nr. 5, nach der Enzymauflösungsmethode
- Abb. 14.** REM – Aufnahme von Partikeln, gewonnen aus Patientengewebe, Patient Nr. 5, nach der Gewebeauflösungsmethode mit 10%iger Salzsäure
- Abb. 15.** EDX - Analyse von Partikeln, gewonnen aus Patientengewebe, Patient Nr. 5, nach der Gewebeauflösungsmethode mit 10%iger Salzsäure

- Abb. 16.** Zellproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, MTT-Test nach 72h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln
- Abb. 17.** Zellproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, MTT-Test nach 72h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung
- Abb. 18.** Zellproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, MTT-Test nach 96h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln
- Abb. 19.** Zellproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, MTT-Test nach 96h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung
- Abb. 20.** Zellzytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, LDH-Test nach 72h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln
- Abb. 21.** Zellzytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, LDH-Test nach 72h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung
- Abb. 22.** Zellzytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, LDH-Test nach 96h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln
- Abb. 23.** Zellzytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 3), SaOS-2 Zellen, LDH-Test nach 96h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung
- Abb. 24.** Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 72h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln
- Abb. 25.** Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 72h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure -Behandlung

- Abb. 26.** Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 96h mit Salzsäure behandelten Titanpartikeln
- Abb. 27.** Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Titanpartikel (n = 4), SaOS-2 Zellen, Trypanblau-Test nach 96h mit Titanpartikeln ohne Salzsäure-Behandlung

9.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Patientendaten

Tab. 2 Titanmenge gewonnen aus Gewebe von 5 Patienten - Mittelwert aus 3 Messungen je Probe (% Abweichung)

Tab. 3 Quantifizierung des Titanpartikelverlusts mit und ohne Salzsäure-Behandlung

9.4. Chemikalienverzeichnis

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium)

Firma Biochrom KG Berlin

Inhalt: 3,7g/l NaHCO₃, 4,5g/l D-Glucose, stabilem Glutamin, ohne Na-Pyruvat

FCS (Fetales Kälberserum)

Firma Biochrom KG Berlin

Chargen 258x, 440x und 135x, Inhaltsstoffe nicht genau definiert

DMEM-Vitamine

Firma Gibco BRL

Inhalt pro Liter: 8500,00mg NaCl, 100mg D-Ca-Pantothenat, 100,00mg Cholinchlorid, 100,00mg Folsäure, 200,00mg i-Inositol, 100,00mg Nicotinamid, 100,00mg Pyridoxal HCl, 10,00mg Riboflavin, 100,00mg Thiamin HCl

Penicillin/Streptomycin Kombination

Firma Gibco BRL

Inhalt: 25000 Einheiten/ml Penicillin, 25 mg/ml Streptomycin

Trypsin-EDTA-Lösung

Firma Gibco BRL

0,5g/l Trypsin (1:250) und 0,2g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A

PBS-Dulbecco (Phosphatpuffer-Lösung)

Firma Biochrom KG Berlin

pH-Wert 7,4

Cell Proliferation Kit 1 (MTT)

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim

Inhalt: 1. MTT-Marker-Reagenz 5mg/ml in PBS, unsteril, 2.Lösungsreagenz 10% SDS in 0,01M HCl.

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim

Inhalt: Flasche 1: Katalysator, Diaphorase/NAD⁺ Mischung, lyophilisiert und stabilisiert, Flasche 2: Färbereagenz, enthält Iodotetrazolium-Chlorid (INT) und Natriumlactat, 45ml

Triton X-100 Lösung

Firma Sigma Deutschland

Salzsäure rauchend 37% (HCl)

Firma Merck Darmstadt

M=36,46g/mol

1 N HCl

Firma Merck Darmstadt

M=36,46g/l

Aceton (C₃H₆O)

Firma Merck Darmstadt

M=58,08g/mol

Ameisensäure (HCOOH)

Firma Merck Darmstadt

M=46,0g/mol

Natronlauge (NaOH)

Firma Merck Darmstadt

M=39,99g/mol

Trypanblau 0,5% in physiologischer Kochsalzlösung

Firma Biochrom KG Berlin

Mycoplasma Detection Kit

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim

Inhalt: Wand-Antikörper lyophilisiert, Blockierungslösung, Wasch-Puffer, Proben-Puffer, Kontroll-Lösung (Mycoplasmen-positiv; inaktiviert; lyophilisiert), Detektionsantikörper-Biotin-Konjugat lyophilisiert, Streptavidin-alkalische Phosphatase, Substrat-P

Collagenase A, B und D

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim

aus Clostridium histolyticum Lyophilisat

DNase 1

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim
aus Rinderpankreas Lyophilisat

Pronase

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim
Nuclease-frei, aus *Streptomyces griseus* Lyophilisat

Trypsin

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim

Hyaluronidase

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim

Papain

Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim

10. ANHANG

10.1. Messergebnisse

10.1.1. MTT-Test

MTT-Test nach 72h mit HCl-behandelten Titanpartikeln

Konzentration [μg]	Extinktion				Zellvitalität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
0	0,478	0,449	0,515	0,481	100,00%	6,88%
0,01	0,410	0,455	0,521	0,462	96,12%	12,08%
0,05	0,560	0,563	0,541	0,555	115,40%	2,15%
0,1	0,509	0,534	0,500	0,514	107,00%	3,43%
0,2	0,516	0,520	0,539	0,525	109,22%	2,34%
0,5	0,555	0,529	0,525	0,536	111,58%	3,04%
1	0,534	0,524	0,516	0,525	109,15%	1,72%
10	0,353	0,341	0,337	0,344	71,50%	2,42%
50	0,176	0,193	0,185	0,185	38,42%	4,61%
Mittelwert:					4,30%	

MTT-Test nach 72h mit Titanpartikeln ohne HCl-Behandlung

Konzentration [μg]	Extinktion				Zellvitalität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
0	0,576	0,515	0,449	0,513	100,00%	12,37%
0,01	0,542	0,467	0,416	0,475	92,53%	13,34%
0,05	0,561	0,456	0,563	0,527	102,60%	11,62%
0,1	0,557	0,516	0,420	0,498	96,95%	14,13%
0,2	0,468	0,481	0,435	0,461	89,87%	5,14%
0,5	0,521	0,501	0,479	0,500	97,47%	4,20%
1	0,473	0,492	0,436	0,467	90,97%	6,10%
10	0,379	0,450	0,337	0,389	75,71%	14,70%
50	0,301	0,269	0,245	0,272	52,92%	10,34%
Mittelwert:					10,22%	

MTT-Test nach 96h mit HCl-behandelten Titanpartikeln

Konzentration [μg]	Extinktion				Zellvitalität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
0	0,706	0,666	0,609	0,660	100,00%	7,38%
0,01	0,558	0,664	0,566	0,596	90,26%	9,90%
0,05	0,646	0,620	0,585	0,617	93,44%	4,96%
0,1	0,682	0,620	0,622	0,641	97,12%	5,49%
0,2	0,644	0,633	0,579	0,619	93,69%	5,62%
0,5	0,660	0,661	0,635	0,652	98,74%	2,26%
1	0,644	0,621	0,593	0,619	93,79%	4,12%
10	0,429	0,393	0,455	0,426	64,46%	7,31%
50	0,158	0,165	0,168	0,164	24,79%	3,14%
Mittelwert:					5,58%	

MTT-Test nach 96h mit Titanpartikeln ohne HCl-Behandlung

Konzentration [μg]	Extinktion				Zellvitalität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
0	0,470	0,462	0,474	0,469	100,00%	1,30%
0,01	0,470	0,453	0,489	0,471	100,43%	3,83%
0,05	0,406	0,432	0,417	0,418	89,26%	3,12%
0,1	0,479	0,455	0,455	0,463	98,79%	2,99%
0,2	0,468	0,465	0,429	0,454	96,87%	4,78%
0,5	0,456	0,478	0,441	0,458	97,80%	4,06%
1	0,399	0,444	0,425	0,423	90,18%	5,34%
10	0,286	0,314	0,337	0,312	66,64%	8,18%
50	0,238	0,258	0,226	0,241	51,35%	6,72%
Mittelwert:					4,48%	

10.1.2. LDH-Test

Konzentration [µg]	Extinktion				Zytotoxizität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
NK	0,765	0,824	0,833	0,807	0,00%	0,00%
0,01	0,912	0,970	0,945	0,942	7,91%	3,09%
0,05	0,875	0,907	0,914	0,899	5,35%	2,31%
0,1	0,912	0,891	0,884	0,896	5,17%	1,63%
0,2	0,891	0,895	0,880	0,889	4,76%	0,87%
0,5	0,902	0,881	0,852	0,878	4,16%	2,86%
1	0,958	0,897	0,840	0,898	5,33%	6,57%
10	1,454	1,352	1,375	1,394	34,34%	3,84%
50	2,076	1,895	1,952	1,974	68,35%	4,69%
PK	2,564	2,487	2,493	2,515	100,00%	1,70%
				Mittelwert:		2,76%

LDH-Test nach 72h mit HCl-behandelten Titanpartikeln

Konzentration [µg]	Extinktion				Zytotoxizität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
NK	0,988	1,011	0,996	0,998	0,00%	0,00%
0,01	1,105	0,962	1,154	1,074	4,97%	9,29%
0,05	1,098	1,211	1,213	1,174	11,58%	5,61%
0,1	1,174	1,152	1,159	1,162	10,77%	0,97%
0,2	1,109	1,084	1,122	1,105	7,03%	1,75%
0,5	1,152	1,042	1,075	1,090	6,02%	5,18%
1	1,006	1,048	1,029	1,028	1,93%	2,05%
10	1,374	1,414	1,403	1,397	26,29%	1,48%
50	1,865	1,991	1,837	1,898	59,31%	4,32%
PK	2,564	2,487	2,493	2,515	100,00%	1,70%
				Mittelwert:		3,23%

LDH-Test nach 72h mit Titanpartikeln ohne HCl-Behandlung

Konzentration [µg]	Extinktion				Zytotoxizität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
NK	1,023	1,019	1,055	1,032	0,00%	0,00%
0,01	1,120	1,069	1,221	1,137	6,15%	6,81%
0,05	1,048	1,144	1,155	1,116	4,92%	5,28%
0,1	1,104	1,073	1,093	1,090	3,40%	1,44%
0,2	1,125	1,085	1,129	1,113	4,76%	2,19%
0,5	1,102	1,100	1,096	1,099	3,95%	0,28%
1	1,103	1,206	1,157	1,155	7,28%	4,48%
10	1,783	1,792	1,827	1,801	45,32%	1,29%
50	2,150	2,115	2,125	2,130	64,75%	0,85%
PK	2,768	2,694	2,721	2,728	100,00%	1,37%
				Mittelwert:		2,40%

LDH-Test nach 96h mit HCl behandelten Titanpartikeln

Konzentration [µg]	Extinktion				Zytotoxizität [%]	Standardabweichung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert		
NK	1,695	1,727	1,698	1,707	0,00%	0,00%
0,01	1,684	1,774	1,725	1,728	2,06%	2,61%
0,05	1,854	1,727	1,813	1,798	8,95%	3,60%
0,1	1,773	1,766	1,799	1,779	7,12%	0,98%
0,2	1,828	1,902	1,859	1,863	15,31%	1,99%
0,5	1,784	1,814	1,862	1,820	11,10%	2,16%
1	1,691	1,736	1,834	1,754	4,60%	4,17%
10	2,036	1,988	2,168	2,064	35,00%	4,52%
50	2,561	2,603	2,527	2,564	83,94%	1,48%
PK	2,768	2,694	2,721	2,728	100,00%	1,37%
				Mittelwert:		2,29%

LDH-Test nach 96h mit Titanpartikeln ohne HCl-Behandlung

10.1.3. Trypanblau-Test

Trypanblau-Test
nach 72h mit
HCl-behandelten
Titanpartikeln

Versuch Nr. 1								
Konzentration der Partikel [µg/ml]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende (%)
0	44	40	105000	11	12	28750	133750	78,50%
0,1	39	41	100000	10	11	26250	126250	79,21%
1	32	33	81250	10	8	22500	103750	78,31%
10	23	25	60000	10	9	23750	83750	71,64%
500	17	14	36750	9	10	23750	62500	62,00%

Versuch Nr. 2								
Konzentration der Partikel [µg/ml]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende (%)
0	40	45	106250	5	4	11250	117500	90,43%
0,1	38	29	83750	1	3	5000	88750	94,37%
1	40	34	92500	9	5	17500	110000	84,09%
10	31	28	73750	11	11	27500	101250	72,84%
500	23	19	52500	9	12	26250	78750	66,67%

Mittelwert						
Konzentration der Partikel [µg/ml]	lebende Zellen		tote Zellen		Gesamtzellzahl	
	Zellzahl /ml		Zellzahl /ml		Zellzahl /ml	Überlebende (%)
0	105625		20000		125625	84,08%
0,1	91875		15625		107500	85,47%
1	86875		20000		106875	81,29%
10	66875		25625		92500	72,90%
500	45625		25000		70625	64,60%

Trypanblau-Test
nach 72h mit
Titanpartikeln ohne
HCl-Behandlung

Versuch Nr. 1								
Konzentration der Partikel [µg/ml]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende (%)
0	45	47	115000	8	7	18750	133750	85,98%
0,1	38	40	97500	5	5	12500	110000	88,64%
1	35	38	91250	5	6	13750	105000	86,90%
10	25	32	71250	9	9	22500	93750	76,00%
500	23	20	53750	12	11	28750	82500	65,15%

Versuch Nr. 2								
Konzentration der Partikel [µg/ml]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zählwert 1	Zählwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende (%)
0	45	47	115000	8	7	18750	133750	85,98%
0,1	28	27	68750	8	9	21250	90000	76,39%
1	30	38	85000	11	9	25000	110000	77,27%
10	38	39	96250	15	13	35000	131250	73,33%
500	26	24	62500	13	12	31250	93750	66,67%

Mittelwert						
Konzentration der Partikel [µg/ml]	lebende Zellen		tote Zellen		Gesamtzellzahl	
	Zellzahl /ml		Zellzahl /ml		Zellzahl /ml	Überlebende (%)
0	107083		20833		127916	83,71%
0,1	81667		23750		105417	77,47%
1	90833		33333		124166	73,15%
10	94583		45417		140000	67,56%
500	69167		45000		114167	60,58%

Kapitel 10. Anhang

Versuch Nr. 1								
Konzentration der Partikel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende [%]
0	25	26	63750	7	5	15000	78750	80,95%
0,1	26	23	61250	7	9	20000	81250	75,38%
1	18	25	53750	8	5	16250	70000	76,79%
10	16	17	41250	8	9	21250	62500	66,00%
500	6	12	22500	10	6	20000	42500	52,94%

Versuch Nr. 2								
Konzentration der Partikel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende [%]
0	36	37	91250	11	9	25000	116250	78,49%
0,1	34	37	86750	10	15	31250	120000	73,96%
1	31	27	72500	18	16	42500	115000	63,04%
10	34	29	78750	18	25	53750	132500	59,43%
500	37	38	93750	27	35	77500	171250	54,74%

Mittelwert						
Konzentration der Partikel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	lebende Zellen		tote Zellen		Gesamtzellzahl	
	Zellzahl /ml		Zellzahl /ml		Zellzahl /ml	Überlebende [%]
0	77500		20000		97500	79,49%
0,1	75000		25625		100625	74,53%
1	63125		29375		92500	68,24%
10	60000		37500		97500	61,54%
500	58125		48750		106875	54,39%

**Trypanblau-Test
nach 96h mit
HCl -behandelten
Titanpartikeln**

Versuch Nr. 1								
Konzentration der Partikel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende [%]
0	35	32	83750	8	8	20000	103750	80,72%
0,1	29	28	71250	11	8	23750	95000	75,00%
1	24	28	65000	10	13	28750	93750	69,33%
10	22	20	52500	17	11	35000	87500	60,00%
500	16	15	38750	15	13	35000	73750	52,54%

Versuch Nr. 2								
Konzentration der Partikel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	lebende Zellen			tote Zellen			Gesamtzellzahl	
	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zahlwert 1	Zahlwert 2	Zellzahl /ml	Zellzahl /ml	Überlebende [%]
0	35	37	90000	8	10	22500	112500	80,00%
0,1	28	29	71250	12	12	30000	101250	70,37%
1	27	25	65000	11	14	31250	96250	67,53%
10	23	27	62500	17	15	40000	102500	60,98%
500	16	12	35000	14	12	32500	67500	51,85%

Mittelwert						
Konzentration der Partikel [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	lebende Zellen		tote Zellen		Gesamtzellzahl	
	Zellzahl /ml		Zellzahl /ml		Zellzahl /ml	Überlebende [%]
0	86875		21250		108125	80,35%
0,1	71250		26875		98125	72,61%
1	65000		30000		95000	68,42%
10	57500		37500		95000	60,53%
500	36875		33750		70625	52,21%

**Trypanblau-Test
nach 96h mit
Titanpartikeln ohne
HCl-Behandlung**

10.2. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. Gradinger, Direktor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Rechts der Isar, München, für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftliche Untersuchungen durchführen zu können, in deren Ergebnis die vorliegende Arbeit entstand.

Außerdem möchte ich mich für die Themenstellung, sein ständiges Interesse, seine vielseitige Unterstützung und die wertvollen Anregungen herzlich bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. K. Bachfischer für die Einführung in das Arbeitsgebiet und die intensive Betreuung zu Beginn meiner Arbeit.

Für zahlreiche wertvolle Diskussionen und Hilfestellungen im Rahmen der wöchentlichen Laborbesprechungen bin ich allen Beteiligten außerordentlich dankbar.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau J. Tübel. Durch ihren engagierten Einsatz hat sie den Aufbau des Zellkulturlabors sowie die Entwicklung der Testmethoden für die Experimente erst ermöglicht.

Bei Frau Hartl vom Lehrstuhl für Metallurgie und Metallkunde der TU-München, Garching, bedanke ich mich für die Anfertigung der REM-Bilder and EDX-Analysen.

Herrn E. Steinhauser aus der Abteilung für Biomechanik, danke ich für die Bereitstellung der industriell hergestellten Titanpartikel.

Bei meinen Eltern und Christoph Stöhr bedanke ich mich herzlichst für die freundliche Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

10.3. Lebenslauf

Amelie Traue

- geboren am 20.10.1975 in Halle
- 1982 bis 1995 Schulausbildung mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium München-Moosach
- 1995 bis 1996 ein Semester Studiengang Amerikanistik, an der LMU, München
- 1996 bis 1998 Studium der Humanmedizin, LMU, München
- 1998 Ärztliche Vorprüfung
- 1998 bis 2002 Studium der Humanmedizin, an der TU-München
- 1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Praktisches Jahr:
 - Chirurgie, Städtisches Krankenhaus München-Bogenhausen
 - Orthopädie, Universitätsklinik Rechts der Isar, München und Universitätsklinikum Balgrist, Zürich, Schweiz
 - Innere Medizin, Universitätsklinikum King Edward III, Durban, Südafrika
- November 2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

